



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Traitements pour la Thérapie des Cancers Épithéliaux :
Criblage et Caractérisation de Biomolécules Actives
Originaires de Sources Naturelles Comme Potentiels
Candidats Antitumoraux.**

**Uso de Sustancias Naturales Como Terapia Contra
el Cáncer: Terapias Combinadas Aplicadas sobre
Cánceres Epiteliales.**

**Dña. Manel Ben Hammouda
2018**

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A y en el Laboratorio de Epidemiología Molecular y Patología Experimental aplicada a enfermedades infecciosas (LR11IPT04/LR16IPT04) bajo la dirección del Prof. José Neptuno Rodríguez-López y la Dra. Khadija Essafi-Benkhadir

Este trabajo fue financiado, en parte, por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, cofinanciación con fondos del FEDER) (SAF2013- 48375-C2-1-R y SAF2016-77241-R), Fundación Seneca, Región de Murcia (FS-RM) (19304/PI/14, una beca Erasmus Mundus de la UE Mare Nostrum y el Ministerio de Educación Superior e Investigación Científica (MESRS) (LR11IPT04/LR16IPT04)

***Ce travail a été réalisé au Laboratoire
d'Epidémiologie Moléculaire et Pathologie
Expérimentale Appliquée aux Maladies Infectieuses
(LR11IPT04/LR16IPT04) et au Département de
Biochimie et Biologie Moléculaire A sous la direction
du Dr. Khadija Essafi-Benkhadir et du Pr. José
Neptuno Rodríguez-López***

***Ce travail a bénéficié du support financier du Ministère de
l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
(MESRS) pour le LR11IPT04/LR16IPT04 et du Ministère de
l'Economie et de la Compétitivité (MINECO ; Co-
financement avec des fonds FEDER) (SAF2013-48375-C2-1-
R / SAF2016-77241-R), de la Fondation Séneca, La région
de Murcie (FS-RM) (19304/PI/14) et d'une bourse Erasmus
Mundus EU Mare Nostrum***

ABREVIATURAS

7-AAD: 7-aminoactinomicina D

ABTS: 2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolesulfónico)

ADN: ácido desoxirribonucleico

AINS: medicamentos antiinflamatorios no esteroideos

AMT: aminopterina

AP1: factor de transcripción

ARN: ácido ribonucleico

Bax: Bcl-2 associated X protein

BCA: Bicinchoninic Acid

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BCRP: proteína de resistencia del cáncer de mama

Bim: Bcl-2-like protein 11

CDIS: carcinoma ductal in situ

CDK4: cinasa dependiente de ciclina

CDKN2A: cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A

CDKN2B: cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B

CLIS: carcinoma lobular in situ

c-Myc: proto-oncogene

COX: enzimas ciclooxigenasas

COX-2: Ciclooxigenasa-2

DHF: Dihidrofolato

DHFR: Dihidrofolato reductasa

DMEM: Dulbecco Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNMT: ADN metiltransferasa

E: Enzima

E/NADPH/DHF: complejo de Michaelis

E/NADPH: la holoenzima

E2F: factor de transcripción

E7: onco-proteína del virus del papiloma humano

ECG: epicatequina galato

ECM: matriz extracelular

EcoR1: Enzima de restricción

EDTA: ácido edético ácido etilendiaminotetraacético

EGC: Epigallocatequina
EGCG: (-) -epigallocatequina-3-galato
EGCG: Epigallocatequina galato
EGF-R / erbB: receptor del factor de crecimiento epidérmico
ErbB2: oncoproteína HER-2 / neu
FGF: Fibroblast Growth Factor
FPGS: enzima folilpoliglutamil sintasa
FR: Folic Acid Receptors
GC: Galocatequina
GCG: Galocatequin galato
GTPases: GTPase-accelerating proteins (GAPs)
hDHFR: enzima humana
IFN-g: interferón g
IGF: factor de crecimiento de la insulina
ALL: leucemia linfoblástica aguda
LH-RH: hormona liberadora de gonadotropina
MAPK: Mitogen-activated protein kinases
MCR1: the mobilized colistin resistance
MRP: Multidrug Resistance Proteins
MTT: 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio
MTX: metotrexato
NK: natural killer
p53: gen supresor de tumores
PABA: ácido p-aminobenzoico
PCFT: proton-coupled folate transporter
PCNA: antígeno nuclear celular proliferante
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE: ficoeritrina
PTEN: Phosphatase and tensin homolog
Puma: Bcl-2-binding component 3 (BBC3)
Rb: proteína Retinoblastoma
RCNT: Registro de Cánceres en el Norte de Túnez
RFC: Reduced Folate Carrier (SLC19A1)
RT: Real Time
SD: desviación estándar

SDS: dodecil sulfato de sodio

SEM: error estándar del promedio

TEMED: N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina

TGF α : factor de crecimiento transformante α

TMP: la trimetoprima

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

TQD: tetrahidroquinazolína

TSP-1: trombospondina 1

VEGF: vascular endothelial growth factor

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

LISTE DES ABBREVIATIONS

7-AAD : 7-amino-actinomycine D

ABTS : 2,2'-azino-bis- (3-ethylbenzothiazole-sulfonique)

ADN : acide désoxyribonucléique

AINS : Médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens

ARN: acide ribonucléique

Bax: Bcl-2 associated X protein

BCA: Bicinchoninic Acid

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

Bim: Bcl-2-like protein 11

CDIS : Carcinome canalaire in situ

CDK4 : kinase dépendante des cyclines.

CDKN2A: cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A

CDKN2B: cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B

CLIS : Carcinome lobulaire in situ

C-Myc : proto-oncogène myc

COX: enzyme cyclooxygénase

CREB: CAMP Responsive Element Binding Protein

DMEM: Dulbecco Modified Eagle Medium

DMSO : Dimethyl sulfoxide

E2F: facteur de transcription

E7 : onco-protéine 7 du papillomavirus humain

ECM : matrice extracellulaire

EDTA : acide éthylène-diamine-tétracétique acide édétique

EGCG : (-) -épigallocatechine-3-gallate

EGF-R /erbB : récepteur du facteur de croissance épidermique

ErbB2: onco-protéine HER-2 / neu

FGF: Fibroblast Growth Factor

FZD: récepteur Frizzled

GSK3 β : Glycogène synthase kinase-3 β

GTPases: GTPase-accelerating proteins (GAPs)

IGF: Insulin-like Growth Factor

JNK/SAPK: c-Jun N-terminal Kinase/Stress Activated Protein Kinase

LH-RH: gonadolibérine

LRP5/6: Low-density lipoprotein-related receptor protein

MAPK: Mitogen-activated protein kinases
MC1R: Melanocortin 1 Receptor
MTT: 3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényl tétrazolium
NK : natural killer
p53 : gène suppresseur de tumeur
PCNA : Proliferating cell nuclear antigen
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDK1: Phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1
PE: phycoerythrin
PTEN: Phosphatase and tensin homolog
Puma: Bcl-2-binding component 3 (BBC3)
Rb : la protéine du rétinoblastome
RCNT : Registre des Cancers au Nord de la Tunisie
RSK: S6 kinase ribosomale
RT: Real Time
RTK : récepteurs à tyrosine kinase
SD : écart-type standard
SDS: dodécylsulfate de sodium
SEM : erreur standard de la moyenne
SVF: Sérum de veau foetal
TEMED : N, N, N', N'-tétraméthyl-éthylènediamine
TGF α : facteur de croissance transformant- α
TGF- β : facteur de croissance transformant- β
TSP-1 : Thrombospondine 1
VEGF: Vascular endothelial growth factor
XTT: 2,3-bis (2-méthoxy-4-nitro-5-sulphényl) -2-H-tétrazolium-5-carboxanilide
 α -MSH: alpha-Melanocyte Stimulating Hormone

ÍNDICE

PREÁMBULO	xxix
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. CÁNCER.....	3
1.1.1. CONCEPTOS GENERALES DEL CÁNCER.....	
1.1.2. CAUSAS DEL CÁNCER.....	4
1.1.2.1 Autosuficiencia de las señales de crecimiento.....	5
1.1.2.2 Insensibilidad a señales que inhiben el crecimiento	6
1.1.2.3 Evasión de la muerte programada	7
1.1.2.4 Potencial replicativo ilimitado	8
1.1.2.5 Angiogénesis	10
1.1.2.6 Invasión y metástasis.....	11
1.1.3. CÁNCER DE PIEL MELANOMA.....	12
1.1.3.1. Melanoma.....	12
1.1.3.1.1 Cáncer de piel no-melanoma.....	12
1.1.3.1.1 Cáncer de piel melanoma.....	13
1.1.3.2 Evolución del Melanoma	14
1.1.3.3 Epidemiología del Melanoma	15
1.1.3.4 Etiología del melanoma.....	17
a. Melanoma familiar: defectos en los genes CDKN2A y CDK4	18
b. Otros loci genéticos en el melanoma maligno cutáneo.....	20
c. Defectos en el gen PTEN en el melanoma maligno cutáneo	21
d. en los genes RAS y RAF en el melanoma maligno cutáneo.....	21
1.1.3.5 Invasión y metástasis.....	23
1.1.3.6 Diagnóstico del melanoma.....	25
1.1.3.7 Tratamiento del melanoma.....	26
a. Cirugía.....	27
b. Radioterapia	27
c. Terapia biológica.....	28
d. Quimioterapia	29
e. Quimioprevención.....	31
1.1.4. CÁNCER DE MAMA.....	34
1.1.4.1 Epidemiología del cáncer de mama	34
1.1.4.2 Etiología del cáncer de mama.....	36
a. Factores hormonales	37
b. Factores ambientales.....	38
c. Factores genéticos y familiares.....	39
d. Enfermedad benigna de la mama	39
e. Antecedentes personales de cáncer	39
1.1.4.3 Diagnóstico del cáncer de mama	39
1.1.4.4 Pronóstico del cáncer de mama.....	42
a. Factores pronósticos clínicopatológicos	42

b. Factores pronósticos moleculares.....	43
1.1.4.5 Invasión y metástasis.....	48
1.1.4.6 Tratamiento del cáncer de mama.....	49
a. Cirugía.....	49
b. Radioterapia.....	50
c. Quimioterapia.....	50
d. Terapia hormonal.....	51
1.2. ANTIFOLATOS.....	51
1.2.1. ÁCIDO FÓLICO.....	51
1.2.2. DIHIDROFOLATO REDUCTASA.....	54
1.2.2.1 Mecanismo de acción.....	55
1.2.2.2 Estructura de la DHFR.....	57
a. Organización estructural de la DHFR.....	57
b. Conformación del centro activo de la DHFR.....	58
c. Movimiento de los dominios y los bucles durante el ciclo catalítico.....	59
1.2.2.3 El gen de la DHFR.....	60
1.2.3. METABOLISMO DEL ÁCIDO FÓLICO.....	61
1.2.4. ANTIFOLATOS.....	64
1.2.4.1 Metotrexato.....	66
1.2.5. TRANSPORTE CELULAR DE FOLATOS Y ANTIFOLATOS.....	69
1.2.5.1 Transportador de Folatos Reducidos (RFC).....	69
1.2.5.1.1 Receptores del Ácido Fólico (FR).....	70
a. Mecanismo de transporte de folatos a través del FR α	70
b. Función de la FR α	73
c. FR α y el transporte intracelular de drogas.....	73
1.2.5.1.2 Transportadores de Folato de Bajo pH (PCFT).....	74
1.2.6 MECANISMO DE RETENCIÓN CELULAR DE FOLATOS Y ANTIFOLATOS.....	74
1.2.6.1 Exportación de folatos y antifolatos a través de proteínas de resistencia a multidroga (MRP).....	76
1.3. CATEQUINAS DE TÉ.....	76
1.3.1. EL TÉ.....	76
1.3.1.1. Historia.....	76
1.3.1.2. La planta.....	77
1.3.1.3 Clasificación.....	77
1.3.1.4 Composición.....	78
1.3.1.5 Compuestos fenólicos.....	79
a. No Flavonoides.....	80
b. Flavonoides.....	81
1.3.2. PROPIEDADES TERAPÉUTICAS DEL TÉ VERDE.....	87
1.3.2.1 Efectos antibacterianos, antivirales y antifúngicos.....	88
1.3.2.2 Protección frente a diabetes.....	91
1.3.2.3 Protección frente a obesidad.....	91
1.3.2.4 Protección frente a enfermedades cardiovasculares.....	93
1.3.2.5 Efectos antiinflamatorios.....	94
1.3.2.6 Protección frente a enfermedades neurodegenerativas y envejecimiento.....	95

1.3.2.7 Protección frente al cáncer.....	97
1.3.3. EL TÉ COMO ANTIFOLATO	99
1.3.3.1 Inhibición de DHFR por las catequinas del té.....	101
1.3.3.2. Modelaje molecular e interacción EGCG-DHFR.....	101
1.3.3.4. Efectos de la interrupción del ciclo del fólculo por EGCG.....	104
1.4 VENENOS DE SERPIENTES	105
1.4.1. COMPONENTES DE LOS VENENOS DE SERPIENTE	106
1.4.1.1. Las desintegrinas.....	107
1.4.1.1.1 Clasificación y diversidad de desintegrinas.....	107
1.4.1.1.2 Implicaciones terapéuticas de las desintegrinas	109
1.4.1.2. Las lectinas de tipo C.....	112
1.4.1.2.1. Clasificación y diversidad de las lectinas de tipo C	112
1.4.1.2.2. Implicaciones terapéuticas de las lectinas de tipo C	113
2. OBJETIVOS.....	185
3. TÉCNICAS E INSTRUMENTACIÓN	193
3.1. MODELOS EXPERIMENTALES	193
3.1.1. CULTIVOS CELULARES	193
3.1.2. DESCONGELACIÓN Y CULTIVO DE LAS CÉLULAS.....	195
3.1.3. CRIO CONSERVACIÓN CELULAR.....	195
3.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR.....	203
3.2.1. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.....	203
3.2.1.1. Ensayo con azul tripán.....	203
3.2.1.2. Ensayo con MTT.....	206
3.2.1.3. Ensayo con XTT	208
3.2.2. ENSAYOS DE APOPTOSIS.....	209
3.2.2.1. Análisis de apoptosis mediante ensayo con Anexina V/7-Aminoactinomicina D ...	209
3.2.2.2. Detección de apoptosis mediante Elisa.....	211
3.2.2.3. Análisis de la apoptosis mediante tinción de Hoechst	213
3.2.3. DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE ROS INTRACELULAR.....	214
3.2.4. ENSAYOS DE INVASIVIDAD.....	214
3.2.4.1. Ensayo de quimiotaxis (cámara de Boyden)	215
3.2.4.2. Ensayo de migración	215
3.2.4.3. Ensayo de adhesión	216
3.2.5. MICROSCOPÍA.....	217
3.2.5.1. Microscopía óptica	217
3.3. TÉCNICAS DE BIOQUÍMICA.....	222
3.3.1. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	222
3.3.1.1. Separación de subunidades de la proteína	223
3.3.1.2. Determinación de la concentración de proteínas.....	223
3.3.1.3. Digestión enzimática y química de subunidades de la proteína	224
3.3.1.4. Secuenciación de péptidos y espectrometría de masas	224
3.3.2. ANÁLISIS DE LA MASA PROTEICA POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	224

3.3.3. LIOFILIZACIÓN.....	224
3.3.4. ELECTROFORESIS.....	225
3.3.4.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico: SDS PAGE	225
3.3.5. WESTERN BLOT.....	230
3.3.6. AISLAMIENTO DE LOS FRACCIONES NÚCLEICAS Y CITOSÓLICAS MEDIANTE FRACCIONAMIENTO CELULAR.....	233
3.3.7. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS.....	233
3.3.8. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	236
3.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	237
3.4.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	237
3.4.1.1. Extracción de ADN genómico.....	237
3.4.1.2. Extracción de ARN total.....	238
3.4.1.3. EXTRACCIÓN DE ARNm.....	239
3.4.2. RETROTRANSCRIPCIÓN.....	240
3.4.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	241
3.4.3.1. PCR convencional.....	241
3.4.3.2. PCR a tiempo real.....	242
3.4.4. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA.....	244
3.4.5. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE INTERFERENCIA POR ARN.....	247
3.5. BIOINFORMÁTICA.....	249
3.5.1. MODELIZACIÓN MOLECULAR.....	249
3.5.2. ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	249
3.6. ESTADÍSTICA.....	250
4. RESULTADOS.....	301
4.1. LA LEBEINA, UNA DESINTEGRINA DERIVADA DEL VENENO DE SERPIENTE, INDUCE APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS DE MELANOMA.....	301
4.1.1. TÍTULO.....	301
4.1.2. AUTORES.....	301
4.1.3. REFERENCIA.....	301
4.1.4. URL.....	301
4.1.5. RESUMEN.....	303
4.2. LA MACROVIPECETINA, UNA LECTINA DE TIPO C DERIVADA DE MACROVIPERA LEBETINA, INHIBE LA PROLIFERACIÓN Y SUPRIME LA MIGRACIÓN EN LAS CÉLULAS DE MELANOMA SK-MEL-28 Y LAS SENSIBILIZA PARA EL CISPLATINO.....	319
4.2.1. TÍTULO.....	319

4.2.2. AUTORES.....	319
4.2.3. REFERENCIA.....	319
4.2.4. URL	319
4.2.5. RESUMEN	321
4.3. UNA NUEVA TERAPIA HIPOMETILANTE PARA INDUCIR APOPTOSIS DEPENDIENTE DE E2F1 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA CON RECEPTOR DE ESTRÓGENO-α-NEGATIVO	
4.3.1. TÍTULO.....	341
4.3.2. AUTORES.....	341
4.3.3. REFERENCIA.....	341
4.3.4. URL	341
4.3.5. RESUMEN	343
5.CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	359
5.1. CONCLUSIONES	359
5.2. PERSPECTIVAS.....	359
6.BIBLIOGRAFÍA.....	361

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	xxxii
1. INTRODUCTION	119
1.1. CANCER.....	119
1.1.1. CONCEPTS GENERAUX DU CANCER.....	119
1.1.2. CAUSES DU CANCER.....	119
1.1.2.1. Autosuffisance des signaux de croissance	120
1.1.2.2. Insensibilité aux signaux qui inhibent la croissance	121
1.1.2.3. Résistance à la mort programmée	122
1.1.2.4. Potentiel réplicatif illimité	123
1.1.2.5. Angiogenèse.....	124
1.1.2.6. Invasion et métastases	125
1.1.3. CANCER DE LA PEAU	126
1.1.3.1. Mélanome.....	126
1.1.3.1.1. Cancer de la peau de type non-mélanome.....	126
1.1.3.1.2. Cancer de la peau de type mélanome.....	127
1.1.3.2. Evolution du mélanome.....	128
1.1.3.3. Épidémiologie du mélanome	129
1.1.3.4. Étiologie du mélanome.....	131
a. Héritaire : des défauts dans les gènes CDKN2A et CDK4	132
b. Autres loci génétiques dans le mélanome malin cutané	134
c. Défauts au niveau de gène PTEN dans le mélanome malin cutané.....	134
d. Défauts au niveau des gènes RAS et RAF dans le mélanome malin cutané	134
1.1.3.5. Les voies de signalisations impliquées dans le mélanome	136
1.1.3.5.1. La voie Wnt/ β -caténine	136
1.1.3.5.2. La voie TGF- β dépendante des protéines Smads	137
1.1.3.5.3. La voie des MAP kinases	138
a. La voie RAS-RAF-MEK-ERK	139
b. La voie JNK/SAPK (c-Jun N-terminal Kinase/ Stress Activated Protein Kinase) ..	140
c. La voie P38 MAPK.....	141
1.1.3.5.3. La voie PI3K/AKT	141
1.1.3.5.4. La voie de l'AMPc et MITF.....	143
1.1.3.5.5. La voie JAKs/STAT3	144
1.1.3.5.6. La voie NF- κ B	146
1.1.3.5.7. La voie p53	147
1.1.3.6. Cycle cellulaire et mélanome	148
1.1.3.7. Apoptose et mélanome	150
1.1.3.7.1. Les voies d'activation des caspases.....	150
a. La voie intrinsèque mitochondriale	151
b. La voie extrinsèque.....	152
1.1.3.7.2. La voie indépendante des caspases.....	153
1.1.3.8. Invasion et métastases des mélanomes.....	153

1.1.3.8.1. Interaction cellule-cellule / cellule-matrice extracellulaire (ECM)	156
1.1.3.8.2. Les molécules d'adhésion cellulaire : rôles intégrines et cadhérines	157
1.1.3.8.2.1. Les intégrines.....	157
1.1.3.8.2.2. Intégrines et signalisation cellulaire	158
1.1.3.8.2.3. Les Cadhérines.....	161
1.1.3.8.2.4. La transition épithélio-mésenchymateuse.....	161
1.1.3.9. Angiogenèse.....	162
1.1.3.10. Diagnostic du mélanome.....	163
1.1.3.11. Le traitement du mélanome.....	164
a. La chirurgie.....	164
b. La radiothérapie.....	165
c. La thérapie biologique.....	165
d. La chimiothérapie.....	166
e. La chimioprévention.....	168
1.2. LES SERPENTS ET LEURS VENINS COMME SOURCE DE BIOMOLECULES THERAPEUTIQUES.....	171
1.2.1. LES CONSTITUANTS DES VENINS DE SERPENTS	172
1.2.1.1. Les désintégrines.....	173
1.2.1.1.1 Classification et diversité des désintégrines.....	173
1.2.1.1.2 Implication thérapeutique des désintégrines dans le cancer	174
1.2.1.2. Les lectines de type C.....	177
1.2.1.2.1. Classification et diversité des Lectines de type C	177
1.2.1.2.2. Implication thérapeutique des lectines de type C	178
2.DELIMITATION DE SUJET.....	289
3.MATERIEL ET METHODES.....	255
3.1. MODÈLES EXPÉRIMENTAUX	255
3.1.1. CULTURE CELLULAIRE.....	255
3.1.2. DECONGELATION ET CULTURE CELLULAIRE	257
3.1.3. CONSERVATION DES CELLULES.....	257
3.2. TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE	265
3.2.1. TESTS DE VIABILITE CELLULAIRE	265
3.2.1.1. Test d'exclusion de bleu de trypan	265
3.2.1.2. Test MTT	268
3.2.1.3. Test XTT.....	269
3.2.2. TESTS D'APOPTOSE.....	270
3.2.2.1. Analyse d'apoptose par l'annexine V/7-amino-actinomycine D.....	270
3.2.2.2. Détection de l'apoptose par le test Elisa.....	272
3.2.2.3. Analyse de l'apoptose par la coloration de hoechst.....	273
3.2.3. Détection des niveaux intracellulaires des espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	274
3.2.4. Tests d'invasion.....	275
3.2.4.1. Test d'invasion (chambre de boyden).....	275

3.2.4.2 Test de migration	275
3.2.4.3. Test d'adhésion	276
3.2.5. MICROSCOPIE	277
3.2.5.1. Microscopie optique	277
3.3. TECHNIQUES DE BIOCHIMIE	282
3.3.1. PURIFICATION DES PROTEINES	282
3.3.1.1 Séparation des sous-unités protéiques	283
3.3.1.2 Détermination de la concentration en protéines totales	283
3.3.1.3 Digestion enzymatique et chimique des sous-unités protéiques	283
3.3.1.4. Séquençage peptidique et spectrométrie de masse	283
3.3.2. ANALYSE DE LA MASSE DES PROTEINES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	284
3.3.3. LYOPHILISATION	284
3.3.4. ELECTROPHORESE	284
3.3.4.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-dodécylsulfate de sodium : SDS-PAGE	284
3.3.5. WESTERN BLOT	288
3.3.6. FRACTIONNEMENT CELLULAIRE : EXTRACTION DE LA FRACTION NUCLEAIRE ET CYTOSOLIQUE	290
3.4. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	291
3.4.1. EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES	291
3.4.1.1. Extraction de l'ARN total	291
3.4.1.2. Extraction de l'ARNm	292
3.4.2. RETROTRANSCRIPTION	293
3.4.3. REACTION DE LA POLYMERASE EN CHAINE (PCR)	294
3.4.3.1. PCR en temps réel	294
3.5. APPROCHES BIOINFORMATIQUES	296
3.5.1. MODELISATION MOLECULAIRE	296
3.5.2. ARRIMAGE MOLECULAIRE	296
3.6. STATISTIQUES	297
4.RESULTAS	301
4.1. LA LEBEIN, UNE DESINTEGRINE DERIVEE DE VENIN DE SERPENT, INDUIT L'APOPTOSE DANS DES CELLULES DE MELANOME	301
4.1.1. TITRE	301
4.1.2. AUTEURS	301
4.1.3. REFERENCE	301
4.1.4. URL	301
4.1.5. RESUME	303

<i>4.2. LA MACROVIPECETINE, UNE LECTINE DE TYPE C, DERIVEE DE MACROVIPERA LEBETINA, INHIBE LA PROLIFERATION, LA MIGRATION ET L'INVASION DANS DES CELLULES DU MELANOME SK-MEL-28 ET LES SENSIBILISE A LA DROGUE CISPLATINE.</i>	319
4.2.1. TITRE	319
4.2.2. AUTEURS.....	319
4.2.3. REFERENCE.....	319
4.2.4. URL	319
4.2.5. RESUME	322
<i>4.3. UNE NOUVELLE THÉRAPIE HYPO-MÉTYLANTE INDUISANT L'APOPTOSE DÉPENDANTE D'E2F1 DANS DES CELLULES CANCÉREUSES DU SEIN N'EXPIANT PAS LE RECEPTEUR D'ŒSTROGENE α</i>	341
4.3.1. TITRE	341
4.3.2. AUTEURS.....	341
4.3.3. REFERENCE.....	341
4.3.4. URL	341
4.3.5. RESUME	343
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	365
5.1. CONCLUSIONS.....	365
5.2. PERSPECTIVES.....	370
6. REFERENCES	372

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.1. Capacidades adquiridas por las células cancerígenas durante el desarrollo tumoral.</i>	4
<i>Figura 1.2. Esquema del ciclo celular.</i>	7
<i>Figura 1.3. Regulación de la longitud de los telómeros en células normales y cancerosas por la enzima telomerasa.</i>	9
<i>Figura 1.4. Etapas en la evolución del melanoma maligno cutáneo.</i>	15
<i>Figura 1.5. Datos epidemiológicos de la incidencia del melanoma.</i>	16
<i>Figura 1.6. Codificación genómica y mecanismo de acción de los supresores de tumores p16INK4a y p14ARF.</i>	19
<i>Figura 1.7. Vías de señalización RAS/RAF.</i>	22
<i>Figura 1.8. Etapas del proceso de metástasis en melanoma</i>	23
<i>Figura 1.9. Regla ABCDE para el diagnóstico de melanoma maligno cutáneo</i>	25
<i>Figura 1.10. Datos epidemiológicos de la incidencia del cáncer de mama.</i>	35
<i>Figura 1.11. Proceso de metástasis en el cáncer de mama</i>	49
<i>Figura 1.12. Esquema de las partes de la estructura química del ácido fólico.</i>	54
<i>Figura 1.13. Reducción del folato a tetrahidrofolato catalizada por la DHFR</i>	55
<i>Figura 1.14. Esquema del ciclo catalítico para la reducción del DHFR a THF catalizada por la ecDHFR</i>	56
<i>Figura 1.15. Estructura tridimensional de la ecDHFR formando el complejo ternario con folato y NADP+</i>	58
<i>Figura 1.16. Estructura tridimensional de la ecDHFR en su conformación ocluida (izquierda) y cerrada (derecha)</i>	59
<i>Figura 1.17. Esquema que indica los cambios conformacionales en la estructura tridimensional de la DHFR durante el ciclo catalítico.</i>	60
<i>Figura 1.18. Reacciones metabólicas que implican la síntesis, interconversión y utilización de aductos de un carbono del THF.</i>	62
<i>Figura 1.19. Utilización de las coenzimas del THF para la síntesis de ADN y su relación con el ciclo de la metionina.</i>	63
<i>Figura 1.20. Tipos de antifolatos. Clásicos (AMP y MTX) y no clásicos (TMP y PYR).</i>	64
<i>Figura 1.21. Superposición de la molécula de MTX y de ácido fólico en el centro activo de la ecDHFR</i>	67
<i>Figura 1.22. Tipos de endocitosis. Fagocitosis, pinocitosis y endocitosis mediada por receptores.</i>	71

Figura 1.23. Modelo de pinocitosis propuesto para el transporte de folatos a través del FRα.	71
Figura 1.24. Modelo de transporte endosomal de folatos a través del FRα asociado a moléculas de clatrina.	72
Figura 1.25. Planta del té y tipos de té (verde, blanco, rojo, negro y oolong).	78
Figura 1.26. Composición del té.	79
Figura 1.27. Compuestos no flavonoides de té.	81
Figura 1.28. Compuestos flavonoides de té. Flavanoles (catequinas: C, EC, GC y EGC).	82
Figura 1.29. Compuestos flavonoides de té. Flavanoles (ésteres gálicos de las catequinas: CG, ECG, GCG y EGCG).	83
Figura 1.30. Compuestos flavonoides de té. Procianidina tipo B con enlace C4-C8 y procianidina tipo A.	84
Figura 1.31. Compuestos flavonoides de té. Antocianos (cianidina y delphinidina). Flavanonas (naringenina). Flavonas (apigenina y luteolina). Flavanoles (quercetina).	86
Figura 1.32. Compuestos flavonoides de té. Estructura de las teaflavinas.	87
Figura 1.33. Efecto de ECG en la morfología celular de <i>Staphylococcus aureus</i>.	89
Figura 1.34. Bloqueo de la formación de hifas de <i>Candida albicans</i> por EGCG.	90
Figura 1.35. Efecto del tratamiento de adipocitos con EGCG durante 6 días.	92
Figura 1.36. Efecto de la administración intraperitoneal de EGCG en ratas obesas Zucker.	92
Figura 1.37. Efecto <i>in vivo</i> del EGCG sobre la hipertrofia del tejido muscular cardíaco inducida por hipertensión.	93
Figura 1.38. Secciones de piel de ratón modelo de psoriasis (fsn/fsn) teñidas con HE.	95
Figura 1.39. Análisis inmunohistoquímico de neuronas tiroxina hidrolasa (TH) positivas de la sustancia negra de ratones modelo con enfermedad de Parkinson.	96
Figura 1.40. Comparación estructural del EGCG con el ácido fólico y dos inhibidores de la DHFR (MTX y TQD).	100
Figura 1.41. Modelo molecular de EGCG en el sitio de unión de folato de DHFR humana.	102
Figura 1.42. Efecto del EGCG en células modelo del epitelio intestinal.	103
Figura 1.43. Diagrama de la familia de las integrinas y diferentes motivos de inhibidores identificados en las desintegrina.	108
Figura 3.1. Cabina flujo laminar, incubador de CO₂ y depósito de nitrógeno líquido.	193
Figura 3.2. La curva de crecimiento indicando las distintas fases.	194
Figura 3.3. Imagen y esquema de la cámara de KOVA.	204
Figura 3.4. Imagen y esquema de la cámara de Neubauer.	205
Figura 3.5. Diferentes componentes de un contador de células automático.	206

Figura 3.6. Esquema de los ensayos de viabilidad con MTT, junto al lector de placas FLUOstar Omega.	207
Figura 3.7. Esquema de los ensayos de viabilidad con XTT, junto al lector de placas FLUOstar Omega.	208
Figura 3.8. Esquema del funcionamiento del kit de detección de apoptosis PE Annexin-V.....	210
Figura 3.9. Esquema del funcionamiento del kit de detección de apoptosis mediante ELISA de Roche.	212
Figura 3.10. Diferentes tipos de microscopios invertidos.....	218
Figura 3.11. Microscopio confocal Leica TCS-SP2.	221
Figura 3.12. El dispositivo de la electroforesis.	226
Figura 3.13. Componentes del sistema Mini Protean 3 de Bio-Rad y el Esquema de su montaje.....	226
Figura 3.14. Componentes del sistema Mini Protean 3 de Bio-Rad Laboratories.....	231
Figura 3.15. Esquema del ensayo de la inmunoprecipitación.....	234

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1.1. Caractéristiques des tumeurs solides.</i>	120
<i>Figure 1.2. Schéma du cycle cellulaire.</i>	122
<i>Figure 1.3. La régulation de la longueur du télomère.</i>	124
<i>Figure 1.4. Etapes de l'évolution du mélanome cutané malin.</i>	128
<i>Figure 1.5. Les données épidémiologiques sur l'incidence du mélanome.</i>	130
<i>Figure 1.6. Le codage génomique et le mécanisme d'action des gènes suppresseurs de tumeurs p16INK4a et p14ARF.</i>	133
<i>Figure 1.7. Les voies de signalisation RAS / RAF.</i>	135
<i>Figure 1.8. La voie Wnt/β-caténine.</i>	136
<i>Figure 1.9. La voie TGF-β dépendante des protéines Smads.</i>	138
<i>Figure 1.10. La voie des MAP Kinases.</i>	139
<i>Figure 1.11. La voie PI3K/AKT.</i>	142
<i>Figure 1.12. Voie de l'AMPc et MITF.</i>	143
<i>Figure 1.13. La voie JAKs/STAT3.</i>	145
<i>Figure 1.14. La voie NF-κB.</i>	146
<i>Figure 15. La voie p53.</i>	148
<i>Figure 1.16. Le contrôle du cycle cellulaire.</i>	149
<i>Figure 1.17. Mécanisme du déclenchement de l'apoptose caspase-dépendante.</i>	151
<i>Figure 1.18. Etapes du processus de formation de métastases dans le mélanome.</i>	154
<i>Figure 1.19. Les constituants de la matrice extracellulaire.</i>	156
<i>Figure 1.20. Représentation de la famille des intégrines.</i>	158
<i>Figure 1.21. Intégrines et voies de signalisation intracellulaires.</i>	160
<i>Figure 1.22. Règle ABCDE pour le diagnostic du mélanome malin cutané.</i>	163
<i>Figure 1.23. Macrovipera lebetina.</i>	171
<i>Figure 1.24. Diagramme de la famille des intégrines et les différents motifs inhibiteurs correspondants identifiés dans les désintégrines.</i>	174
<i>Figure 3.1. Les équipements nécessaires dans une pièce de culture cellulaire.</i>	255
<i>Figure 3.2. Les courbes de croissance indiquant les différentes phases de la prolifération cellulaire.</i>	256
<i>Figure 3.3. Schéma de la cellule de KOVA</i>	256
<i>Figure 3.4. Schéma de la cellule de Neubauer</i>	267
<i>Figure 3.5. Les différentes composantes d'un compteur automatique.</i>	268

Figure 3.6. Schéma du test de viabilité avec le MTT, avec le lecteur de plaques FLUOstar Omega.....	269
Figure 3.7. Schéma du test de viabilité avec le XTT, avec le lecteur de plaques FLUOstar Omega.....	270
Figure 3.8. Schéma du principe du kit de la détection d'apoptose PE Annexin-V.	271
Figure 3.9. Schéma du principe du kit de détection de l'apoptose par le test d'ELISA de Roche.	273
Figure 3.10. Microscopes inversés	278
Figure 3.11. Microscope confocal Leica TCS-SP2	281
Figure 3.12. Schéma du dispositif d'électrophorèse.	285
Figure 3.13. Schéma des composantes du système Mini Protean 3 (Bio-Rad) et du montage du dispositif d'électrophorèse.	286
Figure 3.14. Composantes du Dispositif de transfert (système Mini Protean 3 de Bio-Rad).	289

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1.1. Tipos de cáncer de mama</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 1.2. Efecto de las catequinas del té sobre distintos tipos de cáncer.....</i>	<i>98</i>
<i>Tabla 1.3. Los efectos de diversas desintegrinas purificadas a partir de venenos de serpientes en varias líneas tumorales</i>	<i>110</i>
<i>Tabla 1.4. Efectos de diversas lectinas de tipo C purificadas de venenos de serpientes, en varias líneas tumorales.</i>	<i>114</i>

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1.1. Les effets de diverses différentes désintégrines, purifiées de venins de serpents, sur plusieurs lignées tumorales.....</i>	<i>176</i>
<i>Tableau 1.2. Les effets de différentes lectines de type C purifiées à partir de venins de serpents sur l'agrégation plaquettaire.....</i>	<i>180</i>

PREÁMBULO

El cáncer es un problema de salud pública a escala mundial, pues así lo demuestran sus altas tasas de incidencia y mortalidad. Por lo tanto, el descubrimiento de nuevas moléculas o terapias para evitar su progresión y aumentar la calidad y esperanza de vida de los pacientes con cáncer en un objetivo altamente deseado. Los tratamientos de quimioterapia convencionales contra el cáncer han mostrado importantes limitaciones, por lo que es de interés el diseño de nuevas estrategias para el tratamiento de esta patología. El ataque metabólico y la señalización celular con la utilización de compuestos naturales derivados de plantas, venenos de serpiente, derivados sintéticos de éstos o combinaciones de fármacos, que afecten mayoritariamente a las células tumorales, supone una interesante perspectiva en el tratamiento de cánceres epiteliales, como el cáncer de mama y el melanoma.

Recientemente, varias líneas de investigación han demostrado que la combinación de las catequinas naturales del té verde con quimioterapias tradicionales, que afectan a la señalización celular mediada por hormonas, o con terapias biológicas, más modernas, que bloquean a los receptores de las tirosinas quinasa, puede ser efectiva contra el cáncer de mama. Sin embargo, las catequinas del té presentan varias limitaciones terapéuticas relacionadas con su baja estabilidad y su limitado transporte celular, lo que afecta a su biodisponibilidad. Con el fin de evitar estos problemas, recientemente, hemos sintetizado en nuestro laboratorio derivados de las catequinas del té más estables y biodisponibles. De todos ellos, la 3-O-3,4,5-trimetoxibenzoil(-)-catequina (TMECG) mostró una alta capacidad anti-proliferativa sobre células de cáncer de mama en cultivo que expresaban el receptor de estrógenos (ER+) o que no lo expresaban (ER-). Estudios preliminares han demostrado que el TMECG inhibía con una alta potencia y especificidad a la dihidrofolato reductasa (DHFR) humana y, por lo tanto, podría actuar como un antifolato, bloqueando el metabolismo del ácido fólico en estas células tumorales.

Es conocido que el melanoma es uno de los cánceres epiteliales cuya incidencia ha aumentado en los últimos 30 años (Siegel et al, 2012). De acuerdo con la Organización Mundial del Salud (OMS), aproximadamente 3 millones de cánceres de piel no melanoma y 132.000 melanomas malignos se producen cada año (Gray-Schopfer et al., 2007). El melanoma tiene un gran potencial metastásico siendo muy resistentes a las terapias actuales, lo que se traduce en un mal pronóstico para los pacientes que no responden a la quimioterapia convencional (Jiang et al, 2009; Ascierto et al, 2010). Por lo tanto, el uso de otras estrategias

terapéuticas para superar esta resistencia o aumentar la efectividad de los tratamientos convencionales es, por lo tanto, una prioridad y un desafío importante de la oncología. En este contexto, la identificación de biomoléculas activas contra el melanoma a partir de fuentes naturales podría ayudar a desarrollar nuevas terapias y combinaciones de fármacos para mejorar la eficiencia y la respuesta al tratamiento. Estas nuevas moléculas podrían ser muy efectivas, especialmente en el caso de tumores que han perdido su quimiosensibilidad y se han vuelto refractarios al tratamiento. La identificación de los mecanismos moleculares responsables de la resistencia a la quimioterapia es importante para el tratamiento y la supervivencia de los pacientes con melanoma. Comprender estos mecanismos permitiría la identificación de marcadores predictivos y dianas terapéuticas de interés. En el desarrollo de esta Tesis nos concentramos, principalmente, en la valorización del potencial antitumoral de dos proteínas purificadas a partir del veneno de la víbora tunecina *Macrovipera lebetina* sobre células tumorales de melanoma con el fin de identificar nuevos agentes terapéuticos eficaces.

Este trabajo se realizó como parte de una tesis bajo supervisión conjunta entre el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Murcia/Facultad de Biología en España y el Laboratorio de Epidemiología Molecular y Patología Experimental Aplicadas a las enfermedades infecciosas (LR11IPT04) en el Instituto Pasteur en Túnez.

AVANT-PROPOS

Le mélanome est parmi les cancers épithéliaux dont l'incidence a augmenté au cours des 30 dernières années (Siegel *et al.*, 2012). Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), approximativement 3 millions de cancers cutanés non mélanocytaires et 132 000 mélanomes malins surviennent chaque année (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Le mélanome a un potentiel métastatique le rendant très résistant aux thérapies actuelles d'où un pronostic sombre pour les patients qui ne répondent pas à la chimiothérapie conventionnelle (Jiang *et al.*, 2009 ; Ascierto *et al.*, 2010). Ainsi, le recours à d'autres stratégies thérapeutiques pour pallier à cette résistance ou pour augmenter l'efficacité des traitements conventionnels représente donc une priorité et un enjeu de taille en oncologie.

En oncologie, un nombre important de médicaments commercialisés a été obtenu à partir de sources naturelles, soit par modification structurale des composés naturels ou par la synthèse de nouveaux composés, conçus à la suite d'un composé naturel comme modèle. La recherche pour améliorer des agents cytotoxiques continue d'être une importante ligne dans la découverte de médicaments anti-cancéreux plus efficaces.

Dans ce contexte, l'identification de biomolécules actives à partir de sources naturelles et de nouveaux effecteurs cellulaires susceptibles de ciblage de médicaments dans le mélanome pourrait aider à développer de nouvelles thérapies et des combinaisons de médicaments afin d'améliorer l'efficacité et la réponse au traitement. Ces nouvelles molécules pourraient être très efficaces surtout dans le cas de tumeurs qui ont perdu leur chimiosensibilité et sont devenues réfractaires au traitement. L'identification des mécanismes moléculaires responsables de la résistance à la chimiothérapie est importante pour le traitement et la survie des patients atteints d'un mélanome. La compréhension de ces mécanismes permettrait l'identification de marqueurs prédictifs et de cibles thérapeutiques intéressantes.

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une thèse en cotutelle entre le Laboratoire d'Epidémiologie moléculaire et Pathologie Expérimentale Appliquée aux maladies infectieuses (LR11IPT04) à l'Institut Pasteur de Tunis et le département de Biochimie et Biologie moléculaire à l'Université de Murcie/Faculté de Biologie en Espagne.

Nous nous sommes essentiellement focalisés sur la valorisation du potentiel anti-tumoral de deux protéines purifiées à partir du venin de la vipère Tunisienne *Macrovipera lebetina* sur des

cellules tumorales issues d'un mélanome dans le but d'identifier de nouveaux agents thérapeutiques efficaces et non toxiques.

CAPÍTULO 1



INTRODUCCIÓN GENERAL

*Según vamos adquiriendo
conocimiento, las cosas no se hacen
más comprensibles, sino más misteriosas.*

Albert Schweitzer

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER

1.1.1. CONCEPTOS GENERALES DEL CÁNCER

La palabra cáncer se utiliza para describir un complejo y heterogéneo grupo de estados patológicos en el que las células proliferan desmesuradamente e invaden tejidos vecinos. El cáncer es una enfermedad de carácter genético, que se produce al ser eliminadas las restricciones que limitan la división celular en células de tejidos ya diferenciados. En la mayoría de los casos es una enfermedad adquirida y con frecuencia de carácter irreversible. Existen numerosos estudios que correlacionan la incidencia de determinados cánceres con el estilo de vida, los hábitos, dietas, profesiones, lugar geográfico, etc. Se ha encontrado, por ejemplo, una relación importante entre leucemias mieloides y radiólogos expuestos a dosis elevadas de rayos X; entre cánceres de pulmón y el hábito de fumar; entre cánceres de piel y pescadores o marinos con prolongados periodos de tiempo expuestos a las radiaciones ultravioletas solares, etc. La incidencia del cáncer aumenta con la edad, lo que indica que existe un factor acumulativo de causas, responsable de que un único evento no sea suficiente para desencadenar, de modo inmediato, un cáncer. Debido al envejecimiento de la población, el cáncer ha pasado de ser una enfermedad testimonial a principios del siglo XX hasta alcanzar una gran incidencia en la actualidad.

A nivel celular, como consecuencia de uno o varios cambios en el ADN, se produce una alteración de carácter permanente que afecta de modo irreversible las constricciones que normalmente impiden la división celular. El cáncer constituye el crecimiento descontrolado de un grupo de células dentro de un tejido, iniciándose así la producción de una masa celular diferenciable del resto, denominada tumor. Este tumor, en el mejor de los casos, estará constituido por un conjunto de células no invasoras que permanecen encapsuladas en el lugar anatómico donde se han originado denominándose entonces tumor de carácter benigno. Por el contrario, si al crecimiento y proliferación incontrolada hay que sumarle la facultad de invasión a otros tejidos produciéndose metástasis, el tumor tendrá carácter maligno. Metástasis es un tumor secundario originado por la diseminación de células cancerosas procedentes de un tumor primario. Las metástasis pueden encontrarse físicamente muy alejadas del tumor primario al haber podido ser transportadas las células tumorales a través del torrente circulatorio. Neoplasia, otra forma de denominar el cáncer, significa literalmente

“nuevas proliferaciones” y éstas pueden iniciarse a partir de células normales en cualquier tejido sano. Hay, por tanto, gran cantidad de tumores respecto al origen y a la malignidad.

1.1.2. CAUSAS DEL CÁNCER

En general, las células cancerosas presentan defectos en los circuitos reguladores que controlan la proliferación celular y homeostasis. Los diferentes genotipos de células cancerosas se presentan como manifestaciones de seis alteraciones de la fisiología celular que en conjunto dictan el crecimiento maligno: autosuficiencia de las señales de crecimiento, insensibilidad a señales de inhibición del crecimiento, evasión de muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis e invasión de tejidos y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000) (**Figura 1.1**).

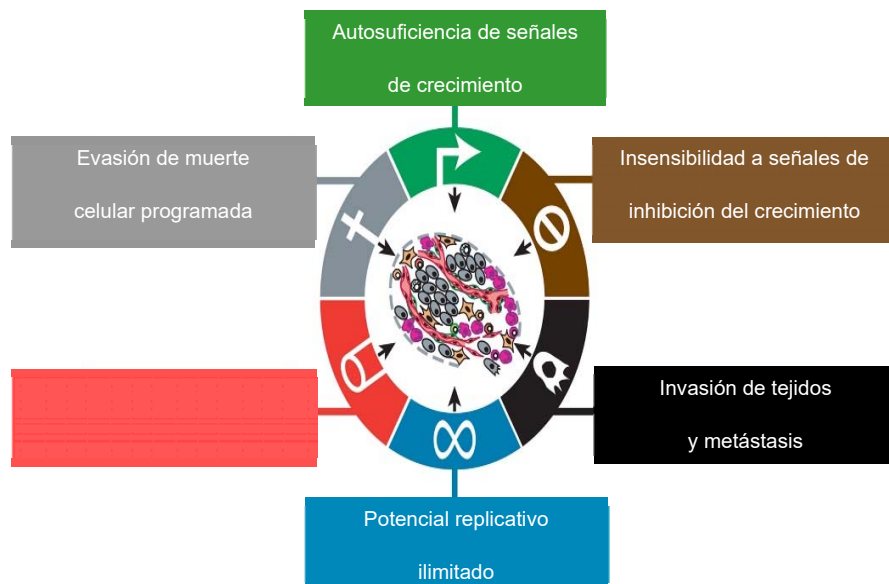


Figura 1.1. Capacidades adquiridas por las células cancerígenas durante el desarrollo tumoral.

Cada uno de estos cambios fisiológicos adquiridos durante el desarrollo tumoral representa la ruptura de las defensas anti-cáncer de células y tejidos. Estas nuevas capacidades son compartidas por la mayoría de los tumores humanos. Junto con estas seis capacidades existen dos características cruciales que permiten la adquisición de estas capacidades (Hanahan y Weinberg, 2011). La primera es la inestabilidad genómica y la mutación, las cuales generan la diversidad génica que acelera la adquisición de estas capacidades, ya que dota a las células cancerígenas de las alteraciones genéticas que conducen a la progresión tumoral. Y la

segunda característica es la inflamación, la cual promueve muchas de estas capacidades debido a que la respuesta inflamatoria asociada a un tumor produce el efecto paradójico de promover de progresión tumoral, ayudando a neoplasias incipientes a adquirir algunas de estas capacidades. Recientemente, varias investigaciones sugieren que existirían dos capacidades adicionales que se adquieren durante el desarrollo de un cáncer y que estarían implicadas en la patogénesis de algunos o quizás todos los cánceres. Una tiene que ver con la capacidad de modificar o reprogramar el metabolismo celular para poder soportar de forma efectiva la proliferación neoplásica. La otra permitiría a las células cancerígenas evadir la respuesta inmunológica, en particular por los linfocitos T y B, macrófagos y las células NK (*natural killers*). Debido a que estas dos capacidades todavía no han sido completamente generalizadas y validadas, se consideran como capacidades emergentes que deberán ser tenidas en cuenta en futuras investigaciones (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.1.2.1 Autosuficiencia de las señales de crecimiento

Las células normales necesitan de señales de crecimiento para que puedan avanzar desde un estado latente a un estado de proliferación activa. Estas señales se transmiten al interior de la célula a través de receptores de membrana que se unen a diferentes clases de señales como: factores de crecimiento que difunden, componentes de la matriz extracelular y moléculas de interacción y adhesión celular. Se sabe que las células normales no son capaces de proliferar en ausencia de estas señales estimuladoras.

La mayoría de los oncogenes (genes cuya alteración produce o contribuye al cáncer) actúan mimetizando las señales de crecimiento normales de una forma u otra. La dependencia de las señales de crecimiento queda patente en los cultivos celulares normales, los cuales solamente son capaces de proliferar si son suplementados con factores mitogénicos, comportamiento que contrasta con los cultivos de células tumorales, que presentan un crecimiento invariable con independencia de las señales de crecimiento exógenas. La conclusión es que las células tumorales generan la mayor parte de sus señales de crecimiento, reduciendo, de esta forma, su dependencia de la estimulación del ambiente tisular que las rodea. Esta autonomía de las señales de crecimiento se puede conseguir de diferentes modos, entre otros, generando sus propios factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante α (TGF α), generados por glioblastomas y sarcomas, respectivamente (Fedi *et al.*, 1997). Otro mecanismo consiste en la sobreexpresión de receptores que permite una hipersensibilidad a niveles de señales de crecimiento que no inducen la proliferación en células normales, así, el receptor del factor de crecimiento

epidérmico (EGF-R/*erbB*), se encuentra sobreexpresado en tumores de estómago, cerebro, y mama (Fedi *et al.*, 1997), mientras que el receptor HER2/*neu* está sobreexpresado en carcinoma de estómago y mama (Slamon *et al.*, 1987; Yarden y Ullrich, 1988).

1.1.2.2 Insensibilidad a señales que inhiben el crecimiento

Existen múltiples señales antiproliferativas que operan en un tejido normal manteniendo la homeostasis del tejido y el estado de latencia de las células; estas señales incluyen tanto inhibidores del crecimiento solubles como inhibidores inmovilizados embebidos en la matriz extracelular o en la superficie de células cercanas. Estas señales inhibitoras del crecimiento, al igual que sus complementarios positivos anteriormente descritos, son reconocidas por receptores celulares transmembrana acoplados a rutas de señalización intracelular. Las señales anticrecimiento bloquean la proliferación celular de dos formas: arretando a las células en la fase G0 del ciclo celular, del cual podrán salir en futuras ocasiones cuando las señales celulares lo permitan, o bloqueando de forma permanente su potencial proliferativo, entrando la célula en estado postmitótico, normalmente asociado con la adquisición de rasgos característicos de diferenciación celular. Las células cancerosas incipientes deben evadir estas señales antiproliferativas si quieren prosperar. Gran parte de la razón por la que las células normales responden a las señales inhibitoras del crecimiento está asociada con el llamado reloj del ciclo celular (**Figura 1.2**), y más específicamente con los componentes que gobiernan el paso de la célula en la fase G1. Las células registran su ambiente durante este periodo y, en base a las señales recibidas, deciden si proliferar o no, entrando en estado postmitótico o quiescente. A nivel molecular muchas o tal vez todas las señales antiproliferativas, pasan por la proteína de retinoblastoma (Rb) y la proteína p53.

Así, Rb en estado hipofosforilado bloquea la proliferación celular, alterando y secuestrando la función del factor de transcripción E2F, que controla a su vez la expresión de un número de genes esenciales para la progresión desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Weinberg, 1995). La ruptura del ciclo de Rb puede lograrse de diferentes modos en distintos tipos de tumores humanos. En algunos casos se reduce la expresión de los receptores de las señales de inhibición, mientras que otros presentan receptores con mutaciones no funcionales (Fynan y Reiss, 1993; Markowitz *et al.*, 1995). De forma alternativa, en algunos tumores inducidos por virus, sobre todo en el caso de carcinomas cervicales, la función de Rb es eliminada a través de oncoproteínas virales como la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano (Dyson *et al.*, 1989). Incluso, las células tumorales pueden inhibir la expresión de integrinas y otras

moléculas de adhesión celular que mandan señales de parada del crecimiento favoreciendo en cambio aquellas que incrementan el crecimiento.

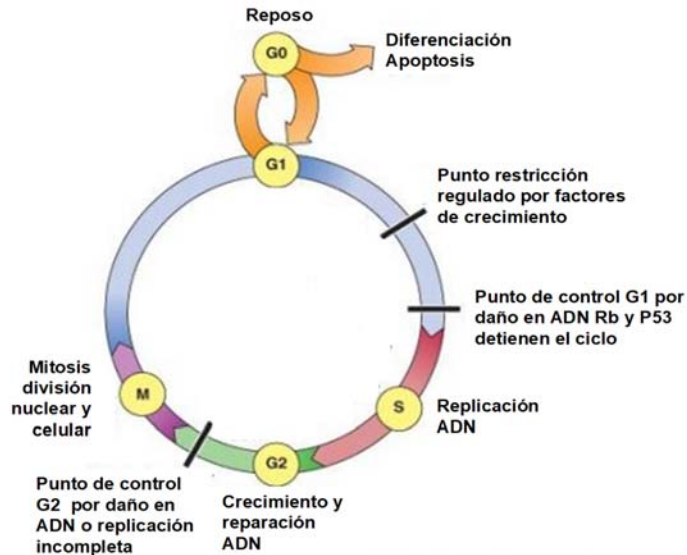


Figura 1.2. Esquema del ciclo celular.

Se muestran las distintas fases del ciclo celular G0, G1, S, G2 y M y los principales puntos de control que evaden las células tumorales.

1.1.2.3 Evasión de la muerte programada

La capacidad de las poblaciones de células tumorales de expandirse está determinada, no sólo por su alta tasa de proliferación sino también por su baja tasa de destrucción. La muerte celular programada o apoptosis representa la principal fuente de desgaste de las poblaciones celulares. Varios estudios de tumores, en ratones y cultivos celulares, han puesto de manifiesto un fenómeno de resistencia de estas células a la apoptosis. Las observaciones acumuladas durante los últimos años, indican que el programa de apoptosis se encuentra presente en todas las células del cuerpo humano. Una vez puesto en marcha, por diferentes señales fisiológicas, este programa es culminado siguiendo una serie de pasos perfectamente coordinados. Las membranas celulares se rompen, el esqueleto citosólico y nuclear se desorganiza, el citosol se comprime, los cromosomas se degradan y el núcleo se fragmenta. Finalmente, las células se rompen en corpúsculos que son engullidos por otras células del tejido, desapareciendo. La posibilidad de que la apoptosis supusiera una barrera para el cáncer fue propuesta por primera vez en 1972, cuando Kerr y colaboradores describieron un fenómeno de apoptosis masiva en poblaciones de células tumorales dependientes de hormonas; así, cuando las hormonas eran retiradas del medio de cultivo, las células mostraron

claros signos de apoptosis (Kerr *et al.*, 1972). Estos datos, junto con otras muchas observaciones, indican que alterando los componentes de la maquinaria apoptótica, se puede afectar de forma dramática a la progresión del tumor y, también, que esta ruta es la que se inactiva en las células durante el desarrollo del tumor. La resistencia a la apoptosis puede ser adquirida en las células cancerosas mediante diferentes estrategias. La más conocida es a través de la pérdida, mediante mutaciones, del p53, un regulador proapoptótico o gen supresor de tumores. Se ha observado, que la inactivación funcional de esta proteína sucede en más del 50% de cánceres humanos y resulta en la eliminación de un componente clave que actúa como sensor del daño en el ADN, el cual induce la cascada de apoptosis (Harris, 1996). El gen p53, denominado el “*policía del ciclo celular*”, es un gen supresor de tumores y es uno de los que con mayor frecuencia se encuentra alterado en todos los tipos de cánceres humanos. Alternativamente, los tumores también consiguen una evasión de la apoptosis incrementando la expresión de reguladores antiapoptóticos (Bcl-2), disminuyendo la expresión de factores proapoptóticos (Bax, Bim, Puma) o bloqueando la ruta de muerte extrínseca (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.1.2.4 Potencial replicativo ilimitado

En todas las capacidades adquiridas por las células tumorales descritas hasta ahora se produce un desacoplamiento del crecimiento celular y las señales ambientales. En principio, el programa de proliferación descontrolada podría ser suficiente para generar las grandes poblaciones celulares que componen un tumor macroscópico. Sin embargo, las investigaciones realizadas en los últimos 30-40 años indican que la pérdida de señalización celular, por si sola, no asegura la expansión del crecimiento tumoral. La gran mayoría de las células de mamíferos contienen de forma intrínseca un programa celular autónomo que limita su multiplicación. Este programa opera independientemente de las rutas de señales célula-célula descritas anteriormente. Este programa debe ser evitado con el fin de que las células puedan clonarse y expandirse hasta el tamaño que constituye un tumor macroscópico. Trabajos con cultivos celulares, han demostrado que las células en cultivo pueden dividirse un número determinado de veces y, que una vez sobrepasado, dejan de crecer, proceso que ha sido denominado como senescencia (Hayflick, 1997). Esta senescencia se puede superar mediante la inactivación de las proteínas supresoras de tumores Rb y p53, pudiendo las células seguir dividiéndose algunas generaciones adicionales hasta que entran en una segunda fase denominada crisis.

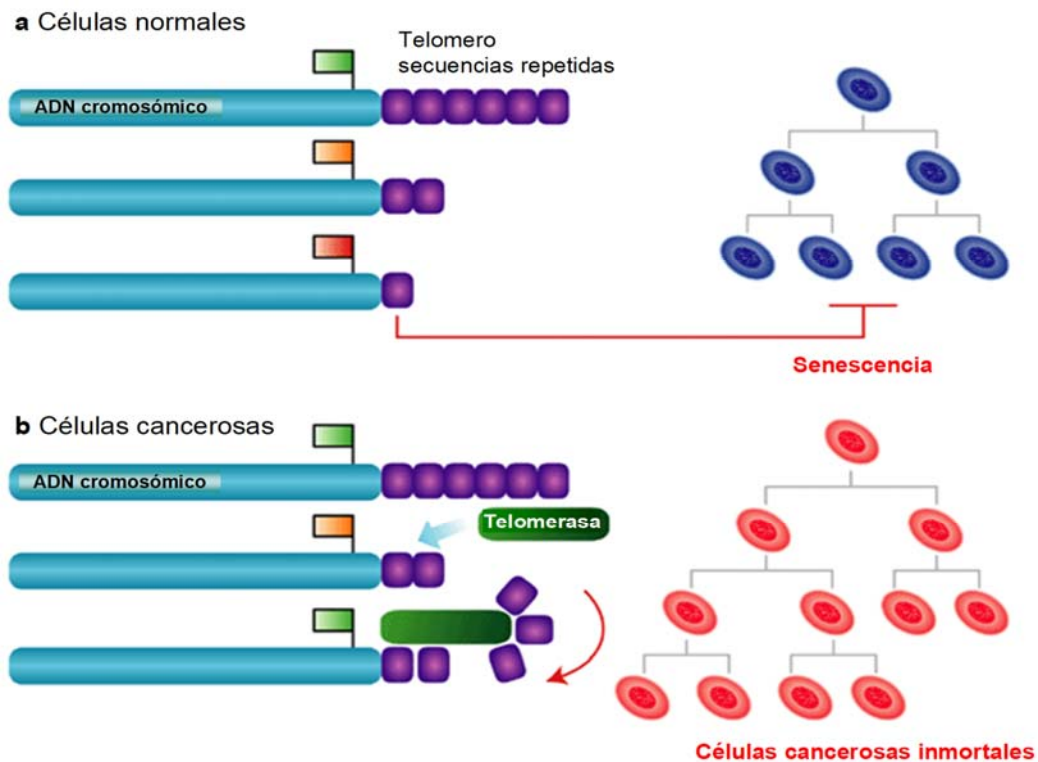


Figura 1.3. Regulación de la longitud de los telómeros en células normales y cancerosas por la enzima telomerasa.

Esta fase se caracteriza por una muerte celular masiva, un desorden del cariotipo, asociado a fusión de cromosomas y, de forma ocasional, aparece una variante celular (1 de cada 10^7) que adquiere la capacidad de multiplicarse sin límites, característica conocida como inmortalidad (Wright *et al.*, 1989). Este mecanismo de cuenta atrás del número de divisiones ha sido estudiado durante los últimos 15 años y consiste en que al final de los cromosomas, la porción denominada telómero, la cual está compuesta por varios miles de repeticiones de secuencias cortas de 6 pares de bases, se va acortando cada nueva división en 50-100 pares de bases. Este progresivo acortamiento se atribuye a la incapacidad de la polimerasa del ADN de replicar completamente el extremo terminal 3' del ADN cromosómico durante la fase S del ciclo celular. La erosión progresiva de los telómeros, tras varios ciclos de replicación, causa de forma eventual la pérdida de la capacidad de proteger los extremos de los cromosomas que participan en la fusión de estos durante la etapa de crisis, lo que resulta en la muerte de las células afectadas. El mantenimiento de los telómeros es evidente en las células malignas

(Shay y Bachetti, 1997). La mayor parte de las veces lo consiguen mediante la sobreexpresión de la enzima telomerasa que añade repeticiones de hexanucleótidos al final del ADN telomérico (Bryan y Cech, 1999). De esta forma, los telómeros mantienen su longitud superior al umbral crítico lo que les permite una multiplicación ilimitada a sus células descendientes (**Figura 1.3**).

1.1.2.5 Angiogénesis

El oxígeno y los nutrientes aportados por la vascularización son cruciales para la función celular y la supervivencia, por lo que todas las células de un tejido deben residir en un radio de 100 μm de un capilar sanguíneo. Durante la organogénesis, esta cercanía está asegurada debido al crecimiento coordinado de vasos sanguíneos y parénquima. Una vez que el tejido está formado, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) es transitorio y está regulado cuidadosamente. Debido a esta dependencia de la cercanía a los vasos sanguíneos parece plausible que las células en proliferación en los tejidos tengan la capacidad de fomentar el crecimiento de vasos sanguíneos. Las células con lesiones proliferativas aberrantes, inicialmente, carecen de la capacidad de angiogénesis, limitando su posibilidad de expansión. De forma que, para poder progresar a un tamaño mayor, las neoplasias deben desarrollar la angiogénesis (Bouck *et al.*, 1996; Folkman, 1997; Hanahan y Folkman, 1996). El balance entre las señales positivas o negativas es lo que hace que se fomente o se bloquee la angiogénesis. Dos de los ejemplos de señales que inician la angiogénesis son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF). Un inhibidor de la angiogénesis es la trombospondina 1 (TSP1), sin embargo, se conocen más de dos docenas de factores inductores de la angiogénesis y un número similar de proteínas inhibitoras endógenas. La señalización por integrinas también contribuye a este balance para regular la angiogénesis. Muchos tumores presentan un aumento de la expresión de VEGF y/o FGF comparados con los tejidos normales y en otros la expresión de inhibidores endógenos está disminuida (Singh *et al.*, 1995; Volpert *et al.*, 1997). El papel esencial de la angiogénesis está también avalado por experiencias que muestran que el tratamiento con compuestos antiangiogénicos producen la reducción del crecimiento de tumores inoculados subcutáneamente en ratones (Folkman, 1997).

1.1.2.6 Invasión y metástasis

Llega un momento durante el desarrollo de la mayor parte de los cánceres humanos que la masa del tumor primario promueve a células pioneras a que se movilicen, invadan tejidos adyacentes y viajen a sitios distantes donde forman nuevas colonias. Estos nuevos asentamientos distantes de células tumorales (metástasis) son la causa del 90% de las muertes por cáncer (Sporn, 1996). La capacidad de invasión y metástasis permite a las células escapar de la masa de tumor primario, colonizando nuevas partes del cuerpo, donde, en principio, el espacio y los nutrientes no suponen un problema limitante. Al igual que la formación del tumor primario, el éxito de la invasión y la metástasis depende de las otras cinco habilidades adquiridas descritas anteriormente. Existen distintas proteínas que se encargan de mantener las células unidas formando un tejido, que se ven alteradas en las células con la capacidad de invadir o metastatizar. Estas proteínas afectadas incluyen moléculas de adhesión célula-célula (CAMs) y las integrinas, que unen las células con la matriz extracelular. La E-cadherina, molécula de interacción célula-célula expresada en células epiteliales es un buen ejemplo, su función se pierde aparentemente en la mayoría de los cánceres epiteliales mediante mecanismos de mutación, represión transcripcional o proteólisis del dominio extracelular (Christofori y Semb, 1999). La sobreexpresión de la E-cadherina en modelos de cáncer, en cultivos de células y en ratones transgénicos, impide la invasión y metástasis, mientras que, experimentos de interferencia de la función de la E-cadherina, muestran un aumento de ambas capacidades (Christofori y Semb, 1999). Por lo tanto, la E-cadherina actúa como un supresor de la invasión y metástasis en cánceres epiteliales y su eliminación representa un papel clave en la adquisición de estas capacidades. Las células tumorales también facilitan la invasión cambiando la expresión de las integrinas hacia aquellas que no se encuentran normalmente en la matriz extracelular y que se unen preferentemente a componentes de degradación del estroma producidos por proteasas extracelulares (Lukashev y Werb, 1998; Varner y Cheresch, 1996), que constituyen otro factor importante en la metástasis (Coussens y Werb, 1996; Chambers y Matrisian, 1997). Los genes de las proteasas están sobreexpresados, los inhibidores de proteasas están inhibidos y los zimógenos inactivos de las proteasas son promovidos a sus formas activas. Las proteasas que degradan la matriz están asociadas a las membranas celulares de forma que pueden invadir estromas cercanos, atravesar las paredes de los vasos sanguíneos y también capas de células epiteliales normales.

1.1.3. CÁNCER DE PIEL MELANOMA

1.1.3.1. Melanoma

El cáncer de piel tiene lugar cuando las células de la capa más externa de la piel llamada epidermis presentan un crecimiento incontrolado. La epidermis tiene tres capas: la capa superior, la capa intermedia de células escamosas y la capa más profunda donde se localizan los melanocitos y las células basales. Los diferentes tipos de cáncer de piel van a afectar a los diferentes tipos de células de la epidermis. El cáncer de piel es uno de los tipos de cáncer más evitables y esto es debido al hecho de que el principal factor de riesgo es la radiación ultravioleta (UV). La exposición a radiación UV depende de factores como la intensidad, el tiempo de exposición y de si la piel se ha protegido o no con ropa o cremas solares. Muchos estudios demuestran que las quemaduras por el sol a edades tempranas incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de piel décadas después, es lo que se denomina efecto memoria de la piel a la radiación solar. El otro factor de riesgo principal es la coloración clara de la piel. El cáncer de piel, por ejemplo, es mucho más común en caucásicos que en afroamericanos y esto se debe al pigmento denominado melanina que protege de la radiación UV, el cual es mucho más abundante en personas de piel oscura. Los individuos de piel clara, que son más sensibles a quemaduras por el sol, presentan un mayor riesgo de desarrollar cáncer de piel, aunque ha de tenerse en cuenta que personas de todas las razas y colores de piel pueden desarrollar este tipo de cáncer. Otras causas de cáncer de piel son: exposiciones prolongadas a agentes químicos como arsénico, alquitrán y lubricantes, radiaciones por tratamientos de otros tipos de cáncer, historial previo de cáncer de piel, historial familiar de cáncer de piel, cicatrices de quemaduras o infecciones de piel previas, algunos tratamientos de psoriasis que incluyen radiación UV, algunas enfermedades de piel como xeroderma pigmentoso, debilidad del sistema inmune, infección por ciertos tipos de virus humanos como el del papiloma y determinados lunares. Existen distintos tipos de cáncer de piel que derivan de las distintas células que se ven afectadas. De una forma general, los carcinomas de piel se pueden dividir en tipo no melanoma y tipo melanoma, dependiendo de si afecta o no a los melanocitos de la piel.

1.1.3.1.1 Cáncer de piel no-melanoma

Existen dos tipos principales de cáncer de piel no melanoma según las células a partir de las cuales se desarrolla:

Cáncer de piel de las células basales o carcinoma basocelular: Deriva de las células basales de la capa más interna de la epidermis. Es la neoplasia maligna más frecuente en humanos y el tipo de cáncer de piel también más frecuente (75%). Es muy raro que se extienda a otras partes del cuerpo, aunque con frecuencia se desarrolla más de un foco simultáneamente. Aunque se asocia con exceso de radiación UV, puede tener un origen multifactorial.

Cáncer de piel de células escamosas, escamocelular o epidermoide: Representa el 20% de los cánceres de piel diagnosticados y es el segundo de los cánceres de piel en frecuencia. El origen celular son los queratinocitos epidérmicos que sufre una transformación maligna debido a las mutaciones inducidas por la radiación UV. Es muy frecuente en personas de piel clara y se cura en el 95% de los casos. De forma ocasional puede extenderse a nódulos linfáticos y otros órganos causando cánceres secundarios.

Otros tipos menos frecuentes: Todos juntos suponen menos del 1% de los cánceres de piel diagnosticados e incluyen al carcinoma de células de Merkel o neuroendocrino, el sarcoma de Kaposi, el linfoma de células T de la piel y el sarcoma.

1.1.3.1.1 Cáncer de piel melanoma

El melanoma se desarrolla por el crecimiento descontrolado de los melanocitos de la piel. Existen también diferentes tipos:

Melanoma de extensión superficial: Es el tipo más común de melanoma (70%). En principio los melanocitos crecen extendiéndose más superficialmente que en profundidad, conocido en clínica como fase de crecimiento radial. Son lunares o manchas que crecen sin penetrar en capas más profundas de la piel.

Melanoma nodular: Tiende a desarrollarse muy rápidamente y suele aparecer en zonas frecuentemente poco expuestas al sol como el torso o la espalda. Son manchas muy coloreadas marrón oscuro o negro que crecen hacia el interior, penetrando en las capas internas de la piel y no tienen por qué desarrollarse a partir de lunares preexistentes.

Melanoma in situ o Lentigo maligno: Suponen el 10% de los melanomas. Es el más frecuente en personas ancianas. Aparece en zonas de la piel que han sido expuestas al sol durante mucho tiempo por lo que es muy frecuente en la cara. También es muy frecuente en

personas que pasan mucho tiempo al aire libre. Este tipo de melanoma crece muy lentamente extendiéndose durante muchos años.

Melanoma lentiginoso acral: Este tipo se encuentra frecuentemente en las palmas de las manos o la planta del pie e incluso bajo las uñas. Es el tipo más frecuente de melanoma en las personas de piel oscura.

Otros tipos de melanoma: El melanoma puede darse en cualquier parte del cuerpo incluyendo órganos internos por lo que se suele referir a melanoma maligno cutáneo a aquel que se desarrolla en la piel. Una zona donde se producen melanomas, aunque raramente, es en el interior del ojo debido a alteraciones en los melanocitos del iris formando puntos oscuros en la coloración de los ojos. También es raro, aunque posible, la aparición de melanomas en vulva, vagina y recto.

1.1.3.2 Evolución del Melanoma

Los melanocitos son células especializadas que se encuentran predominantemente en la piel y en los ojos, donde producen melaninas, pigmentos responsables del color de piel y pelo. Los melanocitos cutáneos se originan a partir de progenitores de la cresta neural que migran a la piel durante el desarrollo embrionario. En la piel los melanocitos residen en la capa basal de la epidermis y en los folículos pilosos, estando su homeostasis regulada por los queratinocitos epidérmicos (Slominski *et al.*, 2004). En respuesta a la radiación UV, los queratinocitos secretan factores que regulan la supervivencia, diferenciación, movilidad y proliferación de los melanocitos, estimulando la producción de melanina. Es por esto que los melanocitos tienen un papel clave en la protección de la piel de los efectos dañinos de la radiación UV y en la prevención del cáncer de piel.

Las mutaciones en genes reguladores del crecimiento, la producción de factores de crecimiento autocrinos y la pérdida de receptores de adhesión permite a los melanocitos escapar de la estrecha regulación de los queratinocitos (Haass *et al.*, 2004). En consecuencia, los melanocitos pueden proliferar y extenderse formando lunares (**Figura 1.4**). La proliferación de los melanocitos puede estar restringida a la epidermis, dermis o solaparse entre ambas (lunares compuestos). Los lunares son generalmente benignos, pero pueden progresar a la fase de crecimiento radial (RGP), una lesión intra-epidérmica que puede invadir localmente la dermis. Los melanocitos RGP, pueden progresar a la fase de crecimiento vertical (VGP), un estado más peligroso en el cual las células tienen potencial metastático con nódulos de células

invadiendo la dermis. Posteriormente, en la fase de melanoma metastático, pueden infiltrarse en los sistemas vascular y linfático pudiendo colonizar otros órganos (**Figura 1.4**). No todos los melanomas pasan a través de cada una de estas fases individuales. RGP o VGP pueden desarrollarse ambas directamente a partir de melanocitos aislados o lunares y ambos pueden progresar directamente a melanoma maligno metastático.

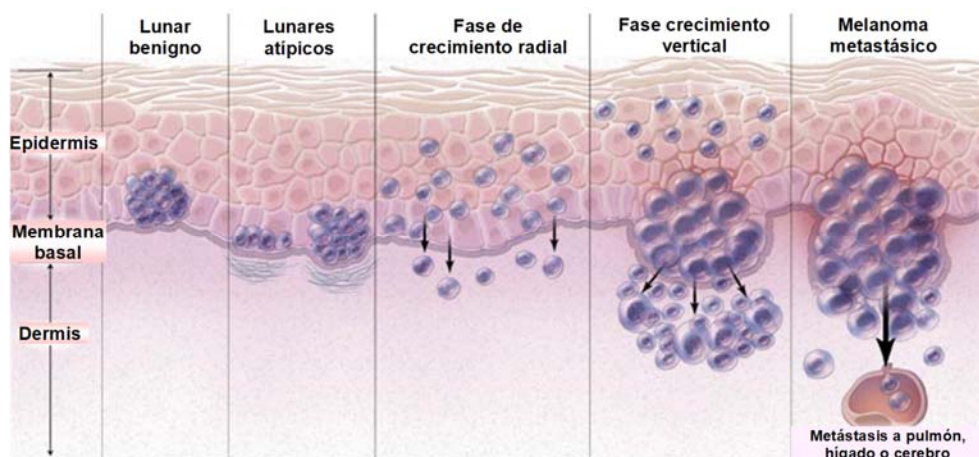


Figura 1.4. Etapas en la evolución del melanoma maligno cutáneo.

1.1.3.3 Epidemiología del melanoma

El melanoma es un tumor que presenta índices epidemiológicos diferentes a cualquier otro tumor. El aumento anual de las tasas de incidencia varía entre el 3 y el 7% en los diferentes países de población de piel caucásica (Diepgen y Mahler, 2002). En Estados Unidos, durante el período comprendido entre 1999-2014, hubo un aumento notable en la incidencia de melanoma en poblaciones caucásicas (CDC, 2017). Con este incremento, se estima que cada 10 o 20 años se duplica la incidencia, por lo que se trata de uno de los tumores malignos que más ha aumentado en la población blanca en los últimos años del siglo XX. Igualmente, es uno de los 10 tumores malignos más frecuentes en el mundo occidental, pero es raro en la mayoría de países de África, Asia y Sudamérica. Las mayores tasas de incidencia se observan en Australia y Nueva Zelanda (más del doble de las más altas de Europa) (Parkin *et al.*, 1997), seguidas de las de América del Norte y Europa del Norte, probablemente debido al fototipo más bajo de la población del Norte de Europa y a la exposición solar intensa a la que se someten en periodos vacacionales (Ródenas *et al.*, 1996).

El melanoma en Australia se ha convertido en el cuarto tumor más frecuente en varones, después del cáncer de próstata, de colon y de pulmón, y el tercero más frecuente en mujeres, tras el de mama y de colon, con lo que se ha convertido en un problema de salud pública. Sin embargo, este aumento en la incidencia de melanoma tanto en Australia como en otros países desarrollados se está produciendo a expensas principalmente de la población mayor de 50 años, mientras que en la población joven está disminuyendo, sobre todo en mujeres. En Europa, se diagnostican aproximadamente 60000 nuevos casos al año, lo que representa el 1% de todos los cánceres. Las cifras de incidencia son ligeramente superiores en mujeres que en varones y cifras aún mayores en el Norte que en el Sur de Europa (Boyle y Smans, 2003; Ferlay *et al.*, 2001). En Europa sigue un claro gradiente norte-sur, de forma que las mayores tasas de incidencia corresponden a los países nórdicos. Por el contrario, son los países de la cuenca mediterránea los que presentan las tasas más bajas, entre ellos España (Garbe y Blue, 2001), aunque también en estos países se ha producido un aumento muy importante de número de melanomas en los últimos años. En países del norte de Europa como Suecia, ha sido muy llamativo el aumento de la incidencia de melanoma desde la década de los setenta hasta el año 2000. No obstante, este aumento ha sido mucho menor en la última década que en años anteriores. Algo similar ha ocurrido en Inglaterra, Escocia o en el Norte de Italia, donde también se observa una progresión ascendente de las tasas de incidencia en los últimos 30 años, pero una disminución importante en la última década.

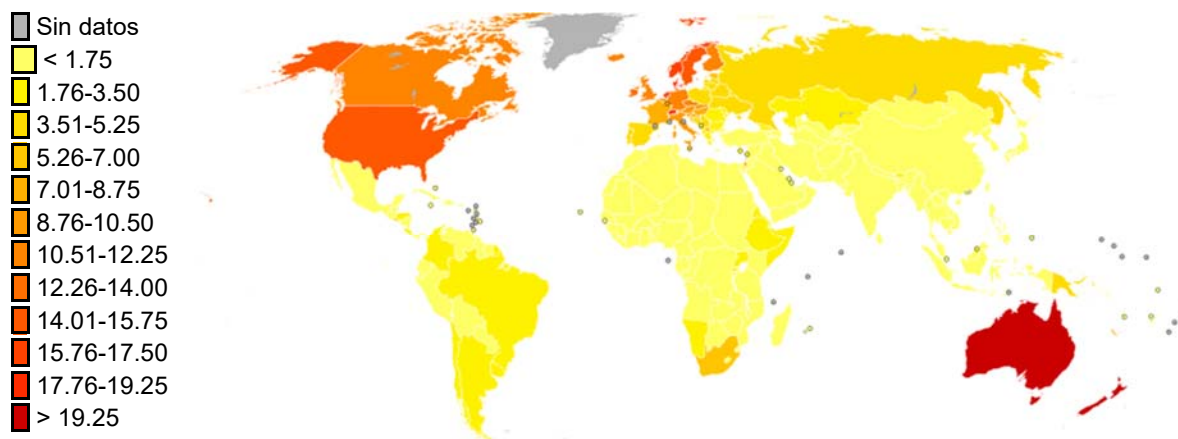


Figura 1.5. Datos epidemiológicos de la incidencia del melanoma. Incidencia del melanoma en 2008 expresado por cada 100000 habitantes para hombres y mujeres en distintas zonas del mundo.

En España, el melanoma no es tan frecuente como en otros países desarrollados; representa el 1.3 y el 2.5 % de los tumores malignos en varones y mujeres (Saenz *et al.*, 2005). Las tasas

más altas de incidencia de melanoma de los registros de cáncer en España son las de Tarragona en varones y las de Gerona en mujeres, mientras que las más bajas corresponden a Canarias en varones y a Zaragoza en mujeres. Estas tasas sitúan a España por debajo de la mayoría de los países de Europa. En nuestro país llama la atención el notable incremento en la incidencia observada en los últimos años, lo que supone que, en 20 años, la tasa de incidencia de melanoma en España se ha multiplicado más de 10 veces.

En Túnez, la incidencia del melanoma cutáneo (MC) se estima en 0.5 cada 100.000 habitantes por año, es decir que es un país con baja incidencia en este tipo de cáncer. En un estudio publicado por Damak et al., 2014, el MC representó solo el 1% de los tumores malignos y el 6% de los cánceres de piel. Esta enfermedad está cada vez más extendida en Túnez y el 10% de melanomas se producen en un contexto familiar definido por la aparición de al menos 2 melanomas o 3 en una generación. En Túnez, los cánceres cutáneos están en creciente evolución debido a la piel clara de una porción de la población, la contaminación y el agotamiento de la capa de ozono que hace que el sol sea aún más dañino.

1.1.3.4 Etiología del melanoma

En el desarrollo de melanoma existen factores genéticos, familiares y ambientales. Los factores familiares y genéticos incluyen el fototipo de piel, el número de nevus melanocíticos, la presencia de nevus atípicos y la historia familiar de cáncer cutáneo. Dentro de los factores ambientales y también relacionados con los factores familiares están la exposición a radiación UV, la disminución de la capa de ozono y enfermedades o tratamientos farmacológicos que generan inmunosupresión. La radiación solar es el factor etiopatogénico más importante en el desarrollo del melanoma maligno. El papel de la radiación UV en el desarrollo del melanoma viene apoyado por diversas observaciones como, por ejemplo, su mayor frecuencia en personas con fototipos de piel clara, especialmente si han emigrado hacia zonas de clima soleado, y también su mayor prevalencia entre aquellas personas que tienen exposiciones solares intermitentes e intensas.

Los factores de riesgo más importantes son la presencia de antecedentes de melanoma familiar, un número elevado de nevus y la historia de melanoma previo. La existencia de casos de melanoma familiar representa un factor de riesgo de desarrollo de melanoma y puede ser debida a diversos factores. Existe un porcentaje de casos en los cuales el melanoma es hereditario y se relaciona con mutaciones del gen *CDKN2A* y menos frecuentemente del gen *CDK4*. La existencia previa de un melanoma es otro factor de riesgo importante, el riesgo

relativo de desarrollar un segundo melanoma es 70 veces superior al de desarrollar un primer melanoma. La existencia de nevus melanocíticos congénitos o de múltiples nevus adquiridos representa también un factor de riesgo importante de desarrollo de melanoma maligno. Las personas que presentan más de 50 nevus melanocíticos comunes tienen un factor de riesgo 3 veces superior al de la población normal y las personas que tienen más de 100 nevus tienen 7.6 veces más riesgo de desarrollar un melanoma. Los nevus melanocíticos congénitos gigantes tienen un riesgo de transformación maligna del 6% al 8% y generalmente desarrollan melanoma antes de los 10 años de edad del paciente. Los nevus melanocíticos congénitos pequeños no parecen presentar un riesgo considerable. La existencia de nevus melanocíticos atípicos es un marcador de riesgo de desarrollar melanoma.

La fotosensibilidad, entendida como la disposición a desarrollar quemaduras solares sin desarrollo de pigmentación, se observa en personas de fototipo claro y está determinada por polimorfismos en el receptor de la melanocortina 1 (MCR1). Se observa en personas de piel clara o pelirroja y la presencia de eumelanina (pigmento marrón) o feomelanina (pigmento rojo o amarillo) viene determinada por variantes del gen receptor de la melanocortina en los melanocitos. La feomelanina puede tener un efecto amplificador del daño mutagénico de la radiación UV, contribuyendo a un aumento del riesgo de cáncer cutáneo en los individuos pelirrojos. Otros factores de riesgo identificados incluyen agentes químicos, físicos e inmunológicos. El desarrollo de melanoma es más frecuente y más agresivo en los pacientes inmunodeprimidos. La causa de la inmunosupresión es variable y puede incluir inmunodeficiencias primarias, linfomas, tratamientos inmunosupresores o la infección por el virus de inmunodeficiencia humana. Las bases genéticas del melanoma son las siguientes:

a. Melanoma familiar: defectos en los genes *CDKN2A* y *CDK4*

Los melanomas familiares sólo representan el 5-10% de todos los casos. El primer gen asociado con esta enfermedad se identificó en estudios genéticos con familias que tenían una predisposición a desarrollar melanoma maligno cutáneo (Hayward, 2003). En este mismo trabajo se identificaron aberraciones citogenéticas y deleciones de marcadores de ADN en el brazo corto del cromosoma 9 en melanomas malignos cutáneos primarios y en líneas celulares de melanomas. En otro estudio se localizó el posible gen supresor tumoral del melanoma en la región 9p21 (Fountain *et al.*, 1992). Posteriormente se realizaron estudios de ligamiento de numerosas familias con incidencia elevada de melanoma y marcadores de la región cromosómica 9p21 y se identificaron mutaciones en el gen *CDKN2A* (p16^{INK4A}) en muchos de los miembros de las familias afectadas, demostrando de este modo su relación (Kamb *et al.*,

1994; Potrony et al., 2015). Este gen codifica la proteína p16^{INK4A} que desempeña un papel muy importante, limitando la progresión del ciclo celular (**Figura 1.6**). Para inhibir la progresión del ciclo celular, la proteína p16^{INK4A} se une a la quinasa CDK4 inactivándola de forma que se altera la fosforilación normal de la proteína Rb, que al encontrarse en forma hipofosforilada no puede liberar los factores de transcripción E2F, por lo que el ciclo celular se detiene en la fase G1. De esta forma, si se pierde la función de p16^{INK4A} por una mutación y/o deleción de *CDKN2A*, se elimina un inhibidor importante de la progresión del ciclo celular y un supresor del desarrollo de tumores. En mucha menor medida se producen casos de mutaciones en el gen de CDK4 de forma que no se produce la unión a p16^{INK4A}, por lo que el resultado final es el mismo, apoyando el hecho de que la interacción entre estas dos proteínas interviene en la patología del melanoma maligno cutáneo.

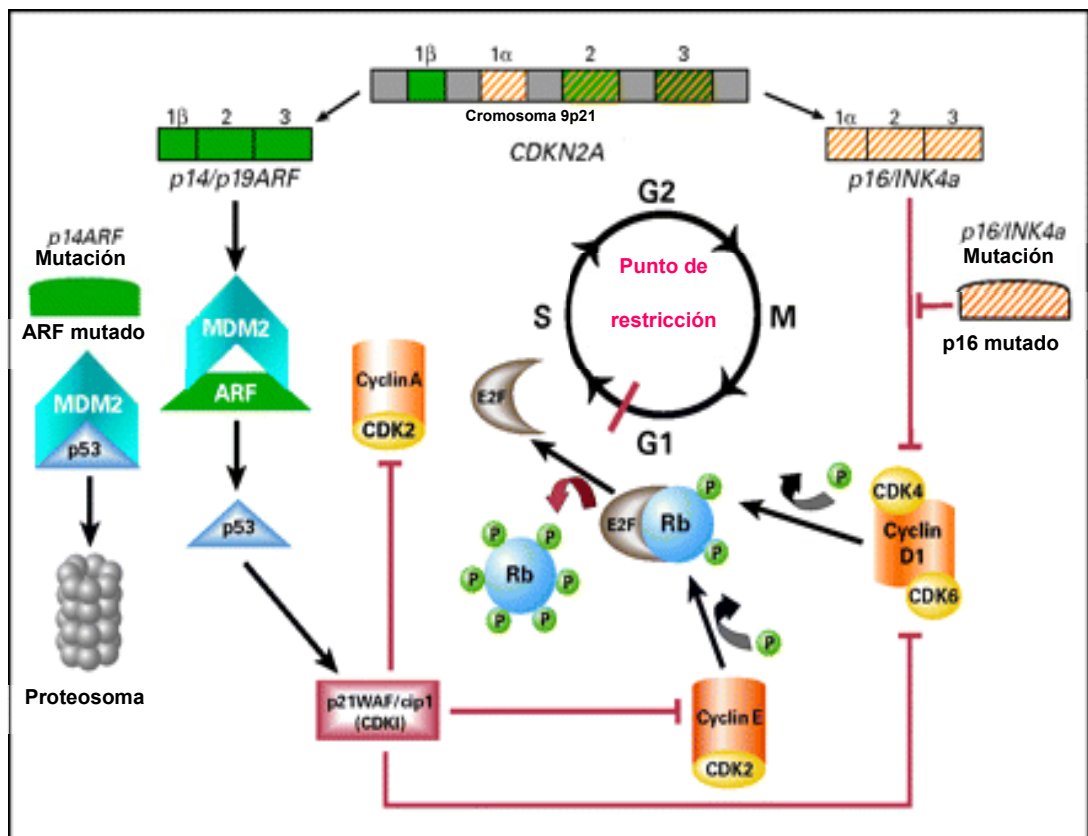


Figura 1.6. Codificación genómica y mecanismo de acción de los supresores de tumores p16^{INK4a} y p14^{ARF}. El gen *CDKN2A* codifica 2 supresores p16^{INK4a} y p14^{ARF} por medio de marcos de lectura alternativos.

En la misma región del cromosoma 9 se ha encontrado otro gen candidato que aumenta la susceptibilidad al melanoma. Este gen, el $p14^{ARF}$, aparece mutado en varios casos de melanoma maligno. Tanto $p14^{ARF}$ como $p16^{INK4A}$ derivan del mismo locus, $CDKN2A$, pero son proteínas distintas, sin homología en las secuencias de aminoácidos y que se generan debido a la existencia de distintos promotores que utilizan distintos marcos de lectura de traducción. Además, la forma en la que influyen en la progresión del ciclo celular también es distinta. Mientras que $p16^{INK4A}$ inhibe la fosforilación de Rb mediada por $CDK4$, bloqueando el ciclo celular en la fase G1, $p14^{ARF}$ estimula la estabilización de la proteína p53.

También se han encontrado defectos en el gen $CDKN2A$ en células cultivadas y no cultivadas obtenidas a partir de melanomas esporádicos. La inactivación del $CDKN2A$, ya sea por delección, mutación o inhibición de la transcripción por metilación del promotor, se ha visto en casi todas las líneas celulares de melanoma (Castellano *et al.*, 1997), siendo por el contrario mucho menos frecuente encontrar estos defectos en el gen de melanomas no cultivados. Esta disparidad se puede explicar por varios factores, como la presencia de células normales (células del estroma) en muestras de tumores o selección de células que han adquirido la mutación en $CDKN2A$ cuando se ponen en cultivo. Del mismo modo, se han encontrado mutaciones en el gen $CDK4$ en melanoma maligno cutáneo esporádico, a pesar de que su frecuencia es muy inferior a los casos de melanoma familiar (Guldberg *et al.*, 1997; Wolfel *et al.*, 1995).

b. Otros loci genéticos en el melanoma maligno cutáneo

Además de los genes $CDKN2A$ y $CDK4$, hay muchos datos que apuntan a la existencia de otros genes que contribuyen al desarrollo de los melanomas. Muchas de las familias que no portan defectos del gen $CDKN2A$ muestran ligamiento genético con marcadores del cromosoma 9p. Un candidato es el gen $CDKN2B$, que codifica la proteína p15, inhibidora del ciclo celular como $p16^{INK4A}$, aunque no se ha podido demostrar la existencia de mutaciones en este gen en la línea germinal de 154 familias (Pollock y Trent, 2000). Otros datos indican la existencia de más loci implicados en el melanoma maligno cutáneo en el cromosoma 9p demostrando la pérdida de marcadores de ADN en regiones distintas del locus $CDKN2A$ en melanomas esporádicos (Holland *et al.*, 1994), si bien todavía no se ha identificado ningún otro gen supresor tumoral en esta región. Mediante análisis de ligamiento de otros melanomas familiares y estudios de hibridación genómica se han identificado muchos otros loci que pueden llegar a albergar genes que intervengan en la formación del melanoma maligno

cutáneo. Estos loci podrían estar localizados en los cromosomas 1p, 3p, 6q, 6p, 10p, 11q, y 17p (Bastian *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 1994).

c. Defectos en el gen *PTEN* en el melanoma maligno cutáneo

En el melanoma maligno cutáneo se han encontrado deleciones frecuentes de marcadores de ADN en el cromosoma 10q y, recientemente, se han detectado defectos en el gen *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*), que se encuentra en la región 10q23. El gen *PTEN* es un gen supresor de tumores en el que, con frecuencia, se encuentran deleciones o mutaciones en diferentes cánceres. La proteína PTEN funciona de la misma manera que p16^{INK4A}, de forma que la pérdida de su función altera la regulación del ciclo celular a través de mecanismos relacionados con la vía del Rb. Así, se ha observado que el 30-50% de las líneas celulares de melanoma y cerca del 5-20% de melanomas no cultivados presentan defectos en el gen *PTEN* (Wu *et al.*, 2003c). Incluso, estudios funcionales han demostrado que se puede inhibir el crecimiento de células de melanoma en cultivo mediante la introducción de este gen (Robertson *et al.*, 1998). En conjunto, estos hallazgos indican que los defectos en el gen *PTEN* podrían estar implicados en la patogenia de algunos melanomas malignos cutáneos esporádicos.

d. en los genes *RAS* y *RAF* en el melanoma maligno cutáneo

Los genes de la familia *RAS* (*H-RAS*, *K-RAS* y *N-RAS*) codifican GTPasas ligadas a la membrana que funcionan asociadas a receptores de la superficie celular, como receptores tirosina quinasas, receptores acoplados a proteínas G y receptores de adhesión celular (integrinas) (**Figura 1.7**). Las proteínas *RAS* regulan la transmisión de señales desde la superficie celular al núcleo para modificar los patrones de expresión de genes y regular la proliferación y diferenciación celular (Shields *et al.*, 2000). Con frecuencia, en cánceres humanos, los genes *RAS* se activan por mutaciones y pueden contribuir al desarrollo de melanomas malignos cutáneos (Herlyng y Satyamoorthy, 1996).

Se han detectado mutaciones activadoras del gen *N-RAS* en el 95% de los melanomas hereditarios de pacientes con mutaciones en *CDKN2A* (Eskandarpour *et al.*, 2003). Por el contrario, en los melanomas esporádicos no cultivados y en las líneas celulares, las mutaciones en *RAS* son mucho menos frecuentes (4-31%). En el caso de melanomas malignos cutáneos esporádicos son más frecuentes las mutaciones en los genes *BRAF* (Davies *et al.*, 2002). Las proteínas *RAF* interactúan con las *RAS*, ejerciendo su función

después de las RAS, por lo que, en teoría, mutaciones en el gen *RAF* tienen el mismo efecto en la activación de la vía MAPK (factores de transcripción y expresión de genes), por lo que ambos genes pueden ser importantes en la patogénesis del melanoma maligno cutáneo. Se cree que la activación de la señalización MAPK puede representar un acontecimiento precoz importante en las neoplasias melanocíticas, pero que, para el desarrollo del melanoma se necesitarán otras alteraciones genéticas como la inactivación del gen *CDKN2A* (Pollock *et al.*, 2003).

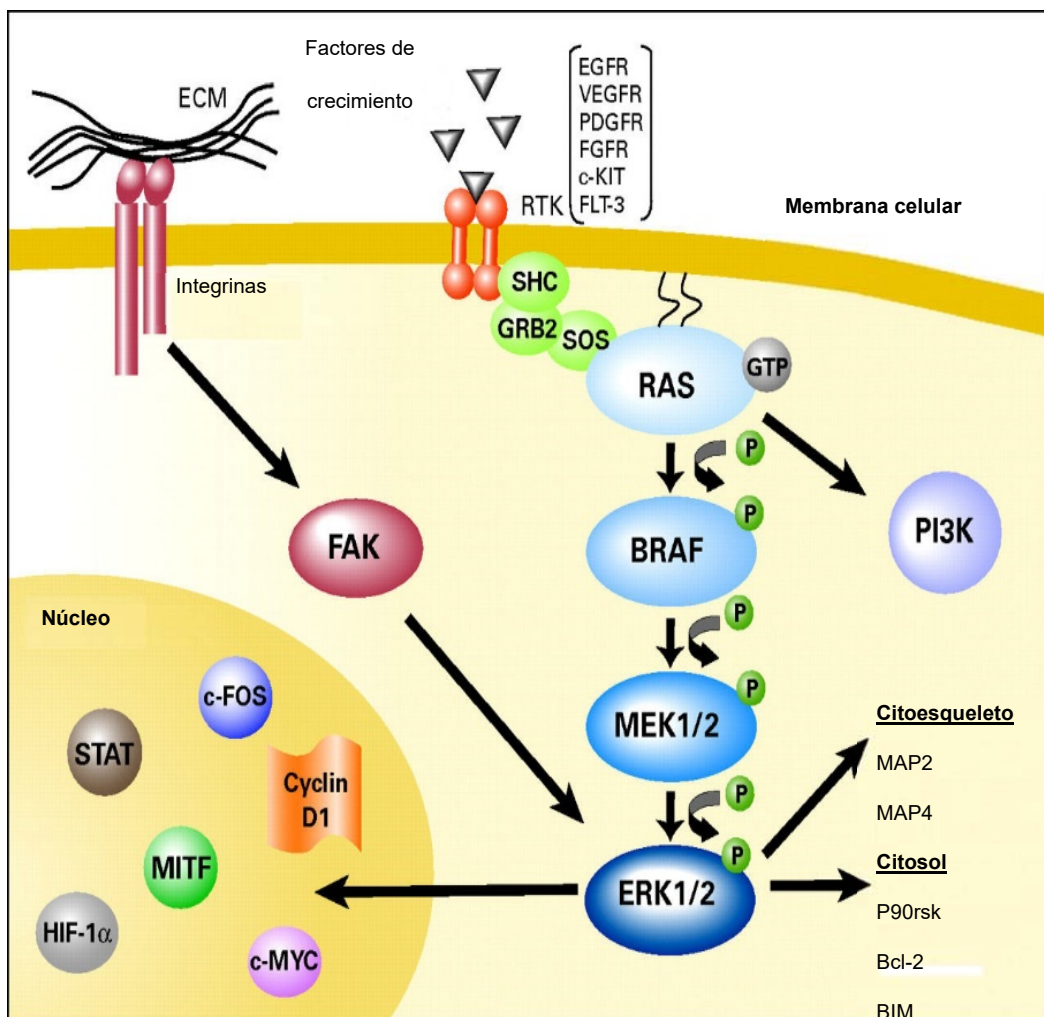


Figura 1.7. Vías de señalización RAS/RAF.

Las mutaciones activadoras de los genes *RAS* y *RAF* eluden los controles normales y activan esta vía de forma constitutiva.

1.1.3.5 Invasión y metástasis

Al diagnosticar un cáncer de piel es muy importante determinar si el cáncer está localizado en la piel o ya se ha extendido a los ganglios linfáticos regionales o a órganos distantes. La formación de metástasis es diferente entre los distintos tipos de cáncer de piel. Los carcinomas basocelulares rara vez metastatizan y los carcinomas epidermoides lo hacen con poca frecuencia. Los melanomas cutáneos metastatizan con más frecuencia que los otros tipos de cáncer y son una de las neoplasias más agresivas para los seres humanos. En un gran número de pacientes con melanoma, en el momento del diagnóstico ya se han producido metástasis.

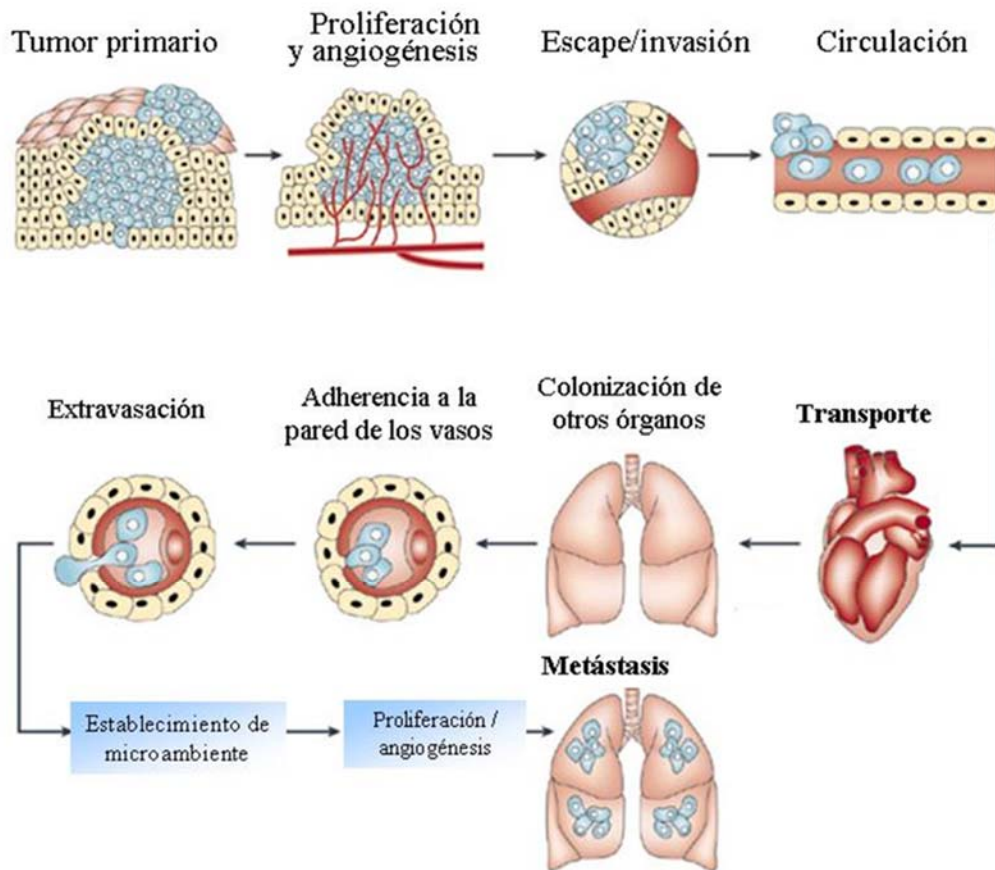


Figura 1.8. Etapas del proceso de metástasis en melanoma

El proceso de formación de metástasis es un proceso dinámico y complejo que comprende una serie de etapas que se muestran en la **Figura 1.8**. Para que se produzca una lesión con relevancia clínica han de superarse todos los pasos de este proceso. Las principales etapas en la formación de metástasis son:

- ❖ Después de la transformación inicial, el crecimiento unicelular y multicelular debe ser progresivo y los nutrientes para la masa celular llegan por difusión simple.
- ❖ Cuando la masa tumoral supera un tamaño de 1-2 mm se tiene que producir una vascularización masiva. Lo que implica la síntesis y secreción de factores proangiogénicos.
- ❖ Invasión local del estroma del huésped por algunas células tumorales.
- ❖ Las vénulas de pared fina, como los conductos linfáticos, ofrecen poca resistencia a la penetración de las células tumorales por lo que son la vía más habitual de su entrada en la circulación.
- ❖ La siguiente etapa consiste en la separación y la embolización de pequeños agregados tumorales, mientras que la gran mayoría de las células tumorales circulantes se destruyen con rapidez.
- ❖ Una vez que las células tumorales han sobrevivido en circulación, deben de adherirse a las células endoteliales o a la membrana basal subendotelial.
- ❖ A continuación, se produce la extravasación, posiblemente por los mismos mecanismos por los que se produjo la invasión inicial.
- ❖ El proceso de formación de metástasis se completa con la proliferación en el parénquima del órgano.

La progresión de la formación de metástasis depende de múltiples y complejas interacciones entre las células metastásicas y los mecanismos homeostáticos del huésped (Fidler, 1999; Liotta y Kohn, 2001). A partir de estudios con animales acerca de la distribución y evolución de células de melanoma marcadas radiactivamente diseminadas por vía hematogena, se ha demostrado que, aunque las células pueden alcanzar la microvascularización de muchos órganos, su crecimiento en el parénquima sólo se produce en órganos específicos (Fidler, 1970; Fidler y Talmadge, 1986).

1.1.3.6 Diagnóstico del melanoma

La detección del melanoma en las fases tempranas de su evolución biológica y su pronta extirpación quirúrgica resultan claves para la supervivencia de los pacientes. Existen dos formas de reducir la morbilidad y mortalidad del melanoma: la primera consiste en identificar y eliminar los múltiples factores de riesgo (genéticos, ambientales, inmunológicos, virales, otros agentes cancerígenos etc.), aunque en su mayoría desconocidos. A pesar de los esfuerzos realizados, tanto en la limitación a la exposición de la radiación UV como en investigación básica y clínica, poco se ha avanzado en el terreno práctico. Es por esto que los esfuerzos para reducir la morbilidad y mortalidad del melanoma se encuentran limitados al campo de la detección precoz.

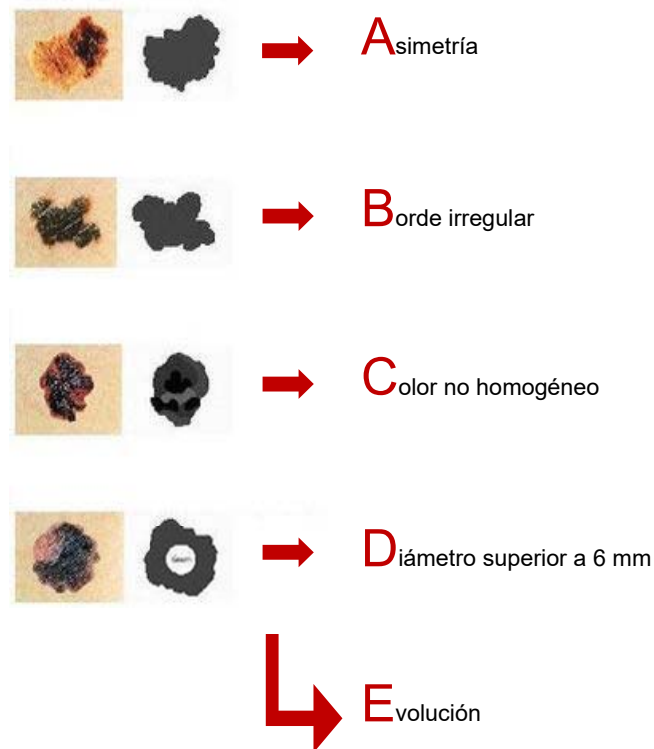


Figura 1.9. Regla ABCDE para el diagnóstico de melanoma maligno cutáneo.

La mayor parte de los melanomas precoces pueden ser identificados empleando la regla ABCDE (Friedman *et al.*, 1985) (**Figura 1.9**) sobre la base de que, al margen del diámetro actual de la lesión, una clave importante para el diagnóstico es su cambio a lo largo del tiempo. De esta forma, los melanomas precoces son **A**simétricos (generalmente no pueden dividirse en mitades iguales), tienen **B**ordes irregulares (los bordes de la mayoría de los melanomas

precoces tienen contornos irregulares), presentan variabilidad de **Color** (la mayoría de los melanomas precoces tienen una diversidad de colores, que varía desde los sutiles tonos marrones a zonas de color negro y más raramente rojo, blanco y azul), su **Diámetro** suele ser ≥ 6 mm y su **Evolución** varía con el tiempo. Es importante recordar que todos los melanomas tienen un origen microscópico; de esta forma, existe una fase en la evolución inicial del melanoma en la que pueden estar ausentes uno o más de los criterios ABCDE, siendo el más ausente el D. Así, una buena clave para la identificación de una lesión, consiste en recordar que las neoplasias malignas cambian a lo largo del tiempo. Incluso en una lesión pequeña, un cambio en el diámetro a lo largo del tiempo debe despertar la sospecha del observador. Si bien la mayoría de las lesiones más avanzadas pueden ser diagnosticadas empleando la regla ABCDE, existen excepciones para los llamados melanomas nodulares (crecimiento vertical), melanomas amelanóticos y para otros melanomas más pequeños.

Actualmente se cuenta con nuevas técnicas diagnósticas para el melanoma como:

Dermoscopia: Técnica *in vivo* no invasiva que hace un aumento de la piel haciendo visibles el color y la estructura de la epidermis, la unión dermo-epidérmica y la dermis papilar, se conoce también como dermatoscopia, microscopía de la superficie cutánea y microscopía epiluminiscente. Se ha visto que esta técnica mejora de modo significativo el diagnóstico clínico de lesiones cutáneas melanocíticas benignas y malignas y con ello del melanoma.

Diagnóstico asistido por ordenador: Programas informáticos que evalúan de forma objetiva las lesiones cutáneas pigmentadas.

Microscopia confocal: Ofrece importantes ventajas sobre el estudio histológico tradicional ya que es una técnica no invasiva, no daña el tejido, es indolora y el tejido no se altera durante el procesado minimizando los artefactos. Los datos se recogen en directo por lo que es más rápido y la misma zona de la piel puede evaluarse repetidamente, pudiendo evaluarse cambios dinámicos como la respuesta al tratamiento.

1.1.3.7 Tratamiento del melanoma

El tratamiento del cáncer en la actualidad incluye varias estrategias terapéuticas como la cirugía, la radioterapia, la terapia biológica y la quimioterapia. La cirugía, con tratamiento posterior con radioterapia o quimioterapia, puede ser curativa en un alto porcentaje de pacientes cuando éstos se hallan en las etapas tempranas de la enfermedad. Sin embargo, en etapas tardías, cuando se ha desarrollado la metástasis, las posibilidades de supervivencia

son escasas y la quimioterapia es el único tratamiento disponible. El aumento en la incidencia del melanoma y su pobre pronóstico en estados avanzados ha estimulado la investigación en nuevas vías de tratamiento como la terapia biológica y la inmunquimioterapia, que combina la quimioterapia con el uso de agentes dirigidos al sistema inmunitario.

a. Cirugía

La cirugía para extirpar el tumor es el tratamiento de elección para todos los estadios del melanoma. El tratamiento del melanoma por métodos quirúrgicos suele implicar la obtención de un diagnóstico histológico para dirigir la actuación terapéutica y la erradicación completa del tumor. En general, el diagnóstico histológico debe realizarse antes de proceder al tratamiento quirúrgico definitivo de la lesión. Las biopsias para confirmar dicho diagnóstico pueden hacerse por escisión o por incisión. Las biopsias por escisión consisten en la extracción de la totalidad de la lesión, que se envía al laboratorio para su estudio anatomopatológico. Es el método idóneo en las lesiones melanocíticas sospechosas de melanoma debido a que el anatomopatólogo dispone de la totalidad de la lesión para su estudio y se evita el error de la selección de muestras. Además, este sistema permite valorar la profundidad de la lesión y los demás factores pertinentes que son vitales para el tratamiento posterior del paciente. Por último, la escisión tiene la ventaja de eliminar por completo el tumor primario. En algunos casos el tamaño o la localización anatómica de una lesión puede hacer que su extirpación completa sea poco práctica o imposible. En estos casos es preferible una biopsia por incisión en la que se extrae una parte de la lesión. En el caso de lesiones melanocíticas se debe tener cuidado para que la muestra obtenida comprenda la parte de la lesión con más probabilidades de proporcionar un diagnóstico acertado (zona más oscura o sobresaliente).

b. Radioterapia

La radioterapia es un tratamiento para el cáncer que usa rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para eliminar las células cancerosas o impedir que crezcan. Hay dos tipos de radioterapia: la radioterapia externa utiliza una máquina fuera del cuerpo la cual envía radiación al área donde se encuentra el cáncer y la radioterapia interna utiliza una sustancia radiactiva sellada en agujas, semillas, alambres o catéteres que se colocan directamente en el foco del cáncer. La forma en que se administra la radioterapia depende del tipo y el estadio del cáncer que está siendo tratado. Hoy en día la radioterapia para el tratamiento de cánceres de piel se utiliza mucho menos que años atrás. Al contrario que otros muchos tumores de piel,

el melanoma maligno no es muy sensible a la radiación, de hecho, durante muchos años se ha creído que era inmune a la radiación hasta que los datos demostraron que la radioterapia paliaba los signos y síntomas de la enfermedad metastásica en más del 50% de los pacientes. Aunque parece haber una diferencia biológica en la forma en que algunos melanomas responden a la radioterapia en comparación con otros tipos de neoplasias.

c. Terapia biológica

La terapia biológica es un tratamiento para estimular la capacidad del sistema inmunitario para combatir el cáncer donde se usan sustancias elaboradas por el cuerpo o en el laboratorio para reforzar, dirigir o restaurar las defensas naturales del cuerpo contra la enfermedad. Las vacunas constituyen un tratamiento novedoso para el melanoma, pero siguen en fase experimental. Se trata de una opción atractiva porque permiten una destrucción selectiva y segura de las células del melanoma y es por esto que, actualmente, el desarrollo de este tipo de vacunas centre gran parte del esfuerzo realizado por la comunidad científica y la industria farmacéutica. Existen múltiples motivos para considerar que la progresión del melanoma en el ser humano está condicionada por factores inmunológicos (Bystryn, 1995) y que la estimulación de estos factores, por parte de las vacunas, puede incrementar la resistencia a este tipo de cáncer. Estos motivos derivan de dos observaciones, por un lado, se conoce que en un 15-20% de los melanomas primarios se produce una regresión parcial del tumor (Khosravi *et al.*, 2016) y, que, de forma muy infrecuente, se produce la regresión espontánea completa de melanomas avanzados. Estos mecanismos defensivos son muy selectivos ya que destruyen las células del melanoma sin afectar a los melanocitos normales adyacentes y, además, son espontáneos, lo que indica que el ser humano dispone de mecanismos protectores con capacidad de destruir las células del melanoma. La selectividad de este proceso nos orienta hacia un proceso inmunológico, ya que sólo el sistema inmunitario es capaz de reconocer la diferencia entre células normales y malignas. La otra observación deriva de estudios con ratones a los que se les inyectó células B16-F10 de melanoma murino. La mayoría de los ratones preinmunizados con vacunas para el melanoma sobrevivieron a la inyección de dosis letal de células de melanoma que acabaron con la vida de todos los animales no inmunizados (Oratz *et al.*, 1989). En este caso, la protección fue específica para el melanoma, ya que los ratones vacunados contra al melanoma no quedaron protegidos para otros tumores no relacionados, indicando que los mecanismos de protección eran de naturaleza inmunológica. Las respuestas inmunitarias inducidas por antígenos tumorales son débiles y, frecuentemente, de corta duración, por tanto, un elemento esencial para estas

vacunas son los adyuvantes con el fin de aumentar la capacidad de generar respuestas inmunitarias intensas.

d. Quimioterapia

La quimioterapia es un tratamiento del cáncer que utiliza medicamentos para interrumpir la proliferación de células cancerosas, mediante la eliminación de las células o evitando su multiplicación. Cuando la quimioterapia se administra oralmente o se inyecta en una vena o músculo, los medicamentos ingresan al torrente sanguíneo y afectan a células cancerosas en todo el cuerpo (quimioterapia sistémica). Cuando la quimioterapia se coloca directamente en una parte concreta del cuerpo, los medicamentos afectan principalmente células cancerosas en esas áreas (quimioterapia regional). Se pueden administrar los medicamentos de la quimioterapia mediante una perfusión hipertérmica aislada en los miembros, de forma que se envían los medicamentos contra el cáncer directamente al brazo o la pierna donde se encuentra el cáncer. El flujo de sangre hacia y desde el miembro se interrumpe temporalmente con un torniquete, y se coloca una solución tibia que contiene los medicamentos directamente en la sangre del miembro. Esto permite al paciente recibir una dosis alta de medicamentos en el área afectada por el cáncer. La forma en que se administre la quimioterapia va a depender del tipo y el grado de avance del cáncer que está siendo tratado. Desafortunadamente, la quimioterapia no ha resultado ser muy efectiva en el tratamiento del melanoma y normalmente se utiliza como adyuvante después de una operación con el fin de destruir cualquier célula cancerosa que haya quedado o como tratamiento en pacientes con metástasis generalizada donde el pronóstico es peor y se emplea para prolongar la vida, ya que, en estos casos, la curación todavía no es posible.

Los agentes utilizados en quimioterapia simple o combinada para el tratamiento del melanoma son los siguientes:

Dacarbazina: es la única droga aprobada para el tratamiento de melanoma metastático en estadio IV. Aunque es el mejor tratamiento disponible y el más estándar, sólo produce respuesta en alrededor del 20% de los enfermos, que aumentan su esperanza de vida una media de seis meses. Hasta ahora, todavía no ha sido posible probar sus beneficios en la supervivencia global. Se utiliza en solitario o en combinación con otras drogas.

Temozolomida: es una droga usada para el tratamiento del cáncer cerebral, por lo que también se usa para el melanoma que ha ocasionado metástasis en el cerebro o en el sistema

nervioso. Es igual de efectivo que la dacarbazina, pero permite su administración oral, lo cual facilita el tratamiento.

Cisplatino: es un agente alquilante cuyo objetivo son las células que se dividen rápidamente, como las células tumorales, a las que les causa la muerte. Es una de las drogas más utilizadas en el tratamiento del cáncer, sin embargo, en melanoma sólo es activo de forma modesta y se usa frecuentemente en combinación con otras drogas (CVD: cisplatino, vincristina y dacarbazina).

Carmustina: es otro agente alquilante que mata las células que se dividen rápidamente. Se utiliza para tratar varios cánceres que han causado metástasis en el cerebro, incluido melanoma.

Fotemustina: es otro agente alquilante que ha sido probado en pacientes con melanoma metastático. En algunos ensayos ha mostrado más actividad en los pacientes, aunque los efectos secundarios fueron más frecuentes que con la dacarbazina.

Vindesina: es un alcaloide derivado de la vinca (*Catharanthus roseus*) y esta droga mata a las células que se dividen destruyendo los microtúbulos durante la división celular. Aunque fue un descubrimiento prometedor, un ensayo clínico en 2008 no mostró un aumento de la supervivencia tras su tratamiento y evidenció serios efectos secundarios.

Vincristina: es otro alcaloide procedente de la vinca que inhibe la división celular. Se usa frecuentemente en tratamientos combinados junto con otras drogas, como el CVD.

Bleomicina: es una mezcla de antibióticos que se usan en combinación con otras drogas, ya que tiene propiedades antibióticas y antitumorales.

Paclitaxel: es un derivado natural de un árbol (*Taxus brevifolia*) que actúa como agente antimicrotúbulos, por lo que inhibe la proliferación celular. Todavía es experimental en el tratamiento del melanoma y se usa en combinación con otros compuestos.

En general los agentes quimioterapéuticos no logran eliminar a las células de melanoma eficientemente y sólo se obtienen respuestas clínicas en el 15% de los casos, dando lugar a un aumento de la esperanza de vida entre 6 y 8 meses (Barrio, 2009). Esto puede deberse a una falta de respuesta primaria a la droga o al desarrollo de resistencia adquirida por el tumor hacia la droga. La identificación de genes específicos involucrados en el proceso indica que existen tres mecanismos principales de resistencia a las drogas:

- ❖ Disminución en la captación de las drogas tales como el cisplatino, análogos de nucleósidos y antagonistas del metabolismo del folato, debido a alteraciones en los transportadores.
- ❖ Alteraciones en las células tumorales que provocan la incapacidad de la droga de matar a la célula, como, por ejemplo, defectos de las vías apoptóticas.
- ❖ Incremento en el flujo activo de drogas hidrofóbicas que ingresan a la célula por difusión pasiva (La Porta, 2007).

e. **Quimioprevención**

Además de la quimioterapia para el tratamiento del cáncer, también se puede recurrir a la quimioprevención, que consiste en la administración de determinadas sustancias químicas, naturales o sintéticas con el fin de impedir o revertir la carcinogénesis evitando el desarrollo de un cáncer. Existen tres formas diferentes de quimioprevención del melanoma: quimioprevención primaria, que previene la aparición de melanoma en individuos sanos; quimioprevención secundaria, que previene de la conversión de precursores pre-malignos en melanoma maligno; y, finalmente, quimioprevención terciaria para el tratamiento de melanomas en individuos sin señales de enfermedad. Lo ideal es que la medicación no sea muy costosa, que sea de fácil administración y con los mínimos efectos secundarios asociados. Los diferentes grupos de agentes quimioterapéuticos que se utilizan en la actualidad para la prevención y el tratamiento del melanoma son los siguientes:

Crema solar: A pesar de que muchos estudios han demostrado la reducción del riesgo de melanoma entre usuarios de cremas solares (Bakos *et al.*, 2002; Espinosa *et al.*, 1999; Moloney *et al.*, 2002), otros, sin embargo, no han encontrado una asociación directa e incluso exponen un aumento en el riesgo de desarrollar melanoma con el uso de estas cremas (Dennis *et al.*, 2003; Westerdahl *et al.*, 1995). Estas discrepancias se pueden explicar debido a las dificultades metodológicas relacionadas con el control de la sensibilidad a la exposición solar, el tipo y el uso correcto de la crema solar. La mayoría de las cremas solares protegen frente a longitudes de onda UVA y UVB, de forma que los estudios son incapaces de distinguir entre ambas radiaciones. Existen estudios que demuestran que la aplicación de cremas solares de forma regular previene de la formación de dímeros de timina en el ADN, hecho que no sucede con la aplicación de las cremas de forma irregular (Al Mahroos *et al.*, 2002). Otra hipótesis sostiene que la vitamina D sintetizada en respuesta a la exposición UV podría provocar cáncer.

A pesar de esta controversia, el evitar la exposición al sol y el uso de cremas solares de amplio espectro, siguen siendo las principales indicaciones de las autoridades sanitarias para la prevención del melanoma. El uso apropiado de cremas protectoras solares bloquea los rayos UV mutagénicos y previene de quemaduras, ambos factores muy importantes por estar asociados al riesgo de padecer melanoma (Gandini *et al.*, 2005; Gilchrest *et al.*, 1999).

Antilipidémicos: Debido a que las células cancerosas y normales metabolizan el colesterol de forma diferente (Versluis *et al.*, 1996), modificando el metabolismo del colesterol se puede inhibir la carcinogénesis o inhibir de forma selectiva el crecimiento de células tumorales (Lenz *et al.*, 1997; Kuzu *et al.*, 2016). Los inhibidores de 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa o estatinas han sido propuestos como compuestos que disminuyen la incidencia del melanoma y que incrementan la eficacia de su tratamiento. Las estatinas han mostrado que inhiben la proliferación e invasión, bloqueando la modificación de proteínas isoprenoides necesarias para la señalización celular (Collisson *et al.*, 2002), inducen apoptosis en células de melanoma a través de un mecanismo específico (Jani *et al.*, 1993), inhiben la activación de proteínas importantes para la regulación del ciclo celular (Demierre *et al.*, 2005) e inhiben a NF κ B, clave en la migración celular e inflamación (Chan *et al.*, 2003).

Nutrientes: Un gran número de nutrientes han sido propuestos y estudiados para la quimioprevención del melanoma, entre ellos la (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), las vitaminas E y D, el β -caroteno, el licopeno, los flavonoides, el resveratrol, el selenio o el ginseng. Muchos de estos funcionan como antioxidantes, eliminando radicales libres que dañan el ADN y pueden provocar carcinogénesis. Muchos antioxidantes, además, se cree que tienen propiedades fotoprotectoras. El té es uno de los antioxidantes mejor estudiado como quimioterapéutico en el cáncer de piel. El té contiene EGCG, que minimiza los daños causados por la radiación UV a través de reacciones de reducción, disminuyendo la inflamación y la proliferación celular (Hsu, 2005). Además, este componente del té detiene el ciclo celular e induce la apoptosis en células de melanoma, modulando la ruta de las ciclinas y las proteínas de la familia Bcl-2 (Nihal *et al.*, 2005), y posee, a su vez, propiedades antiangiogénicas (Tosetti *et al.*, 2002). Estudios con ratones demostraron que la administración oral de EGCG a ratones inyectados con células de melanoma murino B16-F10 disminuía la progresión del tumor y la metástasis (Taniguchi *et al.*, 1992). Su bajo coste, la ausencia de toxicidad y la fácil administración del EGCG hacen que sea un potencial agente terapéutico contra el melanoma. El efecto del β -caroteno al igual que las vitaminas D y E no está del todo claro, habiendo sido relacionados, tanto con el incremento, como con la reducción del riesgo de cáncer (Blot *et al.*,

1993). En el caso del licopeno, se sabe que presenta efectos antineoplásicos en próstata, colon, mama y páncreas (Nkondjock *et al.*, 2005; Tamimi *et al.*, 2005), pero en el caso de melanoma, en estudios de comparación de niveles de licopeno en suero en pacientes con y sin melanoma, no se ha encontrado ninguna asociación (Breslow *et al.*, 1995). Los flavonoides como la genisteína son incapaces de inducir apoptosis en células de melanoma, pero sí que detienen el ciclo celular actuando sobre la proteína p53 (Russo *et al.*, 2006). El resveratrol, abundante en bayas y frutos, presenta propiedades anticancerígenas *in vitro* en una gran variedad de células tumorales, incluyendo linfomas, mielomas, cáncer de mama, próstata, colon y melanoma. El resveratrol induce apoptosis en diferentes líneas de células de melanoma (Niles *et al.*, 2003). El selenio, que se encuentra como elemento traza en muchos alimentos, muestra inhibición de metástasis pulmonar en ratones con dietas altas en este elemento (Li *et al.*, 2004). Sin embargo, estudios en humanos muestran tanto correlaciones positivas como negativas entre el melanoma y el selenio (Vinceti *et al.*, 1998; 2005). Finalmente, el ginseng ha demostrado actividades antineoplásicas, así como, la capacidad de inhibir el crecimiento de células de melanoma *in vitro* (Xiaoguang *et al.*, 1998). La administración en ratones provoca menor incidencia de metástasis y de actividad angiogénica (Mochizuki *et al.*, 1995) y, por último, estudios en humanos han determinado que la ingesta regular de ginseng está asociada a una menor incidencia de diferentes tipos de cáncer (Yun, 2003).

Antiinflamatorios no esteroideos (AINES): Muchos de estos compuestos inhiben a las enzimas ciclooxigenasas (COX), previniendo la síntesis de prostaglandinas y otras moléculas pro-inflamatorias, que estimulan el crecimiento y juegan un papel importante en la promoción del cáncer de piel (Fischer *et al.*, 1999). La ruta de las COX podría estar implicada específicamente en la progresión del tumor de melanoma dando un papel importante a los AINES en la quimioprevención del melanoma (Denkert *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2005). Se han realizado diversos estudios en humanos en los que se han asociado estos compuestos con una menor incidencia de melanoma en mujeres (Harris *et al.*, 2001) y en los que los pacientes a los que se les prescribió inhibidores de COX, mostraron menor incidencia de melanoma, recurrencia y metástasis (Ramirez *et al.*, 2001). A pesar de lo prometedor que parecen estos compuestos para el melanoma, a día de hoy no existen suficientes indicios para incluirlos en el tratamiento del melanoma, si bien se están realizando grandes esfuerzos en la investigación de este tipo de fármacos, debido a su relativa baja toxicidad y a su posible uso de forma sinérgica con otros compuestos (Wilgus *et al.*, 2003).

1.1.4. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una neoplasia que se presenta con mayor frecuencia en los tumores de estirpe epitelial (en el epitelio ductal en un 70- 80% de los casos y en el lobulillar en un 5-10%), aunque cualquiera de los tejidos que componen la mama puede albergar un cáncer. En la actualidad se emplean de forma generalizada los términos cáncer y carcinoma aplicados a los tumores epiteliales malignos. Desde el punto de vista biológico el cáncer de mama es una enfermedad altamente heterogénea lo cual a su vez se correlaciona con las distintas formas histopatológicas, los diversos grados de velocidad de crecimiento, las variaciones en la capacidad de dar metástasis, las distintas respuestas a terapias hormonales, etc. Todas estas variaciones son un reflejo (fenotipo) de las diversas modificaciones a nivel genómico que han ocurrido durante el proceso de transformación tumoral: alteraciones recesivas de los genes supresores de tumores, con pérdida de sus funciones inhibitoras, y alteraciones dominantes en oncogenes, que habitualmente tienen como resultado una ganancia de sus funciones estimuladoras (Ciocca y Gago, 2000).

1.1.4.1 Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es la neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia en la mujer y la segunda causa de muerte por cáncer. Es más frecuente en Estados Unidos, Canadá y países de Europa septentrional y se observa con menos frecuencia en Asia, América Latina y África. Dentro de cada país, las zonas urbanas tienen mayor incidencia y mortalidad por cáncer de mama que las zonas rurales, lo que iría a favor de que los factores ambientales desempeñen un papel importante en la génesis de esta enfermedad (Aguilar y Barrón, 1998). La incidencia de la enfermedad se ha incrementado de forma importante en las últimas décadas, de manera que el riesgo de desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida es de un 12.2% (una de cada ocho mujeres). La mayor incidencia de enfermedad la presentan las mujeres de raza blanca, es menos frecuente entre las mujeres de raza negra y menor aún entre las de origen asiático (Zamora *et al.*, 2001). Por otro lado, las tasas de mortalidad por esta neoplasia ajustadas a la edad se han mantenido constantes.

En España, como en casi todos los países desarrollados, el cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en la mujer y la primera causa de muerte por cáncer en la población femenina. La probabilidad actual de que una mujer española adquiera un cáncer de mama antes de cumplir los 75 años de edad se aproxima a un 5%, es decir, una de cada 20 mujeres desarrollará un cáncer de mama antes de esa edad. En el resto de los países occidentales las

cifras son aún más elevadas (Zamora *et al.*, 2001). Los diversos registros poblacionales existentes en España indican una amplia variabilidad en la incidencia de cáncer de mama dependiendo de la provincia, siendo Granada la de menor incidencia y Girona la de mayor tasa (Pollán *et al.*, 2010). La tendencia de la incidencia es al aumento leve pero progresivo en la mayoría de países, con un incremento mayor en aquellas poblaciones que tenían previamente las tasas más bajas. La frecuencia de cáncer de mama aumenta con la edad hasta la menopausia y posteriormente continúa elevándose, pero a menor velocidad (Guinee, 2000). En la Unión Europea la mortalidad por cáncer de mama disminuyó un 7% a finales del siglo XX. Esto podría explicarse por los grandes avances en el diagnóstico y tratamiento en mujeres menores de 70 años, así como por una posible mejoría en la supervivencia tras la escisión del cáncer de mama. La supervivencia depende fundamentalmente de la diseminación tumoral (Aguilar y Barrón, 1998). En los últimos diez años se ha comenzado a apreciar una reducción importante de las tasas de muerte por esta enfermedad. Las razones para esta disminución no están completamente claras, pero se sospecha que varios factores han podido contribuir: la generalización de las campañas de detección precoz, los mejores tratamientos loco-regionales, los tratamientos quimioterapéuticos adyuvantes y, por último, el uso generalizado del tamoxifeno.



Figura 1.10. Datos epidemiológicos de la incidencia del cáncer de mama.
Variabilidad de la incidencia del cáncer de mama por cada 100000 habitantes en distintas zonas del mundo.

Según los resultados preliminares en el Registro de Cáncer en el norte de Túnez (RCNT), este tipo de cáncer representa el 30% de todos los cánceres diagnosticados y ocupa el primer lugar, delante del cáncer de útero. Los datos hospitalarios (principalmente ISA) mostraron que la edad media de los pacientes, al momento del diagnóstico, era de menos de 50 años (Ben Abdallah, 1997). Otro estudio independiente (Maalej et al., 1999) confirmó esta característica epidemiológica. Así, el promedio de edad de la aparición de este tipo de cáncer entre las mujeres de Túnez es diez años menor que la observada en occidente.

1.1.4.2 Etiología del cáncer de mama

Los estudios actuales acerca de la carcinogénesis han alcanzado una serie de puntos clave relacionando los factores causantes de las neoplasias con las modificaciones que aparecen a nivel genético. Entre estos factores se pueden citar: los virus, las radiaciones ionizantes, la contaminación ambiental y el envejecimiento de la población. Se desconoce cuál es el primer paso en el desarrollo tumoral y si la evolución es escalonada desde la hiperplasia atípica al carcinoma *in situ* y, posteriormente, hasta la invasión a distancia. En general se cree que el inicio del cáncer de mama es el resultado de la proliferación celular incontrolada y/o apoptosis aberrantes, como consecuencia de la acumulación de lesiones genéticas que dan lugar a alteraciones que activan los protooncogenes e inactivan los genes supresores de tumores. Las alteraciones genéticas, a su vez, pueden ser heredadas como mutaciones de la línea germinal o como mutaciones somáticas adquiridas. Estas últimas podrían ocurrir como resultado de la exposición a carcinógenos ambientales, ya sean físicos (radiaciones ionizantes excesivas), químicos (hidrocarburos policíclicos, nitrosoureas) y/o biológicos (virus) (Russo y Russo, 2000). El factor hormonal, representado fundamentalmente por el estímulo estrogénico, desempeña un importante papel en la génesis del cáncer de mama. Los estrógenos actúan como promotores o inductores del crecimiento del cáncer de mama sólo cuando la transformación maligna ya se ha iniciado (González, 2000). El devenir de una célula normal a tumoral transcurre por mecanismos desconocidos, pero que parecen estar relacionados con dos procesos opuestos: desdiferenciación y envejecimiento (Iglesias y Veiras, 2000). No hay un patrón definido en los cambios bioquímicos que acompañan a una manifestación tumoral, pero se podría realizar una aproximación:

- ❖ Aumento del catabolismo glucídico.
- ❖ Modificación del metabolismo lipídico.

- ❖ Aparición de vías metabólicas no usuales.
- ❖ Modificación del metabolismo proteico:
 - ✓ Aumento de la síntesis de ácidos nucleicos.
 - ✓ Aparición de las isoenzimas fetales.
 - ✓ Desarrollo de antígenos tumorales.

Existen una serie de factores que pueden aumentar o disminuir el riesgo de cáncer de mama, aunque un factor de riesgo no es suficiente para que aparezca un tumor ni es equivalente a un factor causal. Está claro que la etiología es desconocida y el 80% de los cánceres de mama no tienen riesgo explicado, aunque aparentemente el cáncer de mama depende de una conjunción de ellos. Dos grandes grupos de factores de riesgo íntimamente relacionados se consideran los más importantes. Por un lado, están los factores hormonales y por otro se encuentran los factores ambientales entre los que se incluyen aspectos como la dieta, xenoestrógenos, los hábitos tóxicos etc., que van a influir en el riesgo de padecer cáncer de mama a través de las modificaciones que ejercen en el perfil hormonal. Otro factor importante, aunque poco significativo desde el punto de vista estrictamente numérico, es el factor genético y familiar, ya que nos puede ayudar a comprender algunos mecanismos del desarrollo tumoral. También se pueden considerar factores de riesgo la patología mamaria benigna y los antecedentes personales de cáncer.

a. Factores hormonales

La edad y el sexo son los factores de riesgo más importantes, ya que el riesgo de cáncer de mama aumenta conforme va aumentando la edad y el 99% de los cánceres de mama aparecen en mujeres (Zamora *et al.*, 2001). La menarquia precoz y la menopausia tardía son factores de riesgo en la mujer al existir una actividad ovárica más prolongada en estas mujeres. La menopausia precoz tiene un fuerte efecto protector del cáncer de mama, mientras que el riesgo aumenta un 50% si la menopausia ocurre después de los 55 años (Surakasula *et al.*, 2014). Las mujeres que no han tenido hijos tienen un mayor riesgo que las que sí han tenido hijos, aunque parece desaparecer después de los 45 años. En un embarazo a término, la diferenciación que experimenta el tejido mamario como consecuencia de los múltiples cambios hormonales confiere a estas células diferenciadas una mayor resistencia a la transformación maligna, mientras que, en un embarazo incompleto, la mama sólo se expone a los niveles

elevados de estrógenos del principio de la gestación, lo que puede ser responsable del mayor riesgo observado en estas mujeres (Guinee, 2000). Algunos autores consideran que si la lactancia materna es prolongada se reduce el riesgo de cáncer de mama en la mujer premenopáusica, aunque en la actualidad los estudios sobre lactancia materna ofrecen resultados contradictorios (De Silva *et al.*, 2010). El establecimiento de ciclos ovulatorios regulares presenta una fuerte asociación con el riesgo de aparición de cáncer de mama, mientras que ciclos menstruales menores de 26 días o mayores de 39 días disminuyen este riesgo (Winer *et al.*, 2001). El ejercicio físico se ha asociado con una disminución del riesgo de cáncer de mama ya que puede disminuir el número de ciclos ovulatorios. En cuanto a la administración de hormonas exógenas en forma de tratamiento hormonal sustitutivo y de anticonceptivos orales el riesgo de cáncer de mama no se ha establecido, ya que los resultados son dispares y contradictorios. Se tiende a comparar el efecto cuantitativo de la terapia hormonal sustitutiva con la prolongación de la edad de la menopausia, por lo que existiría un aumento de la mortalidad por cáncer de mama debido al uso de hormonas. Sin embargo, los estudios han indicado una disminución del riesgo en la mortalidad por cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas usuarias de hormonas. Según Hulka y colaboradores (1994), el uso de la estrogenoterapia sustitutiva postmenopáusica puede producir un aumento leve en el riesgo de cáncer de mama que decae después de suspender el consumo. El riesgo máximo se observa en las pacientes que utilizaron estrógenos durante más de quince años. También existen diversos informes que indican que las mujeres en las que se desarrolla un cáncer de mama mientras están recibiendo terapia estrogénica sustitutiva parecen tener un mejor pronóstico que las mujeres que no han recibido estrógenos (Palacios, 2002). En cuanto a los anticonceptivos orales por sí mismos, excluyendo los factores de riesgo asociados (retraso del primer embarazo o no existencia del mismo, tipo de alimentación, etc), no parecen aumentar el riesgo relativo de cáncer de mama (Fernández y Lombardía, 2002).

b. Factores ambientales

Clásicamente se ha hablado de factores dietéticos como el consumo de grasa e ingesta de alcohol como factores de riesgo de esta enfermedad. El etanol parece aumentar el riesgo, probablemente por el aumento de los niveles de estradiol en la fase periovulatoria. Sin embargo, en cuanto a la ingesta de grasa no hay estudios concluyentes; en la mayoría no parece haber asociación entre riesgo de cáncer de mama y el consumo de grasa en adultos, aunque no se descarta un efecto durante la infancia o la adolescencia y en la postmenopausia (Falcón y Falcón, 2002). El tabaco parece que sí aumenta el riesgo relativo e incluso algunos

trabajos describen el aumento de la agresividad del tumor (Zamora *et al.*, 2001). La exposición a radiaciones ionizantes es un factor de riesgo, dependiendo de la dosis total y de la edad de exposición. Los xenoestrógenos pueden actuar modificando la producción y el metabolismo de los estrógenos, por lo que pueden tener su papel en el aumento de cáncer de mama en las sociedades industrializadas (Xercavins *et al.*, 2003).

c. Factores genéticos y familiares

Los factores hereditarios representan un 30% en los tumores diagnosticados antes de los 30 años y entre un 5-10% del total de los cánceres de mama. Respecto al riesgo familiar se ha estimado en un 20-30% de los casos (Lynch *et al.*, 2000). Existen tres genes supresores de tumores asociados a cáncer de mama: *BRCA1*, *BRCA2* y *BRCA3*, los cuales producen proteínas que se usan en la reparación del ADN que presenta daño de cadena doble. Una única mutación en *BRCA1*, por ejemplo, aumenta el riesgo en las mujeres de desarrollar cáncer de mama y también se sabe que cánceres de mama asociados a *BRCA1* son tumores altamente proliferantes y de mayor grado (Dahiya y Deng, 1998). En algunos estudios morfológicos se ha sugerido que tumores *BRCA1* difieren de tumores *BRCA2* y de cáncer de mama esporádico (Osin y Lakhani, 1999).

d. Enfermedad benigna de la mama

Las lesiones benignas no proliferativas no se asocian a un mayor riesgo de cáncer de mama, sin embargo, las lesiones proliferativas sin atipias conllevan un pequeño riesgo (Guinee, 2000).

e. Antecedentes personales de cáncer

Las pacientes tratadas por un tumor primario de mama tienen un riesgo de desarrollar un segundo cáncer de mama de 3 a 5 veces más alto que la población general al igual que si hay antecedentes de carcinoma de ovario, carcinoma endometrial o cáncer de colon (Winer *et al.*, 2001).

1.1.4.3 Diagnóstico del cáncer de mama

Por la historia natural del cáncer de mama, se sabe que desde las lesiones precancerosas hasta su diseminación sistémica transcurren de diez a quince años como media y que existe una fase preclínica en la que el tumor es detectable, la cual dura de uno a tres años. Es en esta fase en la que se practica fundamentalmente el diagnóstico precoz, el cual pone de manifiesto tumores localizados y muchas veces ocultos de menos de 1-2 cm, sin afectación

ganglionar, lo cual disminuye significativamente la mortalidad en mujeres de 40 a 65 años (Román *et al.*, 1998). La principal posibilidad de alterar la evolución natural del cáncer de mama es conseguir un diagnóstico temprano, en estadios precoces, cuando el pronóstico de curación es excelente. El correcto enfoque de una mujer con sospecha de padecer un cáncer de mama incluye la confirmación diagnóstica, la evaluación del estadio de la enfermedad y por último la decisión de una estrategia terapéutica.

Siguiendo la clasificación histológica de la OMS de los tumores mamarios malignos, podemos dividir a los tumores epiteliales según la clasificación mostrada en la **Tabla 1.1**.

Las tres pruebas de cribado más importantes para la detección precoz del cáncer de mama son: la autoexploración mamaria, el examen clínico y la mamografía (López y Rodríguez, 2002). La mamografía es el método de cribado más efectivo para la detección de lesiones no palpables y cánceres de mama mínimos, pero no es efectiva al 100% (Cristóbal y Quevedo, 1998). La ecografía es un método de diagnóstico complementario especialmente útil en el diagnóstico y estudio de las lesiones quísticas. La resonancia magnética es la más prometedora de las nuevas técnicas diagnósticas aplicadas al estudio de la mama ya que permite la estadificación de lesiones mal definidas mediante la mamografía o la ecografía, así como para la búsqueda de tumores ocultos en pacientes en las que se sospecha de cáncer de mama. Actualmente existen otras técnicas en estudio y desarrollo: interpretación mamográfica por ordenador (telemamografía) y mamografía digital donde se sustituye la placa radiográfica por una imagen digital que puede ser manipulada para aumentar así su sensibilidad (Zamora *et al.*, 2001).

Una vez establecido el diagnóstico de sospecha por pruebas clínicas y/o de imagen se ha de confirmar dicho diagnóstico mediante una biopsia y, tras confirmar la naturaleza neoplásica de la lesión, ha de realizarse un estudio de extensión para determinar si existe enfermedad a distancia.

Por último, en función del estadio de la enfermedad, se decide la estrategia terapéutica adecuada en cada caso. Existen dos formas de llevar a cabo el diagnóstico de la lesión mediante el estudio anatomopatológico de la muestra: una se realiza inmediatamente después de obtener la muestra, a fin de recabar información de utilidad para orientar al cirujano y cuyo estudio sirve primordialmente para distinguir las lesiones benignas de las malignas; y la otra forma o forma diferida, se trata de un estudio extemporáneo, para permitir el estudio pausado,

utilizando la fijación adecuada de la muestra y procediendo al estudio microscópico, una vez obtenidos cortes histológicos permanentes.

Tabla 1.1. Tipos de cáncer de mama		
Tipo		Características
<i>In situ</i>	Ductal (CDIS)	Proliferación epitelial que no sobrepasa el límite de la membrana basal, con mitosis más numerosas que en las hiperplasias atípicas y donde es muy característico el solapamiento nuclear. Se han descrito cinco subtipos de CDIS: comedoniano, sólido, cribiforme, papilar y micropapilar.
	Lobulillar (CLIS)	Proliferación epitelial de células pequeñas que no sobrepasan la membrana basal y que van a rellenar ductos terminales y ductúlos, cuyo volumen suele ser mayor que el de los no afectados.
Microinvasores		Existe presencia de invasión focal por células mioepiteliales alrededor de las sospechosas.
Invasores	Ductal	La invasión de los tejidos normales adyacentes es por células epiteliales propias de los conductos mamarios. La mayor parte de la masa tumoral no posee rasgos especiales, excepto tendencia variable a formar estructuras glanduloides y mostrar signos de secreción. Existen dos tipos de carcinomas ductales invasores: inespecíficos y especiales, como el tubular, medular, mucinoso, metaplásico, epidermoide, papilar, apocrino, con células gigantes osteoclastoides y con diferenciación endocrina.
	Lobulillar	Se suele diferenciar del ductal, tanto por las características de sus células, como por el patrón de invasión.
	Combinados ductal-lobulillar	
	Inusuales	Tienen una presentación clínica inusual, como el ductal invasor asociado con enfermedad de Paget mamaria, inflamatorio, oculto con metástasis ganglionar, en tejido mamario ectópico o en la gestación y lactancia.

La mayoría de los cánceres de mama son neoplasias epiteliales puras, es decir carcinomas, y se suelen originar en la unidad ducto-lobulillar terminal. Al proceder de una glándula, se denominan más adecuadamente adenocarcinomas. Existen otros tipos tumorales malignos que no son epiteliales puros, como el tumor filoides maligno (mixto epitelial y mesenquimal), o son no epiteliales y muy poco frecuentes como: sarcomas, linfomas, tumores cutáneos, tumor de células granulares y los tumores metastásicos en la mama.

1.1.4.4 Pronóstico del cáncer de mama

En el cáncer de mama no existe ningún marcador específico, por lo que se han estudiado un gran número de parámetros con el fin de establecer un pronóstico que pueda indicar una estrategia terapéutica eficaz y predecir la supervivencia. A pesar de las innumerables investigaciones en este sentido, actualmente no existe un consenso para caracterizar un perfil que determine un número determinado de parámetros con los que poder obtener una sensibilidad y especificidad óptimas para su uso clínico y que explique el curso de la enfermedad en todos los casos de cáncer de mama. El conocer el pronóstico de un tumor es muy complicado, pero de gran utilidad para poder planificar el tratamiento y el seguimiento del paciente. En la actualidad, a fin de establecer un índice pronóstico efectivo, se necesita realizar y conjugar criterios clínicos, histopatológicos, biológicos, bioquímicos e inmunohistoquímicos del tumor. Existen una serie de factores pronóstico, analizados por diferentes autores, de los que se obtienen similares conclusiones y que podemos dividir en clínicopatológicos y moleculares.

a. Factores pronósticos clínicopatológicos

Históricamente, el tamaño tumoral, junto con la afectación de los ganglios regionales y la presencia de metástasis, se consideraron como únicos determinantes del curso clínico del cáncer de mama.

- ❖ El tamaño tumoral, referido al máximo tamaño de los componentes invasivos medidos en secciones microscópicas, correlaciona con el número de nodos involucrados histopatológicamente, pero tiene independiente significado pronóstico. Así pacientes con nodos negativos y tamaño tumoral menor de 1 cm, tienen un pronóstico favorable (Styblo y Wood, 2000; Grases, 2003).
- ❖ El factor pronóstico mejor establecido es el número de ganglios linfáticos axilares positivos, así, la mayoría de los oncólogos piensan que todas las mujeres con ganglios

linfáticos comprometidos deben recibir una terapéutica adyuvante (Galimberti *et al.*, 2000).

- ❖ Factores patológicos como invasión linfática y vascular y la frecuencia de necrosis son importantes factores pronósticos en series individuales, pero está limitado por pobre reproducibilidad como ocurre con otro factor pronóstico como es el grado tumoral (Hemachandran *et al.*, 2002).
- ❖ El valor pronóstico de la angiogénesis va a depender de la zona del tumor que se evalúa, demostrándose un pronóstico más desfavorable en pacientes con tumores asociados con actividad angiogénica elevada. Entre los factores angiogénicos testados a nivel de tejido tumoral, VEGF parece ser el único que proporciona la información pronóstica más relevante (Gasparini, 2001).
- ❖ Entre los factores clínicos se encuentra la edad de los pacientes y el estado hormonal, siendo un factor pronóstico adverso en mujeres de menor edad o embarazadas, o en premenopáusicas (Winer *et al.*, 2001).

b. Factores pronósticos moleculares

Un marcador tumoral es una aberración biológica que se expresa por alteraciones bioquímicas o metabólicas que preceden o señalan la presencia de un tumor. Constituyen un grupo de moléculas involucradas en los eventos de señalización, división, diferenciación y muerte celular (Larrad y Louredo, 2002). Es importante señalar que la mayoría de estos marcadores no son específicos de una enfermedad cancerosa determinada, pudiendo encontrarse en otras patologías distintas. Los marcadores tumorales permiten el estudio de detección de tumores en personas de alto riesgo, establecen el diagnóstico de neoplasia, controlan la eficacia del tratamiento, detectan con prontitud las recaídas y consiguen la inmunodetección de las localizaciones metastásicas utilizando anticuerpos marcados radiactivamente frente a los marcadores. Los marcadores de cáncer de mama pueden clasificarse según el aspecto biológico sobre el que informan:

Hormonodependencia

De las medidas bioquímicas, los factores pronóstico moleculares más importantes son la presencia o ausencia de receptores de estrógenos (RE) y receptores de progesterona (RP) en el tumor. El estatus del RE es una medida de capacidad proliferativa y del potencial

metastásico, además de ser un factor predictivo para terapia hormonal y también pronóstico (Russo y Russo, 2000). La determinación de estos receptores hormonales se efectúa por métodos bioquímicos o inmunohistoquímicos considerando el porcentaje de células que se tiñen y la intensidad con que lo hacen (Grases, 2003). La presencia de RE y RP es indicadora de tumores menos agresivos y de mejor pronóstico (Badowska-Kozakiewicz et al., 2015). El 60% de los RE⁺ responden a la terapia endocrina, mientras que sólo un 10% de los negativos lo hace. Si el tumor además de ser RE⁺, es RP⁺, responde un 77% de las veces a dicha terapia. Sólo un 10% de los RE⁻ y RP⁻ responden a la terapia (Calero, 2003). Existen otros factores de segunda generación para el pronóstico molecular que surgieron con posterioridad a los receptores hormonales de estrógenos y progesterona. Así, la expresión de la proteína pS2 (inducida por los estrógenos) en el citoplasma de las células tumorales es indicativa de buen pronóstico y de mejor respuesta al tamoxifeno. La expresión de Bcl-2 se asocia con la expresión de receptores para estrógenos y se acompaña de mayor supervivencia sin recaída y mejor respuesta al tamoxifeno (López y Roldán, 2002).

Crecimiento del tumor

Existe una relación directa entre crecimiento y agresividad; a mayor proliferación, mayor agresividad. Los métodos directos de medida son el índice de marcación con timidina tritiada, que indica el porcentaje de células que están sintetizando ADN o en fase S, y el grado de ploidía obtenido por citometría de flujo. Como métodos indirectos se utilizan la detección mediante inmunohistoquímica de ciertas proteínas que se expresan durante fases específicas del ciclo celular, como el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y el Ki-67 (López y Roldán, 2002). PCNA es una ciclina que aparece en el núcleo cuando éste se halla en fase S y su incremento en un tumor se ha relacionado con el riesgo de reincidir (Tjalma et al., 2001). El anticuerpo Ki-67 (MIB-1), es un anticuerpo monoclonal que reacciona con el antígeno nuclear Ki-67 que sólo se detecta en las células en proliferación y no en las que están en reposo. Su síntesis se inicia en la fase G1 del ciclo celular y adquiere su máxima expresión al final de la fase S. La expresión del antígeno nuclear Ki-67 es un indicativo de alto riesgo de recurrencia de la enfermedad (Grases, 2003), que está en relación con el tamaño tumoral, pero no con el grado histológico. Ki-67 se encuentra sobreexpresado en más del 50% de las células tumorales de un paciente. Existen otros marcadores de proliferación celular como las ciclinas, que también son estudiadas mediante técnicas inmunohistoquímicas, y las proteínas que forman parte de regiones organizadoras nucleolares (AgNOR), que son estudiadas por técnicas histoquímicas empleando sales de plata. Su análisis toma en consideración el estatus

del ciclo celular y tiene significación pronóstica cuando se toma en cuenta la valoración de las células activas o inactivas (Kruger, 2000). El índice mitótico referido al número de células detenidas en fase M, respecto del número total de células, es otro factor pronóstico utilizado en la clínica, puesto que se reduce con el uso de agentes antitumorales (Ikeda *et al.*, 2000).

Oncogenes/Factores de crecimiento

Los protooncogenes tienen un papel fisiológico esencial en el tejido normal, estando involucrados en la regulación de la proliferación celular y la diferenciación. Dichos genes codifican proteínas que regulan las rutas de señalización necesarias para la estructura, crecimiento y actividad mitótica de las células. Así, un protooncogén es un gen celular normal que, cuando se altera en su estructura o expresión, es responsable del inicio y mantenimiento del fenotipo maligno. Por tanto, los oncogenes se refieren a aquellos genes cuya activación puede contribuir al desarrollo del cáncer. La activación de estos oncogenes puede ser provocada, bien por mutación, por translocación cromosómica, o bien, por amplificación e inactivación de genes reguladores. En general, cualquier alteración de un protooncogén en un tumor maligno indica mayor agresividad y peor pronóstico. De la multitud de oncogenes identificados, una alta proporción han sido agrupados como factores de crecimiento. Los factores de crecimiento y sus receptores juegan un papel importante en el control de la proliferación celular del cáncer de mama (Dickson y Lippman, 1995). La expresión del factor de crecimiento epidérmico ErbB1 y sus receptores se asocia con un pronóstico desfavorable y resistencia hormonal en pacientes con ganglios linfáticos positivos y negativos (Holbro *et al.*, 2003). ErbB2 (oncoproteína HER-2/neu), se encuentra sobreexpresada en un 20% de los casos y se asocia con un pronóstico desfavorable, menor tiempo libre de enfermedad y menor tasa de supervivencia (Hamilton y Piccart, 2000; Lohrisch y Piccart, 2001; Wang y Hung, 2001). En pacientes con ganglios linfáticos positivos donde se coexpresa con receptores para el factor de crecimiento epidérmico, el pronóstico es particularmente malo (Pegram *et al.*, 1998). Esta sobreexpresión de ErbB2, se traduce también en un incrementado riesgo de metástasis y resistencia a muchos tipos de terapia (Eccles, 2001). La sobreexpresión del factor de transcripción c-Myc contribuye al desarrollo de cáncer de mama y se asocia con una reducción de la supervivencia libre de enfermedad y de la supervivencia global. En la actualidad están en estudio otros factores como IGF (factor de crecimiento insulínico), IGF-r (receptor de IGF) y TGF α (factor de crecimiento transformante α), pero por el momento no hay datos definidos sobre su valor pronóstico (Esteva y Hortobagyi, 2004).

Genes supresores de tumores

Los productos de estos genes inhiben la formación de tumores y, cuando estos productos son defectuosos o se pierden en la célula, permiten el desarrollo de un tumor. Las funciones de los genes supresores de tumores incluyen el control de las actividades normales de la célula, como proliferación, diferenciación y la senescencia. Las alteraciones de estos genes supresores de tumores, como las explicadas en los oncogenes (mutaciones, pérdida de función, etc.), son las responsables del desarrollo del cáncer. Los genes supresores de tumores codifican proteínas que, por distintos mecanismos, actúan frenando la proliferación celular. Dos de los más importantes son el Rb y el p53. El gen del retinoblastoma (*RB*) se localiza en el cromosoma 13q14 y codifica una fosfoproteína nuclear de 105 KDa. Aunque la cantidad total se mantiene constante a lo largo del ciclo celular, el estado de fosforilación de la proteína Rb es dependiente del ciclo, siendo esta proteína el principal sustrato de los complejos ciclina-CDK. La proteína Rb se encuentra hipofosforilada en G1 temprano y conforme la célula avanza en G1 se va fosforilando, permaneciendo así en S, G2 y M. La forma hipofosforilada parece ser la forma funcionalmente activa de Rb. La fosforilación de ésta conlleva a la liberación del factor de transcripción E2F, que estimulará la transcripción de una serie de genes que permiten la progresión a través del ciclo celular. La alteración del funcionamiento de Rb es uno de los hallazgos más comunes en todas las líneas celulares tumorales y en los tumores clínicos (Rodríguez y Rodríguez, 2000). El gen *TP53* está localizado en el cromosoma 17p13 y codifica una proteína nuclear con una masa aparente de 53 KDa, que en su forma normal se encuentra presente en muy bajas concentraciones y juega un importante papel en la supresión tumoral, pudiendo intervenir en el control de la transcripción, ciclo celular y apoptosis (Elledge y Allred, 1998; Jeffrey *et al.*, 2003). Bajo condiciones normales, p53 actúa como un regulador de la división celular y, cuando se daña el ADN, por efectos de quimioterapia o irradiación gamma, se asocia con un rápido incremento en el contenido celular de la proteína (Levine, 1997). Cuando p53 es activado puede interactuar directamente con el ADN para producir la transcripción de numerosos genes como el p21. Esto provoca la detención temporal del ciclo celular en la fase G1 o en la fase G2/M, previa a mitosis, para permitir la reparación del ADN. El p53 mutado e inactivado está presente en aproximadamente el 50% de las lesiones invasoras de mama, siendo relacionado con mal pronóstico incluso en pacientes con ganglios negativos. Su nivel de expresión es también elevado en lesiones cancerosas preinvasoras, indicando que este gen supresor de tumores se inactiva en las etapas tempranas de la oncogénesis mamaria. En pacientes con cáncer de mama se han encontrado anticuerpos anti-p53 que no diferencian a la proteína silvestre de la

mutada (Garrido y López, 2000). Lenner y colaboradores (1999) llevaron a cabo una evaluación epidemiológica del valor predictivo de autoanticuerpos p53 en cáncer de mama, llegando a la conclusión de que los anticuerpos anti p53 son de importancia para el riesgo de padecer cáncer de mama y el riesgo de morir de cáncer de mama.

Apoptosis

Existen otros factores pronóstico relacionados con la apoptosis como el índice apoptótico, la proteína p53, Bax, Bcl-2, etc (Daidone *et al.*, 1999; Sirvent *et al.*, 2004). Un alto índice apoptótico se relaciona con características celulares malignas y es indicador de proliferación e invasión celular en cáncer de mama (Lipponen, 1999). Bcl-2 es una proteína cuya sobreexpresión está asociada con resistencia a la apoptosis. La expresión de Bcl-2 se asocia con la expresión de receptores para estrógenos (Linjawi *et al.*, 2004) y se acompaña de mayor supervivencia sin recaída y mejor respuesta al tamoxifeno. Sin embargo, su relevancia en la respuesta a radiación tanto *in vivo* como *in vitro* no está aún definida (Belka y Budach, 2002). El valor pronóstico y predictivo de los marcadores apoptóticos en cáncer de mama no está del todo comprendido y no hay evidencias suficientes para modificar tratamientos basándose en estos marcadores de la apoptosis (Jager *et al.*, 2002)

Invasión/Metástasis

Existen determinadas proteínas que están actualmente en estudio, como nm23 (proteína presente en células con menor capacidad metastásica), uPA (activador del plasminógeno de uroquinasa, implicado en los procesos de remodelación del tejido e invasión tumoral) y catepsina D (proteína con actividad promotora del crecimiento), que juegan un papel importante en el control de la membrana basal y en la motilidad celular e invasividad, pudiendo indicar el potencial metastásico del tumor (Dahiya y Deng, 1998; Coradini y Daidone, 2004).

Inestabilidad genómica

La información sobre la inestabilidad genómica la proporcionan entre otros, los microsatélites, la pérdida de heterocigosidad, aberraciones cromosómicas y la ploidía. Aunque todos estos marcadores han sido asociados con transformación maligna en cáncer de mama, sin embargo, no se han encontrado evidencias de la relación causa-efecto con este tipo de cáncer (Stepanova *et al.*, 2003).

1.1.4.5 Invasión y metástasis

Desde el punto de vista molecular, la entrada de una célula en fase proliferativa necesita de una serie de factores de crecimiento y maduración, así como de receptores de estos estímulos y hormonas. En todo este proceso intervienen una serie de protooncogenes que se van expresando a medida que se cumplen los distintos pasos. Así el control estrogénico de los factores de crecimiento y los componentes de la membrana basal y la disfunción progresiva de los mecanismos de adherencia intercelulares y entre las células y sus sustratos, desempeñan un papel fundamental en la progresión tumoral (Dickson y Lippman, 2000). Los procesos que controlan el crecimiento del cáncer de mama no se limitan al tejido canceroso propiamente dicho, sino que depende de una íntima relación entre el tejido tumoral y los tejidos normales del huésped.

Los pasos esenciales para la formación de una metástasis (similares en todos los tumores) han sido resumidos por Ellis y colaboradores (2000) y consisten en los siguientes mecanismos **(Figura 1.11)**:

- ❖ Proliferación de las células neoplásicas tras la transformación neoplásica, sustentada por factores de crecimiento paracrino o autocrino.
- ❖ Procesos de neovascularización o angiogénesis.
- ❖ Regulación a la baja por parte de las células tumorales de la expresión de moléculas cohesivas, aumentando su motilidad y desprendiéndose de la lesión primaria, seguido de la invasión del estroma de la célula huésped.
- ❖ Desprendimiento y embolización de células tumorales aisladas o conglomerados de células tumorales y su transporte en la circulación.
- ❖ Adherencia de las células tumorales a células endoteliales capilares o a la membrana basal subendotelial expuesta.
- ❖ Paso de las células al parénquima del órgano por extravasación, a través de mecanismos similares a los responsables de la invasión tumoral.
- ❖ Proliferación en el parénquima del órgano de las células tumorales en respuesta a estímulos de factores de crecimiento autocrinos y paracrinos.

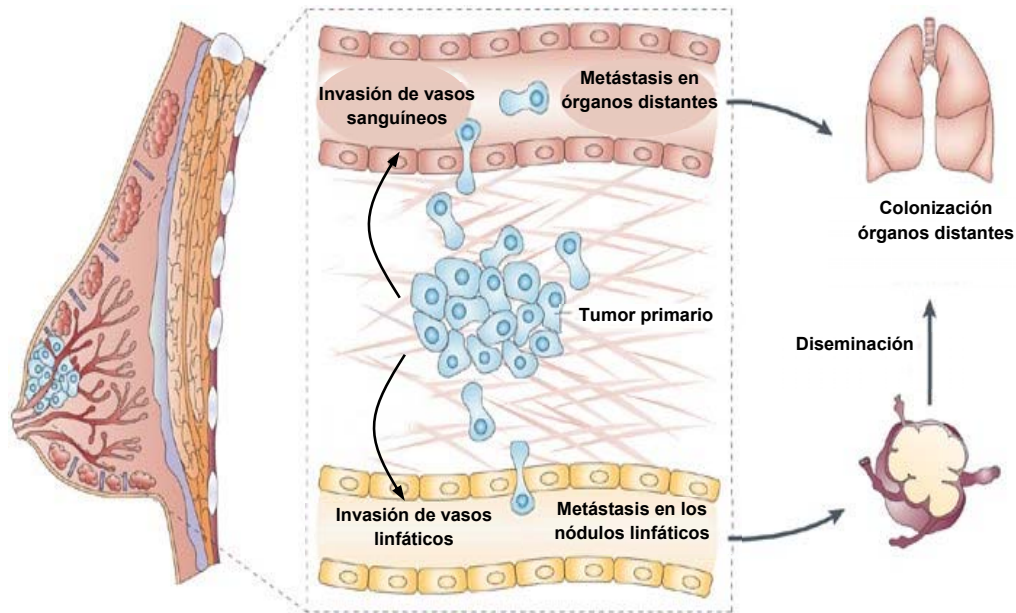


Figura 1. 11. Proceso de metástasis en el cáncer de mama

1.1.4.6 Tratamiento del cáncer de mama

Existen cuatro modalidades de tratamiento: cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia hormonal. La orientación del tratamiento es multidisciplinar y la toma de decisiones debe implicar a un equipo de cirujanos, ginecólogos, radiólogos, anatomopatólogos, oncólogos y médicos de familia.

a. Cirugía

La cirugía conservadora de la mama asociada a radioterapia postoperatoria tiene la misma supervivencia que la mastectomía, aunque con mayor incidencia de reincidencia local (Fowble *et al.*, 2000; Veronesi, 2000). El tipo de tratamiento depende de la extensión del tejido extirpado (Pacheco *et al.*, 2000). La mastectomía radical clásica está en progresivo desuso, reservándose a los casos de tumores avanzados fijos al pectoral mayor (Bland *et al.*, 2000). La mastectomía radical modificada, preservando uno o los dos pectorales, está indicada especialmente en pacientes que rechacen la cirugía conservadora o en casos de tumores infiltrantes más agresivos (Román, 1998; Menke *et al.*, 2000; Bland *et al.*, 2000). Existe un tratamiento neoadyuvante que se administra previamente a la intervención quirúrgica de un tumor, con el propósito principal de reducir la extensión de la cirugía. La quimioterapia

neoadyuvante incrementa la proporción de mujeres que pueden ser tratadas con cirugía conservadora en vez de con mastectomía, mejora la supervivencia de la mujer y puede indicar la quimiosensibilidad del tumor (a mayor sensibilidad, mayor probabilidad de que la quimioterapia modifique la supervivencia de la paciente) (Chacón y Álvarez, 2002). El tratamiento complementario o adyuvante del cáncer de mama es aquél que se administra después del tratamiento quirúrgico, con el fin de destruir o impedir el crecimiento de las micrometástasis, cuya existencia se supone, pero no se puede demostrar en el momento de la cirugía (Chew, 2000). Estos tratamientos coadyuvantes se llevan a cabo mediante quimioterapia, radioterapia y terapia hormonal (Pérez y Martín, 1998; Calero, 2003).

b. Radioterapia

La radioterapia se basa en el empleo de radiaciones ionizantes y su interacción con la materia viva con el fin de destruir un proceso neoplásico. Su objetivo es la irradiación de la zona tumoral, evitando en lo posible los órganos críticos (Moreno y Rodríguez-Escudero, 2003). En pacientes consideradas de alto riesgo tras mastectomía se administra radioterapia sobre pared torácica y áreas ganglionares regionales, ya que aumenta la supervivencia global y disminuye la recaída locorregional incluso entre las que reciben quimioterapia (Navarrete, 2000; Hagan y Mendenhall, 2000). En aquellas pacientes en las que se ha practicado cirugía conservadora, si no se añade radioterapia, aumenta la tasa de reincidencia (Hagan y Mendenhall, 2000). La cirugía conservadora junto con la radioterapia es un tratamiento en estadios precoces con la misma supervivencia que la mastectomía (Lanzós, 1998).

c. Quimioterapia

El objetivo de la quimioterapia es la destrucción del mayor número de células posibles (Moreno y Rodríguez-Escudero, 2003). Tras el análisis de una serie de estudios a muy largo plazo se llegaron a las siguientes conclusiones (De la Cruz *et al.*, 2002):

- ❖ La quimioterapia complementaria mejora la supervivencia libre de enfermedad y también la supervivencia global.
- ❖ La poliquimioterapia es superior a la monoterapia.
- ❖ La quimioterapia de corta duración es igual de efectiva que la de larga duración.
- ❖ La quimioterapia complementaria beneficia a las pacientes premenopáusicas y a las post-menopáusicas, a las que tienen ganglios axilares afectados y a las que no.

- ❖ La combinación de quimioterapia y terapia hormonal es superior a la utilización de cada una de ellas por separado. La combinación de quimioterapia y terapia hormonal tiene mayor tasa de respuesta que si se utiliza la quimiohormonoterapia secuencial, aunque el tiempo hasta la progresión y la supervivencia global de las pacientes suele ser igual con quimiohormonoterapia concomitante o secuencial (Márquez y Alba, 1998).

d. Terapia hormonal

La terapia hormonal se aplica en pacientes con receptores para estrógenos o progesterona positivos, con metástasis óseas o en partes blandas, con intervalo libre de enfermedad prolongado, con enfermedad poco sintomática y en la mayoría de pacientes de edad avanzada (Piera, 1998). Existen diversas opciones con mecanismos de acción distintos que posibilitan el empleo de varias líneas de tratamiento (Cyr y Moulton, 2000). Existen medidas ablativas entre las que destaca la ovariectomía, la hipofisectomía y la adrenalectomía que anulan la función normal de estos órganos, aunque en la actualidad estas técnicas están siendo sustituidas por fármacos, como los análogos de la LH-RH (hormona liberadora de gonadotropina) y los inhibidores de la aromatasa, que provocan una supresión completa de la actividad ovárica y adrenal, respectivamente.

1.2. ANTIFOLATOS

1.2.1. ÁCIDO FÓLICO

El ácido fólico o ácido pteroil-L-glutámico (folato, en forma aniónica), también conocido como vitamina B9, es una vitamina hidrosoluble absolutamente necesaria para el desarrollo normal de los organismos (Assaraf, 2007; Scott, 1999). Las coenzimas derivadas del ácido fólico no pueden ser sintetizadas por las células de los mamíferos, al contrario de lo que ocurre en los organismos procariontes y en las plantas (Stokstad, 1990), por lo tanto, el ácido fólico es un componente esencial que debe de ser incorporado en la dieta. El ácido fólico no posee actividad coenzimática, pero sí 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). La vitamina fue descubierta en los años treinta y se observó que era abundante en los vegetales de hojas verdes, por lo que se denominó ácido

fólico en relación a la raíz latina *folium*, que significa hoja. Esta vitamina se encuentra en las vísceras de animales, verduras de hoja verde, legumbres, frutos secos y granos enteros, y se pierde en los alimentos conservados a temperatura ambiente y durante la cocción. El ácido fólico es la forma más conocida de esta vitamina y es la que normalmente contienen los complejos multivitamínicos. Esta forma oxidada y estable de la vitamina, sin embargo, no está presente en cantidades apreciables en la sangre. Una vez ingerido, el ácido fólico, es reducido eficientemente por la flora intestinal en el intestino delgado. En su forma reducida es absorbido en el yeyuno y, posteriormente, es distribuido a los tejidos a través de la circulación sanguínea, almacenándose en el hígado. Posteriormente se excreta por la orina y las heces. Debido a su almacenamiento en el hígado, el ácido fólico, a diferencia de otras vitaminas hidrosolubles, no es necesario ingerirlo diariamente.

Las funciones fisiológicas del ácido fólico son las siguientes:

- Actúa como coenzima en el proceso de transferencia de grupos monocarbonados.
- Interviene en la síntesis de purinas y pirimidinas, por ello participa en el metabolismo del ADN, ARN y proteínas.
- Es necesario para la formación de las células sanguíneas, más concretamente de glóbulos rojos.
- Reduce el riesgo de aparición de defectos del tubo neural del feto como lo son la espina bífida y la anencefalia.
- Disminuye la ocurrencia de enfermedades cardiovasculares.
- Previene algunos tipos de cáncer.
- Ayuda a aumentar el apetito.
- Estimula la formación de ácidos digestivos.

La deficiencia de ácido fólico se puede manifestar a través de los siguientes síntomas: anemia megaloblástica (los glóbulos rojos inmaduros tienen un tamaño más grande de lo normal), bajo peso, falta de apetito, debilidad, palidez, fatiga, náuseas, diarreas, mal humor, depresión, inflamación y llagas linguales, úlceras bucales, taquicardias, retraso del crecimiento, y aparición de canas en el cabello (Zittoun, 1993). La mejor manera de satisfacer las necesidades diarias de esta vitamina es a través de una dieta que incluya todos los grupos de

alimentos, pero, sin embargo, existen situaciones donde pueden llegar a necesitarse suplementos de ácido fólico. Por ejemplo, el suplemento de esta vitamina está fuertemente aconsejado en mujeres en edad fértil, embarazadas o en lactancia. Una cantidad adecuada de ácido fólico es fundamental para mujeres de edad fértil, ya que previene defectos del tubo neural del feto, entre ellos la espina bífida y anencefalia (Shaw *et al.*, 1995). Todas aquellas mujeres que toman suplementos de ácido fólico, antes de la concepción, reducen en un 50% los riesgos de defectos neurológicos en el futuro bebé. Otros casos en los que se aconseja un suplemento adicional de ácido fólico son: ancianos y personas mayores, personas fumadoras y alcohólicas, personas afectadas con la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa e individuos consumidores habituales de ciertos fármacos como anticonceptivos orales, anti-inflamatorios, sedantes o somníferos, entre otros. Existen ciertos medicamentos que interfieren en el metabolismo del folato disminuyendo su absorción (Baggott *et al.*, 1992; Morgan *et al.*, 1998). Entre ellos se destacan los anti-inflamatorios no esteroides (AINES) (como aspirina o ibuprofeno en dosis diarias altas), los anticonvulsivantes/antiepilépticos (como fenitoína y fenobarbital), los hipolipemiantes que disminuyen los niveles de colesterol (como colestiramina y colestipol), el metotrexato usado para el tratamiento de artritis reumatoidea, psoriasis y ciertos tipos de cáncer, los antihiper glucemiantes (como buformina, fenformina y metformina), los anticonceptivos orales, los diuréticos usados en hipertensión arterial (como triamterene) y antibióticos (como trimetoprima y pirimetamina).

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. Estos tres grupos se muestran en la estructura general de la **Figura 1.12**.

En la estructura del ácido fólico, la 6-metilpterina está ligada a través del grupo amino del PABA, formando el ácido pterico, que está unido a su vez a través de una amida del glutamato, 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 y el grupo γ -carboxilo. La mayoría de las enzimas que utilizan coenzimas de folato se unen más estrechamente a las formas poliglutamatos que a las monoglutamatos. La principal necesidad de los grupos glutamato adicionales corresponde, probablemente, a la retención celular de folatos. Las células

animales capturan folatos mediante transporte activo, pero sólo pueden captar la forma monoglutamato. Sin embargo, esta forma puede transportarse también al exterior de la célula, por lo que la conjugación con otros residuos de glutamato adicionales convierte al folato en una forma que no puede salir de la célula.

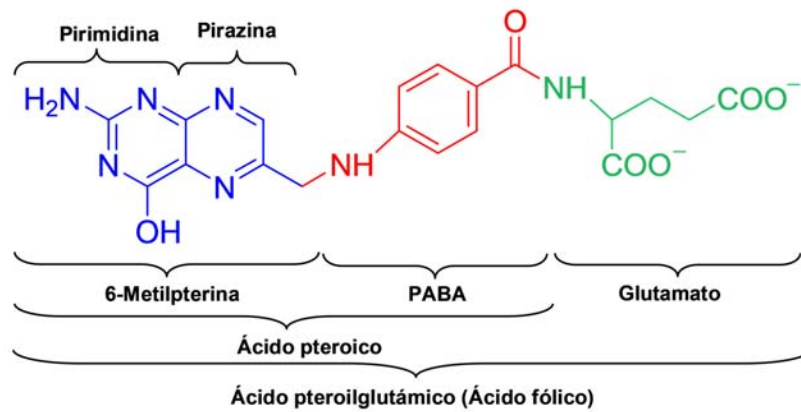


Figura 1.12. Esquema de las partes de la estructura química del ácido fólico.

1.2.2. DIHIDROFOLATO REDUCTASA

Una vez dentro de la célula, el folato se convierte en formas activas mediante dos reducciones sucesivas de la parte de pirazina del anillo de la pterina. Ambas reacciones son catalizadas por la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) específica de NADPH. La primera reducción da lugar a 7,8-dihidrofolato (DHF) y la segunda reducción produce 5,6,7,8-tetrahidrofolato (THF) (**Figura 1.13**). Si bien 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. Así, su inhibición da lugar a un bloqueo de la síntesis, metilación y reparación del ADN, llevando a la muerte celular por apoptosis. Esto hace que esta enzima sea muy interesante como diana para fármacos, no sólo para células tumorales, sino también a nivel de hongos, protozoos, bacterias o células que padecen algún tipo de reacción autoinmune (Blakley, 1969). La inhibición de la DHFR es la base para la actuación de los antifolatos.

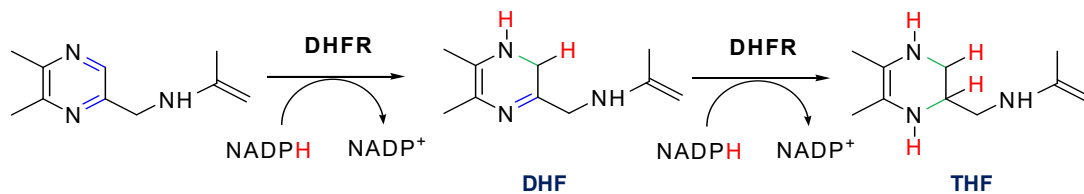


Figura 1.13. Reducción del folato a tetrahydrofolato catalizada por la DHFR.

Se pueden apreciar las dos reducciones consecutivas dependientes de NADPH. En rojo se representan los hidrógenos implicados en ambas reacciones.

1.2.2.1 Mecanismo de acción

El estudio cinético y el mecanismo de acción de DHFR han sido extensivamente estudiados 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 1.14**). Según este mecanismo, y en condiciones de estado estacionario, la reacción global transcurre con la formación de cinco complejos intermedios, observables cinéticamente: el complejo de Michaelis (E/NADPH/DHF), la holoenzima (E/NADPH) y tres complejos en los que intervienen el THF, producto de la reacción (E/THF, E /NADP⁺/THF: E/NADPH/THF). Una de las características de este ciclo catalítico es que la etapa química, la transferencia del hidruro, no es seguida por la salida inmediata del producto, sino que antes de la salida del THF se produce la salida del cofactor oxidado (NADP⁺) y la entrada de otra molécula de NADPH, siendo esta última la etapa limitante de la velocidad. Así, la forma libre de la enzima no se genera durante la reacción y el complejo E/NADPH comienza un nuevo ciclo catalítico.

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 bacteriana y uno de ácido glutámico (Glu-30) en los 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 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 (Cannon *et al.*, 1997). Sin embargo, otros autores

discrepan que pueda ser el Asp-27 o el Glu-30 la procedencia del protón, 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).

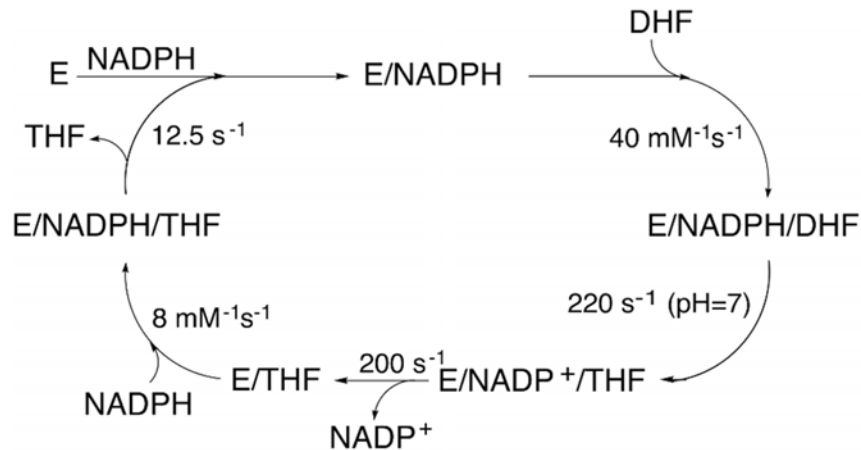


Figura 1.14. Esquema del ciclo catalítico para la reducción del DHFR a THF catalizada por la ecDHFR.

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 la 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; o 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. Sin embargo, cuando la concentración de DHF es muy baja, su unión para la formación del complejo E/NADPH/DHF es la etapa limitante. Por lo tanto, 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⁺.

1.2.2.2 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, y 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).

a. Organización estructural de la DHFR

Los primeros estudios de cristalización se realizaron con la ecDHFR, que es una proteína pequeña (18 kDa) con una estructura constituida por hélices α y láminas β . Esta proteína contiene 8 láminas β (denominadas A-H) y 4 hélices α (denominadas α B, α C, α E, y α F), situadas dos a cada lado, estando estas estructuras conectadas por bucles (**Figura 1.15**). La hendidura del centro activo divide a esta estructura en dos dominios estructurales: el dominio de unión a la adenosina y el dominio principal.

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 consta de aproximadamente 100 residuos desde el amino al carboxilo terminal y contiene un total de tres bucles donde se sitúa la unión a los ligandos alrededor del centro activo. En términos de longitud de secuencia, 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 (constituye los 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 (Bystroff 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.

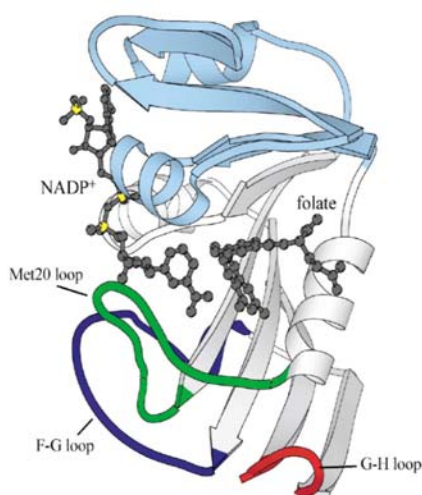


Figura 1.15. Estructura tridimensional de la ecDHFR formando el complejo ternario con folato y NADP+.

Se muestran los distintos bucles del dominio principal de la enzima. El dominio de unión a la adenosina se representa en color azul claro.

b. Conformación del centro activo de la DHFR

El sustrato y el cofactor se unen a una región hidrofóbica en la zona de unión de los dos dominios. En el complejo ternario con NADP⁺ y ácido fólico, el anillo de la pterina del sustrato y el anillo de la nicotinamida del cofactor están muy próximos, con el átomo donador (C4 del NADPH) y aceptor del protón (C6 del anillo de pterina) en distancias óptimas para interacciones de Van der Waals (Bystroff y Kraut, 1991). El bucle Met20 protege al centro activo de su interacción con el disolvente y es el principal componente que determina la estructura del centro activo. Los bucles F-G y G-H juegan un papel estabilizador de la estructura mediante interacciones de puentes de hidrógeno con el bucle Met20. Estudios de rayos X de ecDHFR, libre y unida a varios ligandos, han confirmado que el bucle Met20 puede adoptar cuatro conformaciones características: ocluida, cerrada, abierta y desordenada (Sawaya y Kraut, 1997). 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). Así, si sólo el sitio del sustrato está ocupado, la DHFR adopta la configuración ocluida. La unión del grupo nicotinamida-ribose del cofactor a su sitio de unión promueve la conformación cerrada, en la cual el bucle Met20 se sitúa muy próximo al anillo de la nicotinamida, cerrando así el centro activo y protegiendo a éste de su interacción con el disolvente. Por lo tanto, el movimiento de los bucles está coordinado a lo largo del ciclo catalítico, y solamente la conformación cerrada permite la proximidad del sustrato y el cofactor en el centro activo de la enzima (**Figura 1.16**).

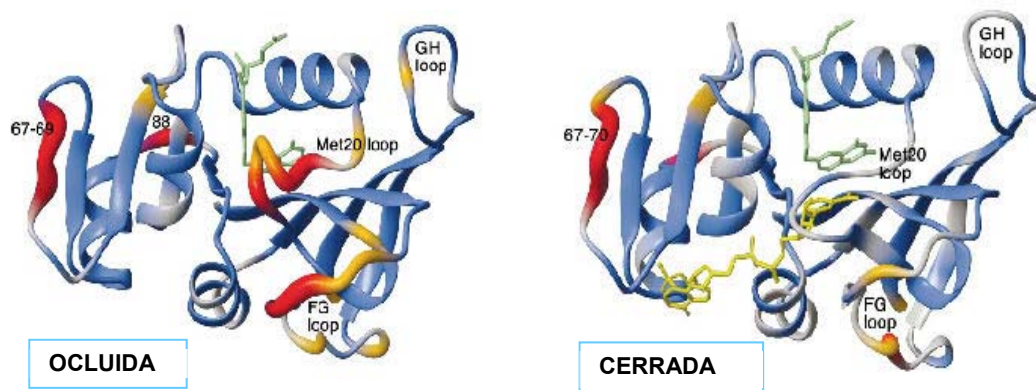


Figura 1.16. Estructura tridimensional de la ecDHFR en su conformación ocluida (izquierda) y cerrada (derecha). El folato y el NADP⁺ se representan en verde y en amarillo, respectivamente.

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 1.15**). 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 de 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.

c. Movimiento de los dominios y los bucles durante el ciclo catalítico

Sawaya y Kraut (1997) propusieron un modelo estructural detallado para los cambios de conformación que ocurren a lo largo del ciclo catalítico. Según este modelo la enzima pasaría por distintas conformaciones, entre cerrada y ocluida, dependiendo del complejo generado (**Figura 1.17**).

Las conformaciones abierta y desordenada serían estados intermedios entre las conformaciones cerrada y ocluida pero no se generarían durante el ciclo catalítico de la

enzima. En todo caso, el cambio entre las distintas conformaciones modularía la actividad de la enzima, así como su unión a sustratos, cofactores y productos.

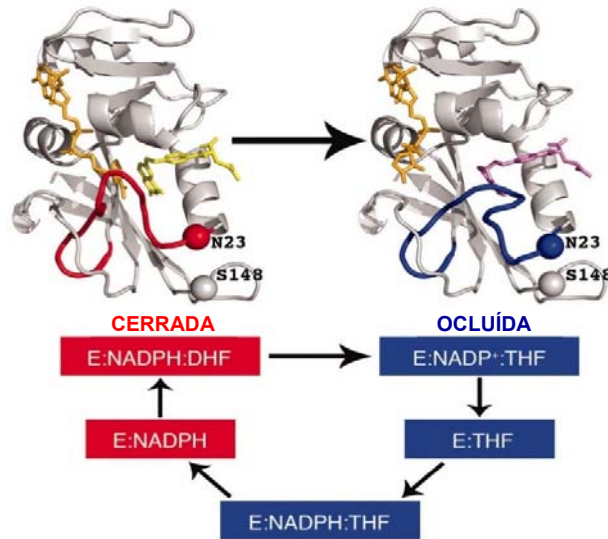


Figura 1.17. Esquema que indica los cambios conformacionales en la estructura tridimensional de la DHFR durante el ciclo catalítico.

1.2.2.3 El gen de la DHFR

El gen de la DHFR (*DHFR*), localizado en el cromosoma 5q11.2-q13.2, contiene 6 exones separados por 5 intrones y una longitud total de 30 kb (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, probablemente cualquier mutación llevaría a la inviabilidad del organismo. Sin embargo, este gen ha sido objeto de un amplio estudio debido a que frecuentemente se ha encontrado amplificado en células que presentan una alta resistencia a los antifolatos (Goker *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 de p53. Es bien conocido que una deficiencia en p53 permite a las células progresar a través del ciclo celular sin reparar su ADN, permitiéndose así la amplificación génica y la aneuploidía (Schimke, 1988). La amplificación del gen de la DHFR, en algunos casos, lleva a la generación de proteínas con mucha menor afinidad por el MTX (Srimatkandada *et al.*, 1989). Estos autores demostraron en células de cáncer de colon resistentes a MTX que la amplificación del gen de la DHFR producía una

proteína que tenía la afinidad por el MTX reducida unas 25 veces. Encontraron que el gen amplificado de la DHFR, a diferencia del gen normal, era resistente a la digestión con la enzima de restricción EcoR1 en una zona de lectura del gen. Los posteriores análisis de los ADNc, sintetizados a partir de los transcritos amplificados, permitieron detectar una mutación que consistía en un simple cambio de base (T → C), lo que generaba una proteína mutada (Phe → Ser). Este residuo de Phe está situado en una zona hidrofóbica que establece contacto con el MTX durante la unión a la enzima y, por lo tanto, esta mutación aumentaba la constante de disociación de la enzima por el MTX desde 150 pM (en la enzima normal) hasta 1.25 nM en la enzima amplificada.

1.2.3. METABOLISMO DEL ÁCIDO FÓLICO

La función coenzimática del THF consiste en la movilización y utilización de grupos funcionales de un carbono. Estas reacciones están implicadas en el metabolismo de la serina, la glicina, la metionina y la histidina, entre los aminoácidos, y en la biosíntesis de los nucleótidos de purina y del grupo metilo de la timina (**Figura 1.18**) (Stokstad, 1990).

El THF une unidades de un carbono, a los niveles de oxidación metilo, metileno y formilo, que equivalen al nivel de oxidación metanol, formaldehído y ácido fórmico, respectivamente (**Figura 1.18**). Los grupos de un carbono sobre el THF pueden transportarse en N⁵ o N¹⁰, o formar un puente entre N⁵ y N¹⁰. La formación de un puente aducto cíclico comporta una deshidratación, por lo que un grupo metileno (-CH₂-) es formalmente equivalente a un grupo hidroximetilo (-CH₂OH) en un compuesto sin formación de puente y un grupo formilo (-CHO) se cicla para pasar a un grupo metenilo (-CH=). Además, hay un aducto monocarbonado de THF (N⁵,N¹⁰-metilen-THF) en el que la unidad de un carbono contiene también un átomo de nitrógeno. En este grupo formimino (-C=NH), el átomo de carbono está al mismo nivel de oxidación que un grupo formilo.

El THF puede captar unidades de un carbono de diversas fuentes. Por ejemplo, muchas células realizan una activación de formato dependiente de ATP para dar lugar a N¹⁰-formil-THF. La degradación de la histidina, tanto en células bacterianas como en los animales, produce N⁵-formimino-THF, al igual que ocurre en la fermentación bacteriana de las purinas. Sin embargo, la mayoría de los organismos obtienen la mayor parte de sus unidades de un carbono activadas a partir del carbono β de la serina y la posterior oxidación de la glicina. La primera de estas reacciones la cataliza la serina transhidroximetilasa (Reacción 10; **Figura**

1.18). Esta reacción es reversible y, en una de la direcciones produce glicina y N^5,N^{10} -metilen-THF, pero puede utilizarse también para la biosíntesis de serina si es necesario.

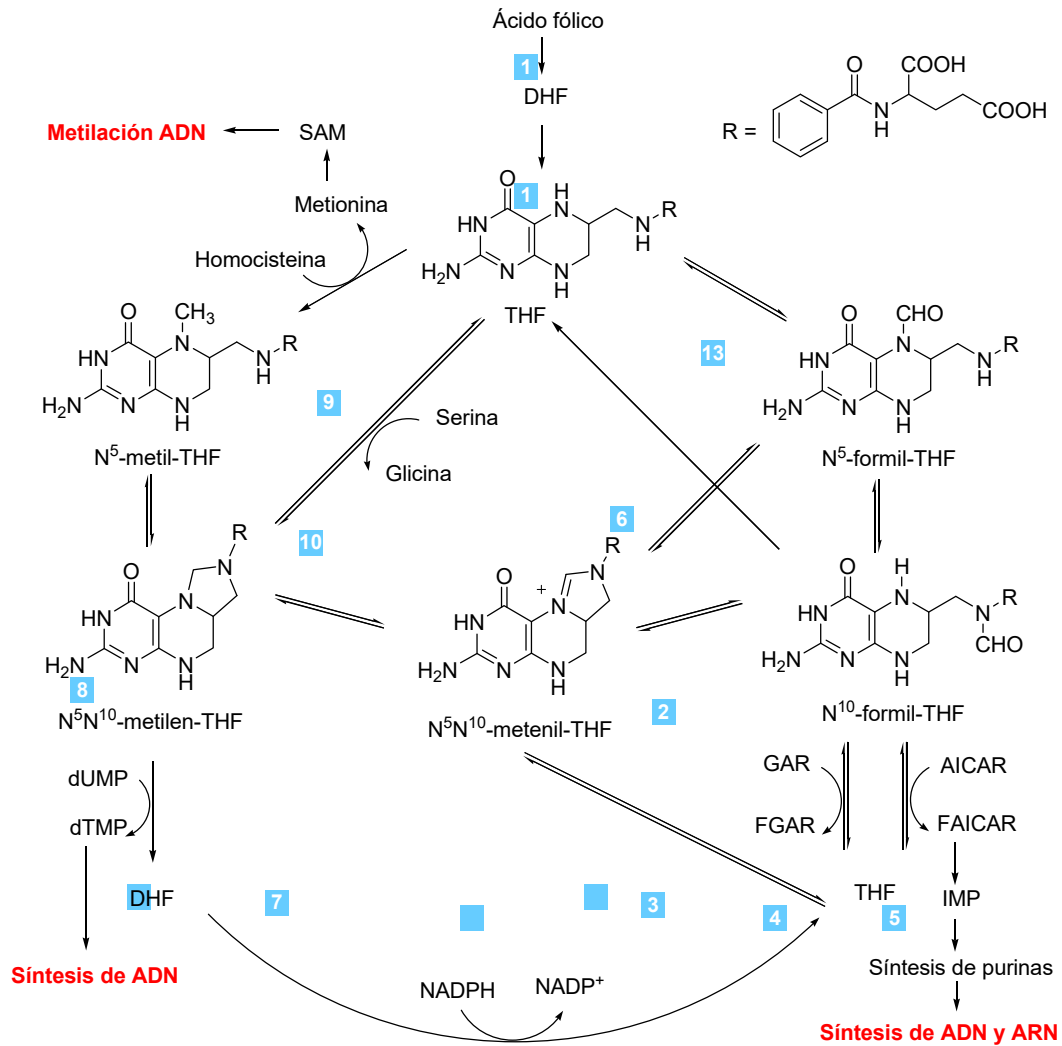


Figura 1.18. Reacciones metabólicas que implican la síntesis, interconversión y utilización de aductos de un carbono del THF.

Las enzimas que intervienen son las siguientes: (1) DHFR; (2) N^5,N^{10} -metenil-THF sintetasa; (3) N^5,N^{10} -metenil-THF ciclohrolasa; (4) GAR transformilasa (GARTF); (5) AICAR transformilasa (AICARTF); (6) N^{10} -formil-THF deshidrogenasa; (7) N^5,N^{10} -metilen-THF deshidrogenasa; (8) N^5,N^{10} -metilen-THF reductasa (MTHFR); (9) metionina sintetasa (MetS); (10) serina transhidroximetilasa; (11) sistema de ruptura de glicina; (12) timidilato sintetasa (TS).

Una vez activada una unidad de un carbono mediante su unión al THF, puede sufrir interconversiones como el cambio de estado de oxidación o puede utilizarse directamente en una reacción de biosíntesis. En la **Figura 1.18** se muestran la mayor parte de las reacciones conocidas en las que intervienen las coenzimas del THF. Se pueden observar las reacciones que comportan un cambio del nivel de oxidación de la unidad de un carbono unida: la oxidación reversible del N⁵,N¹⁰-metilen-THF para producir N⁵,N¹⁰-metenil-THF, catalizada por la N⁵,N¹⁰-metilen-THF deshidrogenasa (Reacción 7; **Figura 1.18**) y la reducción irreversible del N⁵,N¹⁰-metilen-THF al derivado 5-metilo, que la lleva a cabo la N⁵,N¹⁰-metilen-THF reductasa (Reacción 8; **Figura 1.18**). Muchos organismos contienen enzimas multifuncionales o complejos que facilitan la canalización de estos intermediarios escasos e inestables. Así, por ejemplo, la mayor parte de los eucariotas combinan las actividades 3, 4 y 7 en una sola proteína trifuncional.

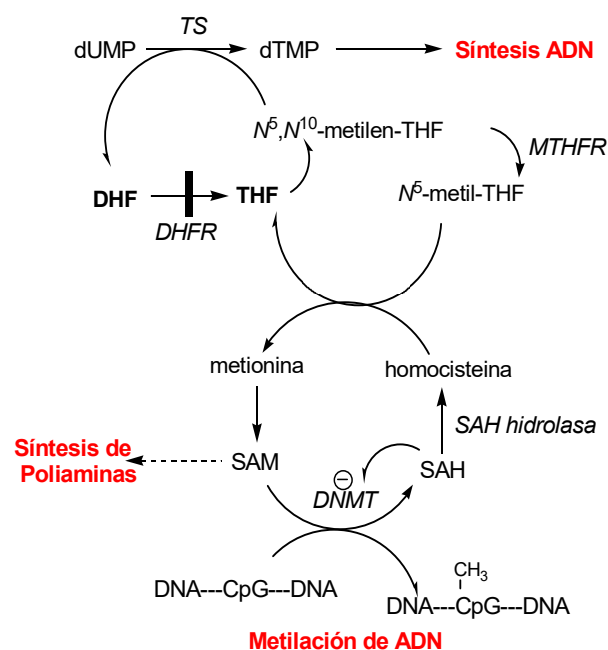


Figura 1.19. Utilización de las coenzimas del THF para la síntesis de ADN y su relación con el ciclo de la metionina.

Las unidades de un carbono procedentes de las coenzimas del THF se utilizan en la síntesis de nucleótidos de purina, nucleótidos de timina (dTMP) y metionina (**Figura 1.19**). En la síntesis de los nucleótidos de timina, catalizada por la timidilato sintasa (TS) (Reacción 12; **Figura 1.18**), la coenzima de THF actúa como donador de un carbono y como fuente de poder

reductor. Dado que esta enzima genera el grupo metilo de la timina a partir del N⁵,N¹⁰-metilen-THF, cataliza una transferencia de un carbono y una reducción. Los electrones proceden del anillo de pteridina reducido para dar DHF como producto. Aunque la DHFR (Reacción 1; **Figura 1.18**) puede actuar sobre el folato o sobre el DHF, la enzima debe de actuar de manera continua para regenerar el THF a partir del DHF que se forma en la reacción de la TS. Esta función explica por qué es el DHF, y no el folato, el sustrato preferido de la enzima.

1.2.4. ANTIFOLATOS

Los antifolatos o antagonistas del folato constituyen una clase de antimetabolitos y son agentes que se utilizan para bloquear la enzima DHFR. Un antimetabolito es un compuesto sintético, generalmente un análogo estructural de un metabolito normal, que interfiere con la utilización del metabolito con el que está relacionado estructuralmente.

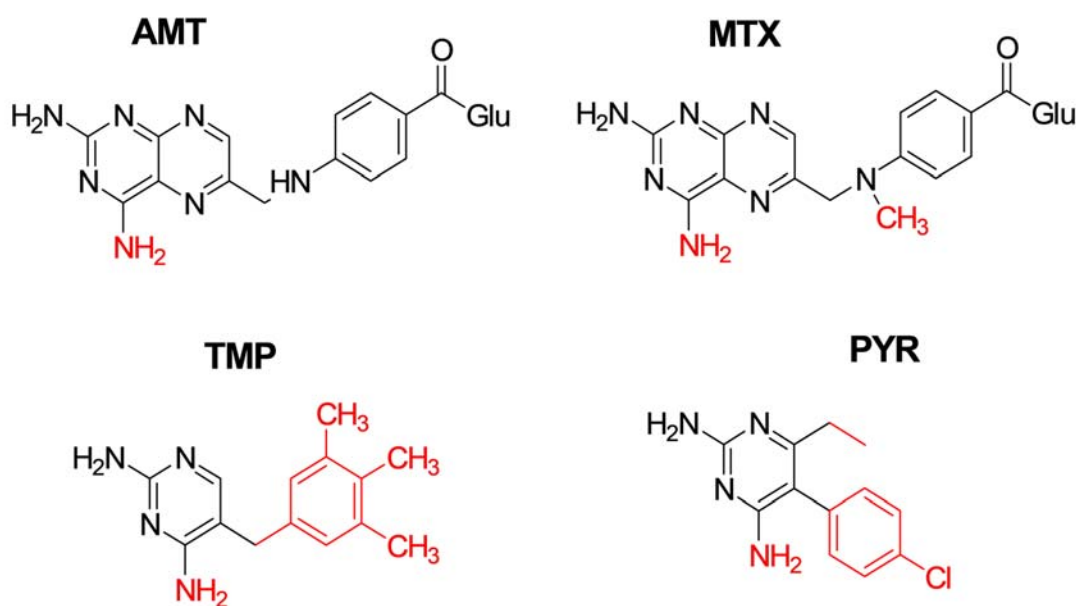


Figura 1.20 Tipos de antifolatos. Clásicos (AMP y MTX) y no clásicos (TMP y PYR).

En 1948 se sintetizaron dos análogos del folato, la aminopterina (AMT) y el metotrexato (MTX), y se observó que inducían remisiones en las leucemias agudas (Farber *et al.*, 1948). Una década después se encontró que estos compuestos inhibían a la DHFR, uniéndose a la enzima con una fuerza al menos 1000 veces superior a la de los sustratos normales. Tuvieron que transcurrir casi dos décadas más antes de que se obtuviera un conocimiento detallado del

mecanismo de inhibición de la DHFR, gracias a la cristalización de los complejos enzima-inhibidor y a la determinación de su estructura tridimensional (Schweitzer *et al.*, 1990). Si bien la mayoría de los antifolatos tienen como diana metabólica 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).

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 clasificados como inhibidores de la DHFR 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.

A pesar de que los antifolatos aparecieron para el tratamiento de ciertas leucemias, el conocimiento detallado de su mecanismo de acción y la aparición de nuevos antifolatos ha hecho que se extiendan sus usos terapéuticos. En la actualidad los antifolatos son utilizados con los siguientes fines:

Quimioterapia anticancerígena. El MTX es el antifolato más ampliamente usado para esta aplicación. Su mecanismo de acción ha sido ampliamente descrito con anterioridad y su uso incluye el tratamiento de cáncer de cuello, cabeza, mama, pulmón y próstata entre otros (McGuire, 2003).

Enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Cada vez es más común el tratamiento de este tipo de enfermedades con bajas dosis de MTX. Actualmente, este compuesto está recomendado para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, la psoriasis, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y ciertas clases de lupus. Se ha observado 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 ciclooxigenasa-2, el TNF α y ciertas citoquinas (Cutolo *et al.*, 2001; Majumdar y Aggarwal, 2001).

Antibacteriano y antiparasitario. Otros inhibidores de la DHFR que son clínicamente útiles presentan una selectividad entre diversas formas de la enzima específicas para distintas especies. Así, la trimetoprima (TMP) combinada con sulfonamidas es una terapia habitual para un gran número de infecciones bacterianas (de Roux y Lode, 2003), mientras que la

pirimetamina (PYR) presenta una especificidad similar frente a la enzima de origen protozoario y se ha utilizado, por ejemplo, para el tratamiento de la malaria (Bell *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta que los cofactores de folato desempeñan papeles esenciales en la síntesis de precursores del ADN, el ARN y las proteínas, cabría prever que la inhibición de la síntesis de THF fuera tóxica para todas las células. Sin embargo, existe un fundamento para la toxicidad selectiva de los antagonistas del folato contra las células que proliferan más activamente, como es el caso de las tumorales. Como se describió anteriormente, la reacción de la TS es la única en la célula que necesita THF pero no lo regenera. Por lo tanto, la inhibición de esta reacción llevaría a un bloqueo en el reciclaje de DHF para producir THF. En estas condiciones, la tasa de oxidación de todos los folatos reducidos intracelulares está directamente relacionada con la actividad intracelular de la TS, la cual está coordinada, a su vez, con la tasa de síntesis de ADN. Así pues, las células que proliferan más activamente necesitan una mayor tasa de replicación del ADN y, por lo tanto, agotan sus reservas de THF más rápidamente que las células que no proliferan. A pesar de esta selectividad sobre células de proliferación rápida, el MTX también ataca a células normales. Los efectos secundarios nocivos se observan en los tejidos que proliferan en el ámbito de su función normal. Estos tejidos son la mucosa intestinal, las células pilosas y los componentes del sistema inmunitario. Un factor que disminuye la eficacia de los antifolatos es la aparición de variantes celulares que presentan resistencia a este tipo de fármacos.

Durante las últimas décadas, se han sintetizado un gran número de antifolatos (Assaraf, 2007). La síntesis de estos nuevos compuestos ha ido encaminada a generar antifolatos con una mayor potencia de inhibición de la DHFR y evitar los mecanismos de resistencia a los antifolatos clásicos como la AMT o el MTX. A continuación, estudiaremos con más detalle las características del MTX debido a que este compuesto sigue formando parte habitual en las terapias anticancerígenas y a que la resistencia de los melanomas al MTX será objeto de un estudio más detallado durante esta Memoria.

1.2.4.1 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 introducción de un grupo metilo en la posición 10 (Figura 1.20). Estas mínimas alteraciones estructurales respecto al sustrato 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. El

incremento en la afinidad por el inhibidor se atribuye a un incremento de las interacciones del mismo 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 (ácido aspártico en DHFRs bacterianas y ácido glutámico en 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 del MTX tiene que girar 180° respecto al enlace C6-C9, tal y como puede apreciarse en la Figura 1.21, 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).



Figura 1.21. Superposición de la molécula de MTX y de ácido fólico en el centro activo de la ecDHFR. El complejo de la enzima con el MTX en rojo, el de la enzima con el ácido fólico en azul, la molécula de agua en verde y los residuos de aminoácidos implicados en los puentes de hidrógeno con el sustrato en azul y el inhibidor en rojo.

El MTX es un excelente inhibidor de la DHFR ($K_i = 5 \text{ pM}$). 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 $1 \text{ }\mu\text{M}$ (Appleman *et al.*, 1988; Domin *et al.*, 1982; Rosowsky *et al.*, 2000). La base molecular para 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 del DHF por la DHFR está en el rango de $1 \text{ }\mu\text{M}$, la enzima trabaja en cinética de primer

orden sobre su sustrato; esto es, 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 μ M), este 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 1.2.6.

En la actualidad el MTX es el antifolato más ampliamente usado en oncología clínica para el tratamiento de leucemia aguda, linfomas no-Hodgkin's, cáncer de pecho, cáncer de cabeza y cuello, coriocarcinoma, sarcomas osteogénicos y 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, la leucovorina o leucovorin se usa como antídoto en terapias de rescate después de la administración de altas dosis de MTX. La leucovorina compite con el MTX y sus metabolitos por el transporte, la poliglutamilación 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 al que se aplica, especialmente en lo que a tumores sólidos se refiere, la incapacidad de traspasar la barrera hematoencefálica y la ya mencionada resistencia intrínseca y adquirida hacia el MTX que limita su eficacia clínica. Su alta toxicidad general, que produce daños a nivel de la medula espinal, ulceración gastrointestinal y daño hepático y renal (Takimoto, 1996), son otras desventajas del uso del MTX.

1.2.5. TRANSPORTE CELULAR DE FOLATOS Y ANTIFOLATOS

Como se ha descrito anteriormente, la mayoría de los folatos y los antifolatos presentan una o varias cadenas de ácido glutámico y, por lo tanto, se comportan como aniones divalentes a pH fisiológico. Esta característica hace que los folatos y los antifolatos no puedan atravesar libremente las membranas biológicas, necesitando de sistemas de transporte para su incorporación celular. En la actualidad se conocen tres sistemas de transporte que median la entrada de estos compuestos en las células de mamíferos: el transportador de folatos reducidos (RFC), los receptores del ácido fólico (FRs) y los transportadores de folato de bajo pH (PCFT).

1.2.5.1 Transportador de Folatos Reducidos (RFC)

La ruta primaria para el acceso de folatos o antifolatos al interior de las células es el transportador de folatos reducidos (*Reduced Folate Carrier*, RFC; también conocido como SLC19A1). Este transportador tiene mucha mayor afinidad por los folatos o antifolatos en estado reducido que por los folatos oxidados y, por lo tanto, transporta con una mayor eficacia THF, 5-MTHF o MTX que al propio ácido fólico (Sierra y Goldman, 1999). El RFC pertenece a una familia de transportadores (*solute carriers*) donde también se engloban los transportadores de tiamina (SLC19A2 y SLC 19A3) (Ganapathy *et al.*, 2004). Una característica de esta familia de transportadores es que no necesitan la hidrólisis de ATP para mediar el transporte facilitado de la vitamina. Así, el transporte de los folatos o antifolatos se acopla a la entrada de H⁺ o a la salida de OH⁻ (Ganapathy *et al.*, 2004). Este receptor se expresa en todas las células del organismo, sin embargo, se ha encontrado que su expresión es más activa en células absortivas del intestino, riñón y placenta que en otros tejidos. En todas las células, el RFC se encuentra localizado en la membrana plasmática; sin embargo, en algunos casos se ha localizado en la membrana mitocondrial, lo que indica que también podría estar implicado en el transporte de folatos entre el citoplasma y la matriz mitocondrial (Trippett *et al.*, 2001). Estudios realizados para conocer la relación existente entre la estructura y la función de esta proteína indicaron que la región C-terminal es importante para la estabilidad y el tráfico celular de ésta, mientras que la región transmembrana, era fundamental para llevar a cabo su función transportadora (Liu *et al.*, 2003). La importancia de este gen para la supervivencia ha sido puesta de manifiesto en ratones desprovistos de la capacidad de expresar este gen (knockout), ya que su pérdida homocigótica produjo la muerte embrionaria (Zhao *et al.*, 2001).

1.2.5.1.1 Receptores del Ácido Fólico (FR)

El transporte de folatos o antifolatos al interior de las células también está mediado por los receptores del ácido fólico (*Folic Acid Receptors*, FR). Se conocen tres tipos de FRs (FR α , FR β y FR γ), que están codificados por tres genes distintos y que, al parecer, realizan funciones diferentes en las células. Todos ellos son glicoproteínas y presentan una gran afinidad por la forma oxidada del ácido fólico (Elnakat y Ratnam, 2004). Entre ellos presentan una homología del 70-80% y contienen 229-236 aminoácidos, así como, dos o tres sitios de N-glicosilación. FR α y FR β son proteínas de membrana, fuertemente unidos a ella a través de una molécula de glicosil fosfatidil inositol (GPI), mientras que FR γ carece de esta molécula y, por lo tanto, es una proteína de secreción. Los patrones de expresión del FR β están limitados a la placenta y otros tejidos como timo, bazo o células sanguíneas. Sin embargo, el FR α se ha encontrado presente en muchas células de origen epitelial y en estudios recientes ha sido encontrado sobreexpresado en células tumorales con respecto a las células normales de un mismo tejido. Todo esto, ha hecho que el interés por el estudio de este receptor se haya incrementado en los últimos años y, en ocasiones, se le ha relacionado con el transporte de antifolatos en células tumorales e incluso con la resistencia tumoral a estos (Jackman *et al.*, 2004; Kelemen, 2006). Otros estudios han permitido elucidar parte del mecanismo de transporte de folato a través del FR α y se han diseñado estrategias para usar a este receptor como Caballo de Troya para el transporte de drogas o proteínas al interior de las células tumorales (Leamon y Low, 1991; Lee y Murthy, 2007).

a. Mecanismo de transporte de folatos a través del FR α

Al contrario que el RFC, que transporta los folatos reducidos mediante un transporte bidireccional acoplado al transporte de iones, el FR α transporta los folatos mediante endocitosis (**Figura 1.22**); aunque las rutas precisas que usa este transportador no han sido definidas hasta la fecha (Kelemen, 2006).

Algunos autores proponen que el transporte de folatos a través del FR α se realiza a través de una ruta especializada de la pinocitosis (Rothberg *et al.*, 1990). Según este estudio el FR α está concentrado en invaginaciones lipídicas de la membrana plasmática llamadas caveolas. Estos autores observaron que estas concentraciones de FR α no estaban asociadas a vesículas recubiertas de clatrina y que el receptor no se localizaba ni en endosomas ni en lisosomas y, por lo tanto, propusieron el modelo descrito en la **Figura 1.23**.

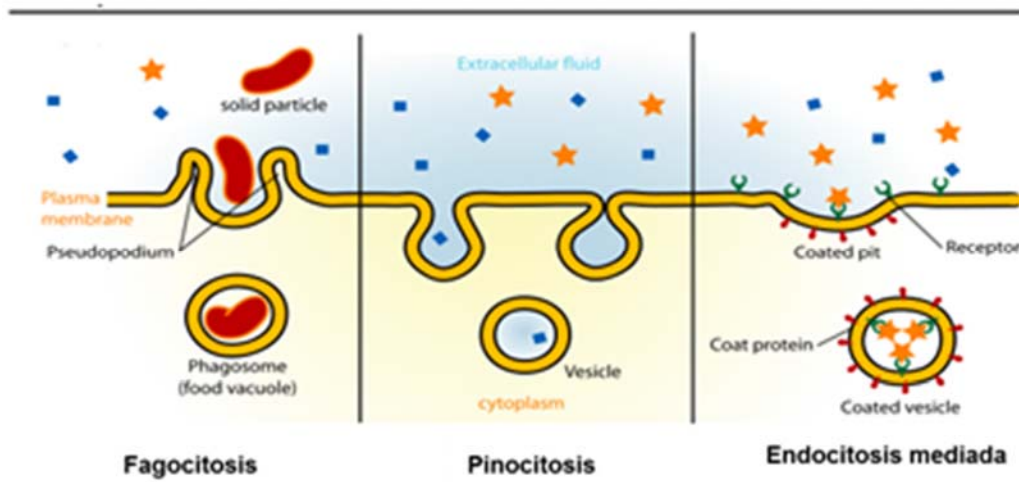


Figura 1.22. Tipos de endocitosis. Fagocitosis, pinocitosis y endocitosis mediada por receptores.

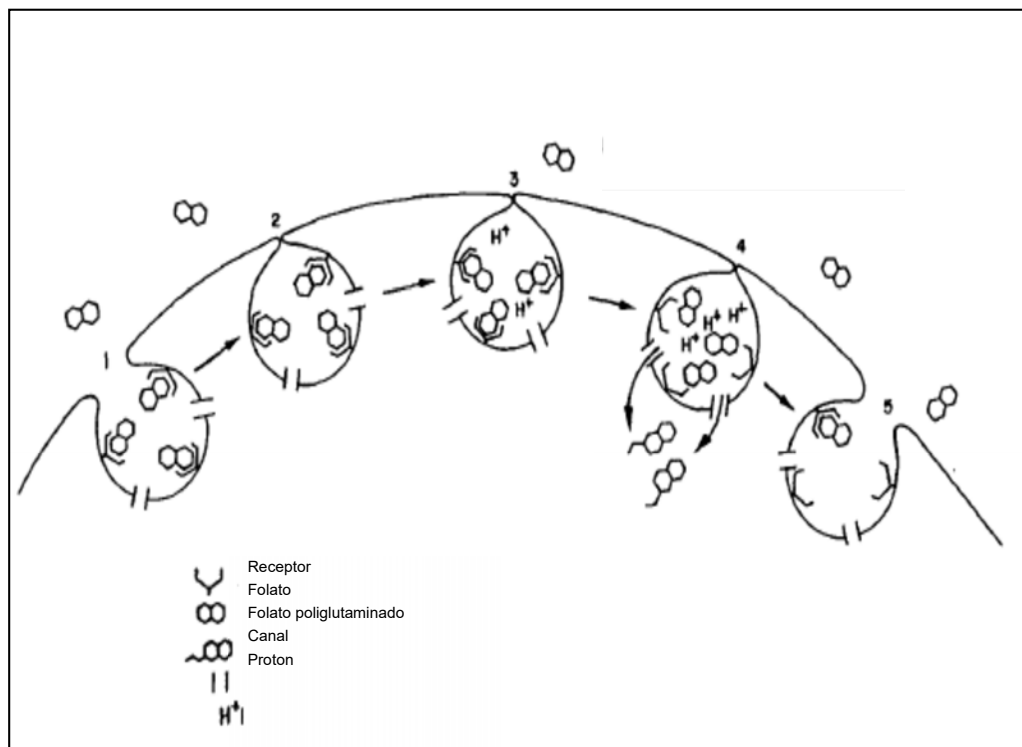


Figura 1.23. Modelo de pinocitosis propuesto para el transporte de folatos a través del FR α .

Sin embargo, otros investigadores siguen discrepando del papel de las caveolinas en el sistema de transporte mediado por el FR α y proponen un sistema de endocitosis mediada por vesículas de clatrina (Sabharanjak y Mayor, 2004).

Según esta teoría, las vesículas originadas en la superficie de la célula estarían recubiertas por clatrina, estas vesículas pasarían al citoplasma mediante invaginación y una vez que la vesícula está en el citoplasma el revestimiento de clatrina desaparecería, quedando las vesículas libres en el citoplasma. Dichas vesículas se fusionarían con el endosoma temprano. Posteriormente, entraría en juego el endosoma tardío y la fusión con el lisosoma en la que se produce la digestión de la vesícula. Durante el proceso se produce una acidificación gradual desde el endosoma temprano (pH de 6), endosoma tardío (pH 5.5) y el lisosoma (pH 3.5). El bajo pH del lisosoma tardío haría que se perdiese la unión entre el folato y el receptor, y en este momento, el folato se podría liberar al citosol y el receptor se reciclaría en la membrana (Figura 1.24).

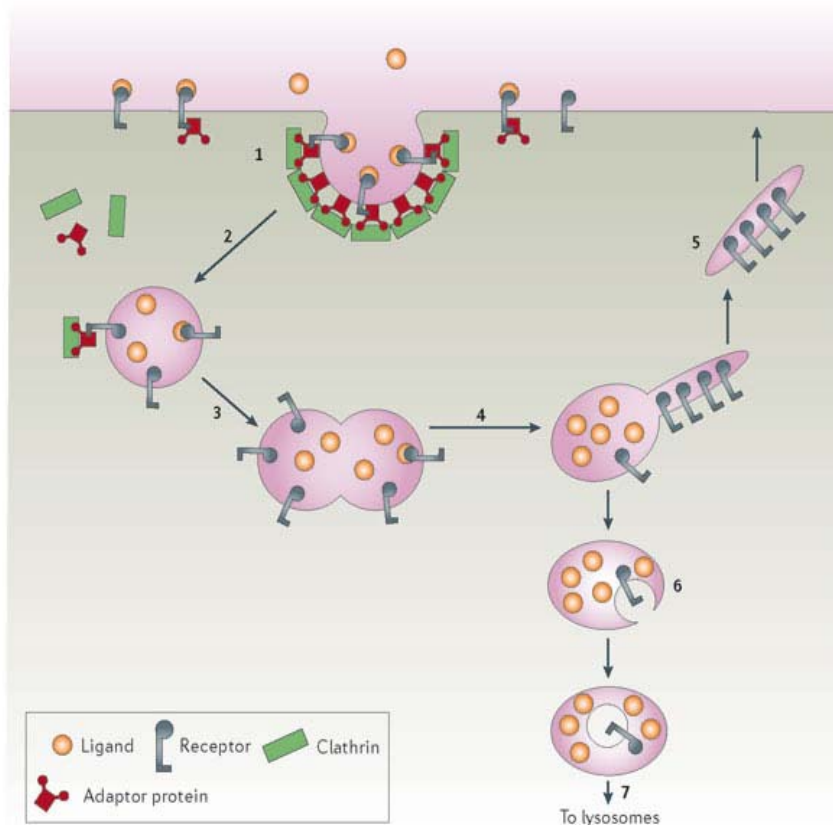


Figura 1.24. Modelo de transporte endosomal de folatos a través del FR α asociado a moléculas de clatrina.

b. Función de la FR α

Además del mecanismo de transporte, los sistemas del RFC y del FR α difieren en muchas otras características. Debido a su mecanismo de transporte por endocitosis, la constante de disociación (K_d) describe la afinidad de unión de los folatos al FR α , mientras que para el RFC es la K_m la que describe la capacidad de este transportador para unir y transportar folatos. FR α une al folato oxidado con una alta afinidad ($K_d < 1$ nM), tiene también una alta afinidad por los folatos reducidos ($K_d = 1-10$ nM) pero menor afinidad por el MTX ($K_d > 100$ nM). La alta afinidad por folatos reducidos como el 5-metil-THF ha llevado a postular que este receptor podría conferir cierta ventaja a células que operan en un ambiente bajo en fólico (Kelemen, 2006), lo que explicaría su sobreexpresión en células tumorales que necesitan un alto aporte de esta vitamina. Sin embargo, hasta la fecha, la función del FR α en células normales y tumorales es desconocida.

c. FR α y el transporte intracelular de drogas

La sobreexpresión del FR α en células tumorales, con respecto a células no patológicas, hizo pensar a un grupo de investigadores que introducir agentes citotóxicos a través de este receptor, supondría una terapia selectiva contra estos tumores ya que las células normales, desprovistas de este receptor, no serían afectadas por la droga. En una serie de experimentos, se ha observado que la conjugación de varias moléculas al ácido fólico aumentaba el transporte de éstas a células que activamente expresaban el FR α (Leamon y Low, 1991). En trabajos sucesivos, se demostró que ciertas toxinas unidas al ácido fólico eran capaces de atravesar la membrana celular e inhibir la síntesis celular de proteínas (Leamon y Low, 1992; Leamon *et al.*, 1993). Estos resultados mostraban que una droga unida al ácido fólico, no era solamente capaz de alcanzar el citoplasma celular, sino que también era capaz de ejercer su acción intracelularmente. Al contrario que otros sistemas explorados para transportar drogas al interior de las células y que son directamente llevados a los lisosomas para su destrucción, la endocitosis mediada por el FR α presenta una serie de ventajas. Las células reconocen al ácido fólico como esencial y, por lo tanto, la droga unida a esta vitamina no es destruida en el lisosoma, sino que se queda retenida en los endosomas o es liberada al citosol de la célula. Durante la última década se han diseñado un gran arsenal de drogas unidas al ácido fólico para el tratamiento de cánceres que hiperexpresan este receptor. En otros casos se han diseñado liposomas que contienen el ácido fólico en el exterior de la vesícula y, por lo tanto, también son transportados en la célula a través del FR α . La ventaja de estos liposomas es que

pueden transportar 10^3 - 10^4 moléculas de droga por vesícula, lo que aumenta enormemente la eficacia del tratamiento. Por último, el uso del FR α como transportador celular se está explotando como un método eficaz de diagnóstico, ya que el ácido fólico conjugado a diversos compuestos radioquímicos como el ^{99m}Tc ha sido usado para detectar tumores *in vivo* (Leamon *et al.*, 2002). Estos nuevos conjugados presentan la ventaja de concentrarse en tejidos patológicos donde se pueden visualizar por técnicas específicas, evitando, así, el uso de otros métodos invasivos de diagnóstico o la utilización de anticuerpos, los cuales, además, de otras desventajas también son muy caros y difíciles de producir.

1.2.5.1.2 Transportadores de Folato de Bajo pH (PCFT)

Una tercera ruta descrita para el transporte de folatos es un transportador que opera a bajo pH. Su gen ha sido recientemente clonado y se ha denominado transportador de folato acoplado a protones (*proton-coupled folate transporter*, PCFT). Este transportador, el cual es expresado independientemente del RFC, funciona óptimamente a pH 5.5 y transporta de forma eficiente a la forma oxidada del folato (ácido fólico), a la reducida (5-MTHF) y a antifolatos como MTX y PMTX (Assaraf *et al.*, 1998; Sierra *et al.*, 1997; Sierra y Goldman, 1998). Este transportador tiene una gran relevancia en la absorción de folatos y antifolatos en el intestino delgado; sin embargo, su importancia en el transporte de folatos en otros tejidos es muy limitada.

1.2.6 MECANISMO DE RETENCIÓN CELULAR DE FOLATOS Y ANTIFOLATOS

Los folatos se encuentran presentes en la sangre en un rango de concentración de aproximadamente 10-50 nM (Stokstad, 1990). El principal folato en el plasma sanguíneo, el 5-metil-THF, se encuentra en la forma monoglutaminada. Sin embargo, una vez dentro de la célula el 5-metil-THF y otros folatos y antifolatos, incluido el MTX, sufren una poliglutaminación en una reacción catalizada por la enzima folilpoliglutamil sintasa (FPGS). Esta enzima es capaz de unir hasta seis moléculas de glutamato al anillo de pteridina de los folatos y antifolatos, a través de un enlace amida con el grupo γ -carboxilo del glutamato unido al PABA. La FPGS cataliza esta reacción dependiente de ATP y se encuentra localizada en el citosol y las mitocondrias (McGuire *et al.*, 2000). Aunque la poliglutaminación de los cofactores del THF tiene como función principal la retención celular de éstos, este proceso confora múltiples e importantes consecuencias:

- Los folatos y antifolatos poliglutamidados son polianiones que son impermeables a las membranas lipídicas y, por lo tanto, se retienen intracelularmente.
- Muchos de los cofactores del THF poliglutamidados son sustratos más efectivos de las enzimas del ciclo del ácido fólico que sus correspondientes formas monoglutamidadas. Esto es el resultado tanto de un aumento de la afinidad de las enzimas por los sustratos poliglutamidados (es decir una bajada de la K_m), como de un aumento en la actividad catalítica de estas enzimas (es decir una subida de la V_{max}), o a una combinación de los dos parámetros (Schirch y Strong, 1989). Además, el MTX, que en su forma monoglutamidada sólo inhibe a la DHFR, cuando sufre la poliglutamación es capaz de inhibir eficientemente otras enzimas como TS, AICARTF, adenosina desaminasa y 5'-adenilato desaminasa (Allegra *et al.*, 1985; 1987; Baggott *et al.*, 1986). Claramente, la posibilidad de inhibir múltiples enzimas relacionadas con el metabolismo del ácido fólico aumenta la potencia citotóxica de estos derivados poliglutamidados.
- Por otra parte, los derivados poliglutamidados ($n > 3$) no pueden ser transportados desde el exterior al interior de la célula por el RFC, pero tampoco por sistemas de transporte que median la exportación de folatos desde el interior hacia el exterior de la célula como las proteínas de resistencia a multidroga (*Multidrug Resistance Proteins*, MRP) (Wielinga *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2001) o la proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP) (Volk y Schneider, 2003). Por lo tanto, los folatos y antifolatos poliglutamidados son retenidos más eficientemente en las células. Como consecuencia de este mayor atrapamiento de los antifolatos se produce un aumento de su actividad farmacológica, pudiendo inhibir de una forma más continuada a las enzimas del ciclo del ácido fólico. De hecho, la velocidad de poliglutamación de los antifolatos en las células tumorales es un factor crítico a la hora de ejercer su acción citotóxica, lo que también influye en su administración clínica. Así, la administración de antifolatos poliglutamidados a pacientes con cáncer se realiza a través de largos intervalos de tiempo entre una dosis y otra; sin embargo, aquellos antifolatos que carecen de esta propiedad deben de ser más frecuentemente administrados (Jackson *et al.*, 1984; Webber *et al.*, 1996).
- Una vez transportados desde el citosol a la mitocondria, los derivados del THF son poliglutamidados en este orgánulo mediante la FPGS mitocondrial, proceso que es fundamental para la retención de los folatos en la mitocondria, necesaria para la biosíntesis de glicina (Lin *et al.*, 1993).

1.2.6.1 Exportación de folatos y antifolatos a través de proteínas de resistencia a multidrogas (MRP)

Los transportadores ABC (del inglés ATP-Binding Cassette) son una superfamilia de proteínas de membrana con 49 miembros identificados en humanos (Borst y Elferink, 2002). Estos transportadores utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para sacar de la célula a varias drogas citotóxicas y sustratos endógenos. Algunos miembros de esta familia, las proteínas de resistencia a multidrogas (MRP), son capaces de mediar la salida de ácido fólico, coenzimas del THF y algunos antifolatos hidrofílicos, como el MTX (Assaraf, 2007), en su forma monoglutaminada. Si bien estos transportadores presentan baja afinidad por los folatos o 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) claramente demostraron que la sobreexpresión de tres miembros de esta familia, MRP1, MRP2 y MRP3, conferían altos niveles de 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. CATEQUINAS DE TÉ

1.3.1. EL TÉ

1.3.1.1. Historia

Existen numerosas historias sobre la invención del té, pero la más conocida es la leyenda china según la cual el emperador y erudito chino Shen Nung descubrió las propiedades beneficiosas del té en el año 2737 a.C. cuando unas hojas de té silvestre cayeron en el agua que estaba hirviendo. Aunque la primera referencia escrita a la hoja del té corresponde al siglo III a.C., el té ha sido utilizado en China desde hace miles de años como bebida medicinal para mejorar la salud del cuerpo y la mente.

No se sabe a ciencia cierta si fueron los holandeses o los portugueses los que trajeron el primer té a Europa a principios del siglo XVII, ya que en aquella época ambas naciones mantenían relaciones comerciales con China; los portugueses desde una base en Macao y los holandeses desde la isla de Java. En un principio se comerciaba con sedas, brocados y especias, pero muy pronto el té se incluyó en los cargamentos. Los portugueses desembarcaron los tés de China en Lisboa y, desde allí, la Compañía Holandesa de las Indias

Orientales transportaba los productos a Holanda, Francia y los puertos bálticos. En Holanda la popularidad del té creció entre todas las clases sociales y las compañías holandesas reexportaban suministros a Italia, Francia, Alemania e Inglaterra. Con el tiempo y con la ayuda de los comerciantes europeos, las plantaciones y el consumo de té se extendieron por todo el mundo y hoy en día es la bebida más consumida en el mundo después del agua.

1.3.1.2. La planta

La planta del té es un arbusto y la especie recibe el nombre científico de *Camellia sinensis* y pertenece a la familia de la Teáceas. Todas las variedades de té derivan de dos: la que procede de la especie china *Camellia sinensis sinensis* y la variedad que procede del estado hindú de Assam, *Camellia sinensis assamica*. Se trata de un arbusto o árbol pequeño perenne y ramificado que posee una fuerte raíz principal. El árbol mide entre 1 y 2 metros de altura, pero puede alcanzar incluso los 12 metros. Las hojas son verdes, lanceoladas u oblongoovadas de peciolo corto, son de 5-6 cm de longitud y 2-5 cm de ancho. Las flores, solitarias o apareadas en las axilas de las hojas, cuelgan de pecíolos cortos, son blancas o de color crema, aromáticas y de 2-4 cm de diámetro. El fruto, en cápsula, posee una sola semilla, que al prensarse destila un aceite. La variedad *Camellia sinensis assamica*, de la India, presenta hojas más largas y tiene una altura superior a la variedad china *Camellia sinensis sinensis*. El arbusto ha crecido silvestre a lo largo de la historia en Extremo Oriente en zonas de clima cálido y húmedo, aunque hoy día se cultiva en otros muchos lugares.

1.3.1.3 Clasificación

Las cinco categorías principales de té se clasifican según su procesamiento, atendiendo a las formas básicas en que se pueden manufacturar las hojas de la planta y que difieren en el grado de fermentación de las mismas: té blanco, té verde, té oolong, té rojo y té negro (**Figura 1.25**).

El té blanco y el té verde no se someten a ningún proceso de fermentación, mientras que el té oolong y los tés rojo y negro experimentan una fermentación intermedia y máxima, respectivamente, debida a la presencia y actuación de sus enzimas oxidativas. En el té blanco y verde se corta el proceso de fermentación mediante el calor que destruye las enzimas oxidantes, con lo que el producto resultante posee unas características desiguales en cuanto a su composición, sabor, olor y aspecto. En el té blanco, se seleccionan los brotes más tiernos de la planta que se recogen al comienzo de la primavera, antes de que se abran, por lo que su color es de un verde muy pálido con tonalidades blanquecinas. De los aproximadamente

2.5 millones de toneladas de té seco manufacturado, el 75 % es té negro, el cual se consume principalmente en Europa, Norteamérica y el norte de África (excepto Marruecos), solamente el 20 % es té verde, la bebida más popular en China, Japón y en unos pocos países del norte de África y de Oriente Medio, y menos del 5 % es té oolong, el cual se bebe en China y Taiwán.

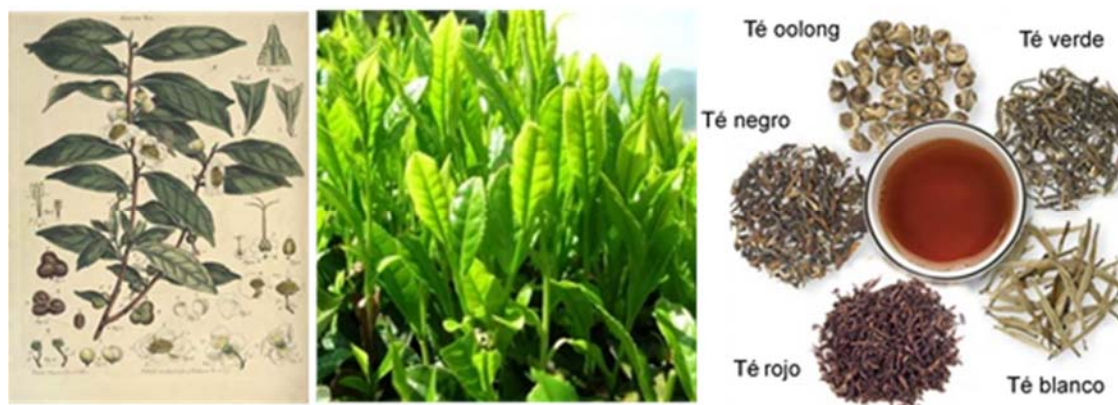


Figura 1.25. Planta del té y tipos de té (verde, blanco, rojo, negro y oolong).

1.3.1.4 Composición

Las hojas de té secas contienen aproximadamente (en peso) un 37% de polifenoles, 25% de carbohidratos, 15% de proteínas, 6.5% de lignina, 4% de aminoácidos, 3.5% de alcaloides, 2% de lípidos, 1.5% de ácidos orgánicos, 0.5% de clorofila y 5 % de compuestos volátiles, fluoruros, minerales, elementos traza y otros compuestos no definidos (**Figura 1.26**). Se trata de valores medios, ya que, en general, la composición del té varía dependiendo de la especie, la estación, las condiciones de cultivo de la planta y particularmente, el grado de fermentación durante el proceso de manufactura.

La cafeína es el alcaloide más abundante (constituye aproximadamente un 3% del mismo), sobre todo en los brotes tiernos y, en mayor cantidad, en el té verde que en los fermentados. La cafeína se extrae mayoritariamente entre los 1.5 y los 3 minutos de infusión y proporciona un sabor amargo a la misma. A tiempos mayores de infusión el valor estimulante de la cafeína queda prácticamente anulado. Otros alcaloides presentes en pequeñas cantidades son la teobromina y la teofilina. Los principales aminoácidos presentes en las hojas del té en orden creciente de abundancia son valina, lisina, fenilalanina, asparragina, alanina, treonina, serina, glutamina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico y teanina (5-N-etilglutamina), que es

único del té y constituye cerca del 50% del contenido total de aminoácidos (Yamamoto *et al.*, 1997). Los aminoácidos juegan un papel importante en el desarrollo del aroma durante el procesado del té negro. Los azúcares libres encontrados en el té son glucosa, fructosa, sacarosa, rafinosa y estaquiosa. La maltosa, en la variedad hindú, y la ramnosa, en la variedad china, son especialmente abundantes. Los azúcares libres son responsables de la síntesis de ciertos polifenoles y la formación de compuestos heterocíclicos aromáticos durante el procesado del té negro. La celulosa, hemicelulosa, pectinas y ligninas dan lugar al contenido en fibra del té negro. Los principales ácidos grasos presentes en el té son el ácido linolénico, el ácido linoleico, el ácido oleico y el ácido palmítico. Las hojas de té son inusualmente ricas en diversos fenoles, los cuales proporcionan un sabor astringente a la misma. Para su extracción es necesario prolongar la infusión 10-12 minutos.

El té acumula aluminio, manganeso y potasio principalmente, así como elementos trazas tales como el cromo, el selenio y el zinc (Cabrera *et al.*, 2003; Gezgin *et al.*, 2006). En el té verde se detectan numerosos ácidos orgánicos como el ácido cinámico, el ácido fenilacético, el ácido oxálico, el ácido málico, el ácido tartárico, el ácido fumárico, el ácido cítrico, el ácido succínico y las vitaminas B y C, que son oxidadas en el proceso de fermentación.

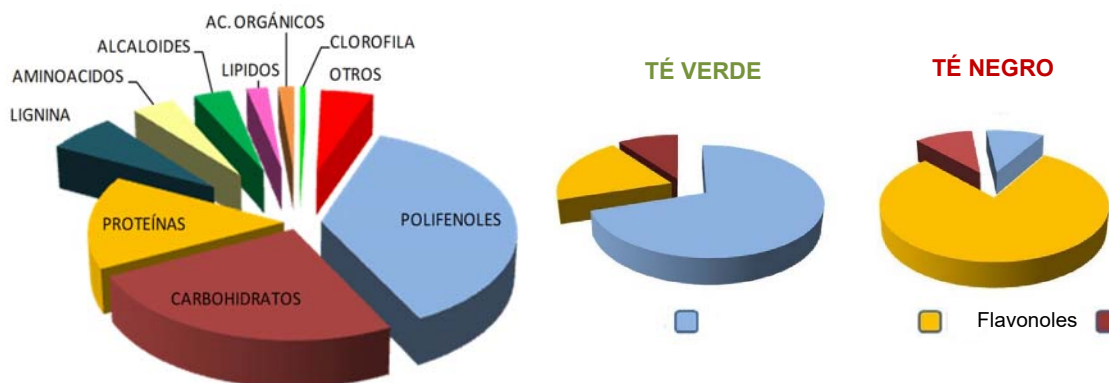


Figura 1.26. Composición del té. Distribución de la composición media y diferencias entre el té verde y el negro debido al proceso de fermentación.

1.3.1.5 Compuestos fenólicos

Los polifenoles son los componentes mayoritarios del té y, desde el punto de vista químico, son sustancias que poseen uno o varios grupos hidroxilo unidos a un benceno u otro anillo aromático. La naturaleza de estos compuestos varía desde moléculas simples, como los

ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Se encuentran en las plantas en forma libre y/o conjugada. La forma conjugada más común es la de glucósidos (Shahidi y Naczki, 1995), pero también pueden encontrarse unidos a ácidos orgánicos, aminas, lípidos y otros compuestos fenólicos (Bravo, 1998). Se trata de compuestos de origen vegetal. Su presencia en tejidos animales está relacionada con el consumo de alimentos vegetales. Engloban más de 8000 compuestos distintos considerados metabolitos secundarios de las plantas. Las principales funciones de estos compuestos en las células vegetales son, por una parte, la de actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y, por otra, la de protegerlas frente a la acción de patógenos y otras plantas del medio (García-Ramírez, 2005). Los compuestos fenólicos se pueden dividir en dos grandes familias, flavonoides y no flavonoides, constituidas cada una de ellas por diferentes subfamilias de compuestos. El contenido total en fenoles y la abundancia de cada tipo de fenol en las infusiones de té depende de diversos factores, tales como la variedad de té de que se trate, las condiciones de cultivo, el proceso de manufactura de las hojas y el método de preparación de la infusión (Astill *et al.*, 2001).

a. No Flavonoides

Ácidos Fenólicos: La estructura básica de estos compuestos es un anillo aromático con un grupo carboxílico y sustituciones en las posiciones orto, meta y/o para. Se distinguen dos familias distintas de ácidos fenólicos, la serie benzoica (si el grupo carboxílico está directamente enlazado al anillo aromático) y la serie cinámica (si el grupo carboxílico está enlazado a él a partir de un sustituyente 2-propenilo). Se pueden encontrar en forma libre o esterificada con azúcares u otros fenoles (dépsidos). El té contiene fundamentalmente dos ácidos de la serie benzoica, el ácido gálico y el ácido salicílico, un ácido de la serie cinámica, el ácido caféico y dépsidos tales como el ácido clorogénico (éster del ácido caféico y del ácido quínico), el ácido cumarilquínico (éster del ácido cumárico y del ácido quínico), y uno único del té, el ácido 3-galoilquínico o teogalina (éster del ácido gálico y el ácido quínico) (**Figura 1.27**) (García-Ramírez, 2005).

Estilbenos: Se han descrito unas 200 estructuras diferentes de estilbenos. La forma molecular más extendida de este grupo es el resveratrol (**Figura 1.27**), el cual aparece principalmente como un glucósido del trans-resveratrol en el té verde, oolong y negro (Burns *et al.*, 2002).

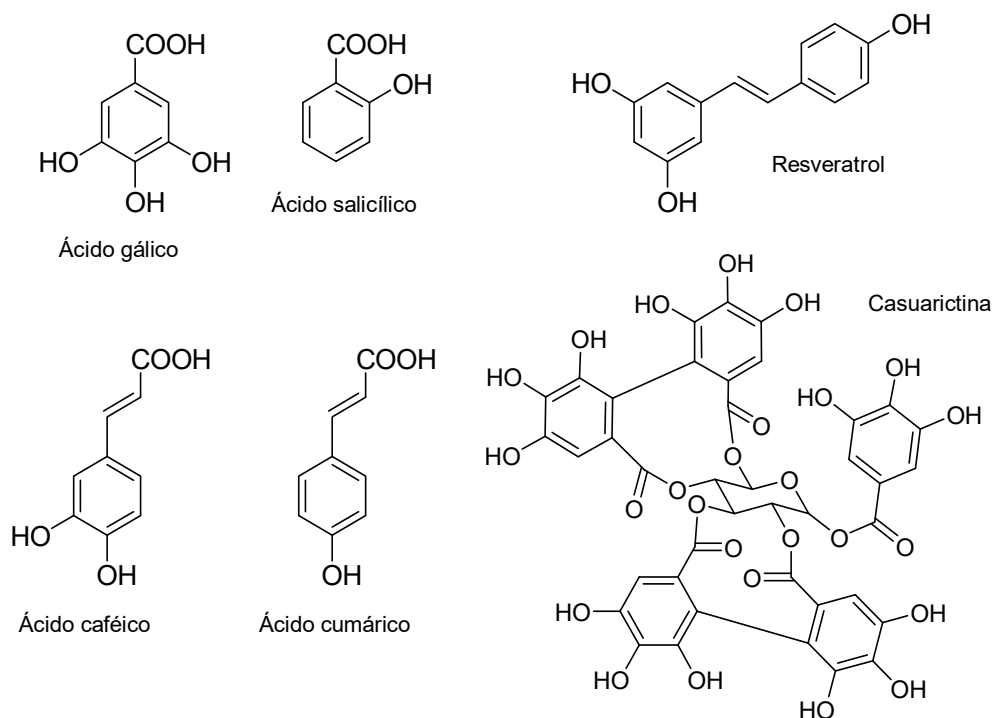


Figura 1.27. Compuestos no flavonoides de té.

Ácidos fenólicos (gálico, salicílico, caféico y cumárico), estilbenos (resveratrol) y taninos hidrolizables (casuarictina).

Taninos hidrolizables: Los taninos hidrolizables tienen como núcleo central un alcohol polihídrico como la glucosa, cuyos grupos hidroxilo se encuentran esterificados parcial o completamente, bien con el ácido gálico o bien con el ácido hexahidroxidifénico, formando galotaninos y elagitaninos, respectivamente, tal y como se puede apreciar en la **Figura 1.27** (Chung *et al.*, 1998). En la bibliografía se pueden encontrar referencias que afirman tanto la existencia de una elevada proporción de taninos hidrolizables en el té, como que la niegan (Wheeler, 1979). Parece ser que esta controversia radica en un problema de nomenclatura, ya que existen autores que emplean el término tanino como sinónimo de polifenol.

b. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que comparten el esqueleto común de la 2-fenilcromona (flavona) (**Figura 1.28**). Pueden variar en el estado de oxidación/reducción (el heterociclo puede ser un oxaciclohexano, un pirano o una pirona), el grado de hidroxilación, la derivatización de los distintos grupos hidroxilos (metilación, glicosilación, etc) y la posición del grupo fenilo (en los isoflavonoides se localiza en posición 4). Se han descrito más de 4000

flavonoides diferentes que se clasifican en varias familias según los cambios en su estructura básica.

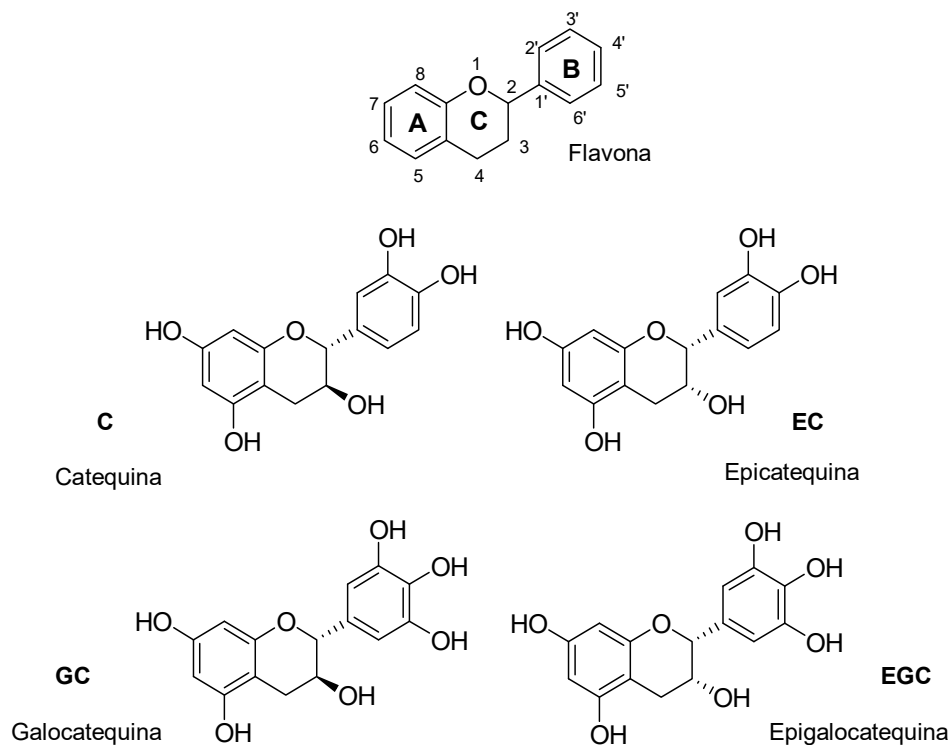


Figura 1.28. Compuestos flavonoides de té. Flavanoles (catequinas: C, EC, GC y EGC).

Flavanoles: Los flavanoles poseen la estructura básica de la flavona polihidroxilada. Se pueden encontrar en forma de monómeros o flavan-3-oles, dímeros o procianidinas diméricas (unión de dos moléculas de flavan-3-oles), oligómeros o procianidinas oligoméricas (unión de 3 a 10 moléculas de flavan-3-oles) y polímeros o taninos condensados (unión de más de 10 moléculas de flavan-3-oles). Los flavan-3-oles más comunes suelen ser denominados como catequinas. Por catequina se entiende el 5,7,3',4' tetraoxiflavan-3-ol con fórmula bruta $C_{15}H_{14}O_6$. El compuesto presenta dos centros de asimetría y, por tanto, puede dar lugar a cuatro formas ópticamente activas y a dos formas racémicas: la serie de las catequinas (C) y de las epicatequinas (EC) (**Figura 1.28**). Otros flavan-3-oles son la galocatequina (GC) y la epigalocatequina (EGC), es decir, las formas 5'-hidroxiladas de la catequina y la epicatequina, respectivamente (**Figura 1.28**). Generalmente en la naturaleza, y en particular en el té verde, están presentes sobre todo la C, EC, GC y la EGC.

Existen también flavan-3-oles metilados, ésteres de flavan-3-oles y flavan-3-oles glicosilados, generalmente en el anillo C. Son frecuentes los ésteres gálicos de las catequinas donde el ácido gálico está esterificado con el hidroxilo en posición 3 del heterociclo (García-Ramírez, 2005). Así, la C da lugar a la catequin galato (CG), la GC a la galocatequin galato (GCG), la EC a la epicatequina galato (ECG) y la EGC a la epigalocatequina galato (EGCG) (**Figura 1.29**).

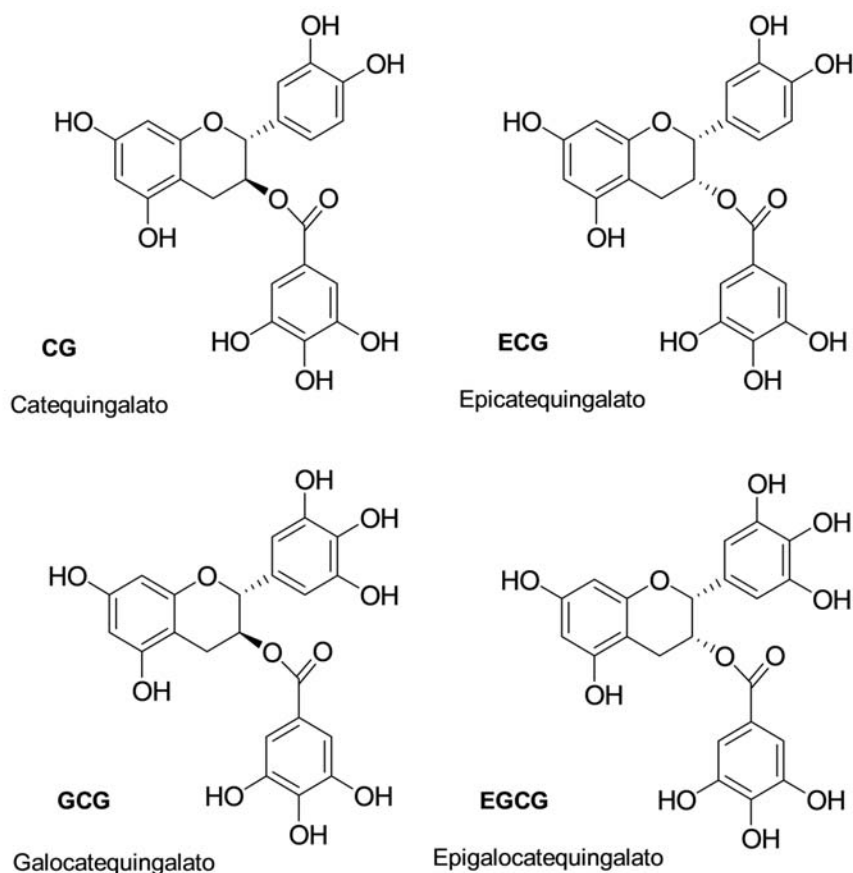


Figura 1.29. Compuestos flavonoides de té. Flavanoles (ésteres gálicos de las catequinas: CG, ECG, GCG y EGCG).

En concreto, la EGCG, la EGC y la ECG son los polifenoles más abundantes en el té verde, en orden decreciente de abundancia. Los glicósidos de flavanoles también están presentes en el té, aunque son más abundantes las formas de las catequinas esterificadas con el ácido gálico y las catequinas libres. En el té verde constituyen entre el 2 y el 33% del peso seco y entre el 0 y el 13% en el negro; el té oolong presenta un contenido intermedio entre ambos (Cabrera *et al.*, 2003; Khokhar y Magnusdottir, 2002).

Los dímeros o procianidinas diméricas son las procianidinas más sencillas. Existen dos tipos de dímeros según el tipo de enlace existente entre las unidades de condensación. Los dímeros más distribuidos en la naturaleza y más abundantes en el té fermentado son aquellos formados por la condensación de dos unidades de catequina unidas por enlaces C4-C6 ó C4-C8 (dímeros del tipo B) (**Figura 1.30**). Aparte de estas procianidinas diméricas de tipo B, existen otras denominadas de tipo A, en las que además del enlace C4-C8, presentan un segundo enlace interflavánico de tipo éter C2-C7.

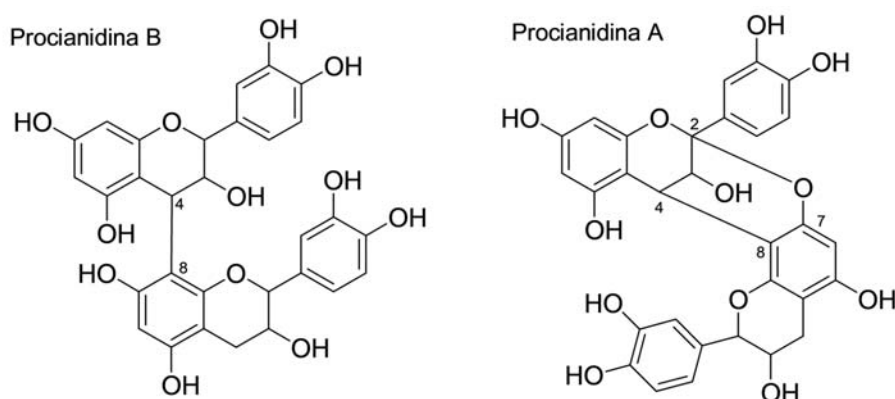


Figura 1.30. Compuestos flavonoides de té. Procianidina tipo B con enlace C4-C8 y procianidina tipo A.

Se conocen más de 30 procianidinas oligoméricas que constan de 3 a 5 unidades. Los compuestos con mayor grado de polimerización que han podido aislarse y caracterizarse son los hexámeros, que están formados por unidades de C y EC y suelen presentar, en general, una única unión entre cada unidad flavínica (usualmente C4-C8). Debido a esta característica, suelen ser compuestos esencialmente lineales. A pesar de que no existe un criterio unánime entre los autores para definir el número de unidades monoméricas que forman un oligómero o un polímero, la mayoría de ellos asignan el nombre de polímero o tanino condensado al favanol constituido por más de diez unidades de monómeros unidas comúnmente por enlaces C4-C6 o C4-C8 (aunque éstos últimos son minoritarios) (García-Ramírez, 2005). Los taninos condensados son mucho menos solubles en agua que los hidrolizables y su solubilidad disminuye al aumentar su peso molecular. Las catequinas son también la base de los principales grupos de taninos condensados: los procianidoles o procianidinas (la C y la EC) y los prodelfinidoles (la GC y la EGC) (García-Ramírez, 2005). A pesar de que el término taninos condensados aún se emplea ampliamente para designar a estos compuestos, el término proantocianidina está ganando aceptación, por ser químicamente más descriptivo, ya que

hace referencia al hecho de que por ruptura oxidativa dan lugar a antocianidinas, un grupo de polifenoles flavonoides que será descrito a continuación. En concreto, las procianidinas dan lugar a unidades de la antocianidina denominada cianidina, y los prodelphinoides a unidades de delphinidina.

Antocianos: Los antocianos o antocianidinas poseen la estructura básica de los flavonoides con dos dobles enlaces en el heterociclo entre las posiciones 1 y 2 y entre las 3 y 4, por lo que poseen una carga positiva y se consideran derivados hidroxilados de las sales de flavilium (2-fenilcromenilium). Como ya ha sido mencionado anteriormente, son los productos de la ruptura oxidativa de los taninos condensados o proantocianidinas. La cianidina y delphinidina son las antocianidinas más abundantes en las hojas de té (**Figura 1.31**). Sus glucósidos se denominan antocianinas.

Quinonas de la catequinas: Además del contenido usual de enzimas en las células vegetales, el té contiene una polifenol oxidasa activa (Gregory y Bendall, 1996) que es la que cataliza la oxidación aeróbica de las catequinas cuando la estructura de las células de las hojas se rompe durante manufactura del té oolong y negro. Las catequinas dan lugar a quinonas denominadas flavanonas, flavonas y flavonoles. Estas quinonas, a su vez, inician la formación de muchos de los cientos de compuestos volátiles encontrados en la fracción aromática del té negro. Otras sustancias volátiles se producen durante la etapa de secado (Graham, 1992). Algunos de estos compuestos que forman la fracción volátil del té son el linalool, el óxido de linalool, el geraniol, el fenilacetaldehído, el nerolidol, el benzaldehído, el metilsalicilato, el fenil etanol, el trans-2-hexenal y el cis-3-hexenol y β -ionona.

Flavanonas: Estos compuestos se caracterizan por poseer un grupo carbonilo en el carbono 4. La naringenina es el único compuesto de este grupo aislado en el té (**Figura 1.31**).

Flavonas: Las flavonas presentan, al igual que las flavanonas, un grupo carbonilo en el carbono 4, pero a diferencia de estas poseen un doble enlace entre los carbonos 2 y 3. Pertenecen a este grupo la luteolina y la apigenina, ambas presentes en el té (**Figura 1.31**).

Flavonoles: Estos compuestos pueden ser identificados claramente por la existencia de un grupo carbonilo en el carbono 4 y un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, como en las flavonas, pero a diferencia de éstas poseen un grupo hidroxilo adicional en el carbono 3. Se trata de compuestos insolubles. En los téis fermentados podemos encontrar kampferol,

quercitina y miricetina, que se diferencian en el número de grupos hidroxilos de las posiciones 3', 4' y 5' (**Figura 1.31**).

Taninos derivados: Las quinonas de las catequinas también experimentan reacciones de condensación, a través de la formación de enlaces C-O o C-C, que resultan en una serie de taninos derivados, los cuales son responsables de las características propiedades de sabor y color del té negro. La mayoría de estos compuestos forman complejos con la cafeína. Debido a la complejidad de los compuestos que forman parte de esta clase de taninos ha sido difícil asignarles una nomenclatura química estricta y a menudo se les asignan nombres triviales.

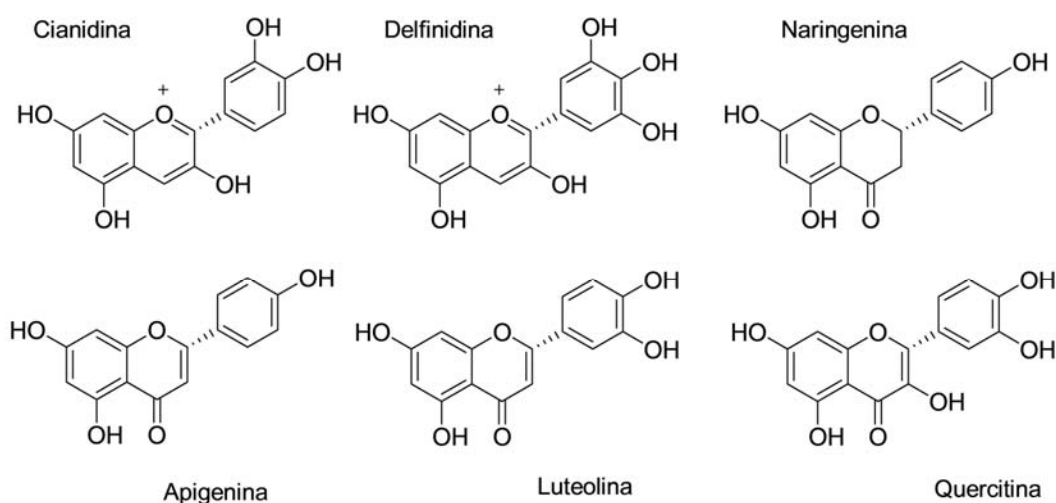


Figura 1.31. Compuestos flavonoides de té. Antocianos (cianidina y delphinidina). Flavanonas (naringenina). Flavonas (apigenina y luteolina). Flavonoles (quercitina).

Teaflavinas: Los derivados de los flavanoles denominados teaflavinas están presentes en el té oolong y negro (**Figura 1.32**). La única característica de las teaflavinas es el anillo de benzotropolona, un anillo de siete carbonos, el cual se forma por la oxidación del anillo B de la EGC o del EGCG con pérdida de CO₂ y fusión simultánea con el anillo B de una segunda molécula de EC o ECG. Como resultado se forman cuatro posibles compuestos cuya estructura química se muestra en la **Figura 1.31**.

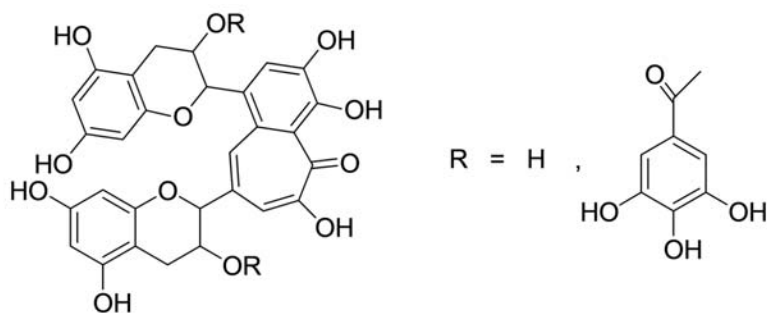


Figura 1.32. Compuestos flavonoides de té. Estructura de las teaflavinas.

Tearubígenos: La mayor parte de la materia extraíble de los tés oolong y negro está formada por otro grupo de taninos derivados, los tearubígenos. Se trata de un grupo heterogéneo de compuestos de alto peso molecular (de 1 a 10 kDa). La complejidad y el peso molecular de estos compuestos ha dificultado la elucidación de su estructura (Beecher, 2003). Se sabe que las proantocianidinas forman parte del complejo y que la peroxidasa del té está involucrada en su generación (Subramanian *et al.*, 1999).

1.3.2. PROPIEDADES TERAPÉUTICAS DEL TÉ VERDE

A pesar de las evidencias crecientes sobre los beneficios para la salud del consumo de té verde, esta práctica no ha sido del todo adoptada por la sociedad occidental. Aunque se conocen sus propiedades antitumorales, antibacterianas y antiinflamatorias desde hace muchos años, la medicina tradicional no ha incorporado al té ni a ninguno de sus componentes en los distintos tratamientos y hoy en día el uso terapéutico del té está reservado a la medicina alternativa. Sin duda esto puede ser debido a una falta de conocimiento de los mecanismos exactos de su actuación a distintos niveles. En la actualidad se comercializan extractos descafeinados de té verde como suplementos nutricionales, pero se necesitan grandes dosis debido a las pobres características farmacocinéticas de las catequinas. Además, el uso de mezclas de productos naturales como suplementos nutracéuticos se asocia a riesgos de interacciones de drogas entre algunos o varios componentes de la mezcla.

La mayoría de los efectos fisiológicos descritos para el té han sido, principalmente, asociados a sus catequinas y, especialmente, al EGCG, aunque algunos efectos particulares han sido vinculados a otros componentes. Por ejemplo, a la cafeína se le atribuye un efecto estimulante y se utiliza como diurético en tratamientos de obesidad, al aumentar la micción, eliminando líquido corporal. Al constreñir los vasos sanguíneos pericraneales, la cafeína también alivia los

dolores de cabeza, resultando especialmente útil en casos de migraña. La histidina constituye un antiarterosclerótico. La teanina cumple la misma función, además de impedir la formación de trombos, propiedad que también cumple el eugenol. La teanina, además, posee un efecto calmante reduciendo el estrés. Se ha visto que estimula las ondas alfa de cerebro, las cuales se encuentran reducidas en personas con ansiedad, pero que se encuentran elevadas en los sujetos en estado de relajación (Mason, 2001). La teanina parece afectar a la concentración de neurotransmisores en el cerebro, incluyendo al GABA, la serotonina y la dopamina. Además, se ha visto que incrementa la efectividad de ciertos tipos de terapias (Sadzuka *et al.*, 2000). La teobromina es un vasodilatador y cardiotónico. La quercetina es un antioxidante que puede ayudar a controlar la respuesta inflamatoria, modular el sistema inmune, incrementar la fuerza de los capilares y proteger del estrés oxidativo a las células sanas (Kioka *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1998; Taguchi *et al.*, 1993). Pero, además de estos efectos, la propiedad por excelencia asociada al té, es la antitumoral. Los principales antitumorales son las catequinas, cuyas propiedades serán analizadas a continuación, pero hay que mencionar otros componentes considerados inhibidores tumorales como, por ejemplo, la cafeína, los aminoácidos, la quercetina y la vitamina C.

Por otro lado, se tiene gran cantidad de información de EGCG con diferentes dianas moleculares en cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurológicas. Al igual que otros compuestos naturales, el EGCG y otras catequinas del té verde pueden ser útiles como modelos para descubrir nuevas drogas contra posibles dianas moleculares. El diseño de una forma racional de análogos de estas catequinas puede ser válido para estudios de las relaciones actividad-estructura que determinen la contribución de los diferentes grupos fenólicos a la actividad antioxidante y los efectos terapéuticos del té verde (Zaveri, 2001).

Los efectos beneficiosos más destacados asociados a las catequinas del té son los siguientes:

1.3.2.1 Efectos antibacterianos, antivirales y antifúngicos

Diversos estudios realizados durante las últimas décadas ponen de manifiesto la actividad antimicrobiana de los extractos de hojas de té. Se analizó esta actividad sobre una serie de 111 bacterias que incluían 2 géneros de Gram positivas y 7 de Gram negativas, demostrándose que el crecimiento de la mayor parte de ellas era inhibido por un extracto de té verde. La actividad antibacteriana del té verde también ha sido demostrada *in vivo*, protegiendo a ratones Swiss contra *Salmonella thyphimurium* (Bandyopadhyay *et al.*, 2005). Beber té conlleva una reducción de las enterobacterias que producen amoníaco y otras aminas

dañinas y a un incremento del nivel de lactobacilos y bifidobacterias que actúan de forma beneficiosa produciendo ácidos orgánicos y bajando el pH intestinal (Weisburger, 1999). También se ha visto que el té verde presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias cariogénicas responsables de la caries dental como *Streptococcus mutans* (Hirasawa *et al.*, 2006). Trabajos recientes en nuestro laboratorio (Navarro-Martínez *et al.*, 2005) han puesto de manifiesto la acción antibacteriana del EGCG sobre *Stenotrophomonas maltophilia*, un patógeno nosocomial especialmente peligroso para pacientes inmunodeprimidos y hospitalizados durante largos periodos, cuya infección puede causar complicaciones como endocarditis, neumonía, problemas en ojos, huesos, articulaciones y tracto urinario. En concreto, la acción bactericida del EGCG sobre este patógeno se debe a su actividad antifolato. Algunas combinaciones de catequinas con antibióticos muestran actividades sinérgicas siendo, en algunos casos, efectivas frente a bacterias resistentes a antibióticos, como por ejemplo *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (Yam *et al.*, 1998). ECG es más eficiente que EGCG en sinergia con antibióticos β -lactámicos para el tratamiento de cepas de *S. aureus* resistentes, uniéndose a los componentes de la pared de peptidoglicano (Stapleton *et al.*, 2004) y combinaciones de varios tipos de té con gentamicina metilicina y ácido nalixídico actúan de forma sinérgica frente a *Shigella dysenteriae* (Tiwari *et al.*, 2005).

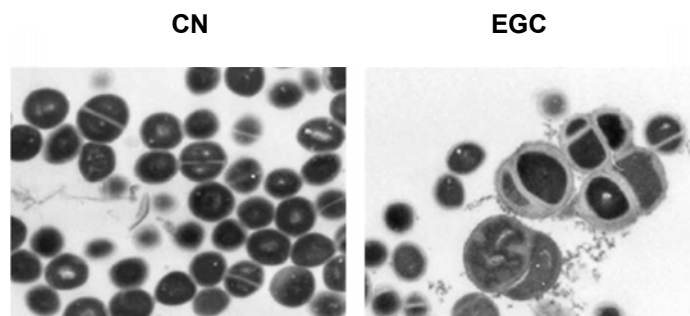


Figura 1.33. Efecto de ECG en la morfología celular de *Staphylococcus aureus* (Stapleton *et al.*, 2004). Se aprecia la formación de agregados pseudomulticelulares, así como un engrosamiento de la pared sugiriendo un efecto del EGCG en la síntesis del peptidoglicano de la pared.

Otros autores han descrito que el té verde y en concreto sus catequinas poseen una acción antiviral. Entre los virus diana que han sido estudiados destaca el HIV-1 por el volumen de literatura al respecto. Entre los mecanismos de acción del té verde sobre el virus HIV se ha propuesto que actúa sobre su replicación mediante la inhibición de la transcriptasa inversa e interfiriendo con la unión del virus. Recientemente ha sido descrito que el EGCG evita el acoplamiento del virión del HIV-1, gp120, a la molécula CD4 en los linfocitos T humanos (Kawai

et al., 2003), previniendo el primer paso del proceso de infección del virus HIV. Los polifenoles del té también inhiben la propagación de rotavirus en cultivos de células de mono y del virus de la gripe en cultivos de células animales. Otro ejemplo de la actividad antiviral de los polifenoles del té verde es la inhibición de la proliferación de los adenovirus, en concreto, el efecto sobre el virus linfotrófico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1), el cual está causativamente asociado con la leucemia de células T adultas. Se ha visto que dichos polifenoles inhiben el crecimiento *in vitro* de estas células y las células T infectadas por HTLV-1, así como disminuye la carga de provirus (Sonoda *et al.*, 2004).

El incremento en la incidencia de micosis invasivas y el problema emergente de la resistencia a fármacos antifúngicos ha incrementado el interés por la investigación sobre nuevos agentes antifúngicos. Los extractos de té y el EGCG muestran actividades fungicidas, que son dependientes de su concentración y del tiempo de actuación, frente a un gran número de hongos. Se ha visto que el EGCG es capaz de aumentar la actividad antifúngica de varias drogas como la anfotericina B y el fluconazol (Han, 2007).

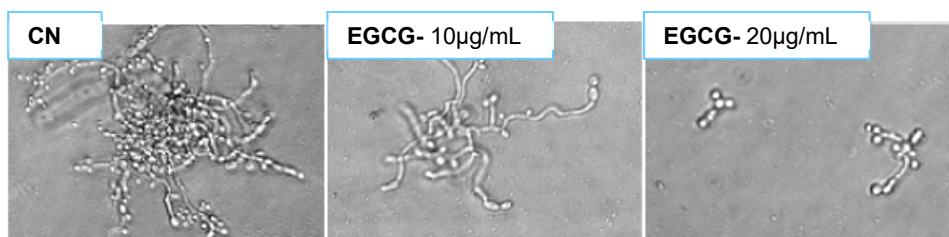


Figura 1.34. Bloqueo de la formación de hifas de *Candida albicans* por EGCG (Han, 2007). En el control de levaduras en crecimiento se forman hifas, pero en las levaduras tratadas con EGCG se reduce significativamente la formación de hifas.

Un ejemplo del efecto de las catequinas del té sobre hongos es su actividad sobre *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* (Okubo *et al.*, 1991), donde extractos de té negro al 2.5% eran capaces de inhibir completamente el crecimiento. Pero sin duda, el mayor interés de los estudios del té como antifúngico lo ha despertado su actividad sobre *Candida albicans*. Hirasawa y Takada (2004) demostraron que la actividad antifúngica de las catequinas del té frente a *C. albicans* era dependiente de pH y que la acción de EGCG se debilitaba en condiciones de pH ácido. Posteriormente, otras investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio demostraron que la acción del EGCG sobre *C. albicans* se debe a su actividad antifolato, inhibiendo eficientemente la enzima DHFR (Navarro-Martínez *et al.*, 2006). Esta interrupción del ciclo del fólico, por parte del EGCG, lleva a la inhibición de la síntesis de

ergosterol, el cual es un componente del hongo importante para mantener la fluidez de la membrana, la permeabilidad, la morfología y la progresión a través del ciclo celular. Así mismo se demostró el mecanismo de la acción sinérgica entre EGCG y los azoles utilizados como antifúngicos habitualmente contra *C. albicans*.

1.3.2.2 Protección frente a diabetes

La diabetes tipo II es una afección que conlleva una resistencia de la glucosa y del metabolismo de lípidos en tejidos periféricos a la acción biológica de la insulina y una inadecuada secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas. Las catequinas del té, en especial la EGCG, parecen tener efectos antidiabéticos (Kao *et al.*, 2006). Los extractos de té negro suprimen la elevación de la glucosa en sangre durante la ingesta de alimentos en ratones diabéticos (Shoji y Nakashima, 2006). En un estudio con voluntarios humanos se observó que el consumo de té verde incrementaba sustancialmente la tolerancia oral a la glucosa, sin afectar a los niveles basales de glucosa en sangre (Tsuneki *et al.*, 2004). La administración prolongada de extractos de té verde en ratas incrementa los niveles de sensibilidad a la insulina (Wu *et al.*, 2004) y se ha demostrado *in vitro* que estos efectos se deben al aumento de la incorporación de glucosa por parte de los adipocitos, siendo el EGCG el responsable de estos efectos (Anderson y Polansky, 2002; Wu *et al.*, 2004).

1.3.2.3 Protección frente a obesidad

Debido a los problemas derivados de una sociedad con cada vez más casos de obesidad, la actividad protectora del té frente a la obesidad está recibiendo una gran atención. Se están incrementando los esfuerzos en la investigación de los efectos antiobesidad del té verde, tanto en cultivos celulares como en animales y humanos. Diferentes estudios, en modelos de obesidad celulares y animales, han confirmado que el té verde y sus catequinas, en concreto la EGCG, son capaces de reducir la proliferación y diferenciación de adipocitos, la lipogénesis, masas de grasa, el peso corporal, la absorción de grasas, el nivel de triglicéridos en plasma, los ácidos grasos libres, el colesterol, la glucosa, la insulina y la leptina así como incrementar la beta-oxidación de las grasas y la termogénesis. Se sabe que la obesidad es el resultado tanto de un incremento en el tamaño de los adipocitos (hipertrofia) como en su número (hiperplasia) y estudios *in vitro* sugieren que los efectos antiobesidad observados para el té verde se deben en parte a la inhibición de la proliferación y diferenciación de los adipocitos (Lin *et al.*, 2005), estando implicadas dos quinasas que controlan el ciclo celular, ERK y la quinasa 2 dependiente de ciclina (Cdk2) (Furuyashiki *et al.*, 2004; Wolfram *et al.*, 2005). Otro

efecto que se atribuye a las catequinas del té es el de incrementar la termogénesis en el tejido adiposo marrón (Dulloo *et al.*, 2000). En este estudio se sugiere que las catequinas actúan de forma sinérgica con la cafeína en la liberación de noradrenalina, que a la postre modula la termogénesis, incrementando los niveles de AMPc que producen un incremento del metabolismo y de la temperatura corporal, movilizandando así el tejido adiposo marrón. Diversos estudios centran el efecto antiobesidad del té en relación con la absorción de nutrientes. Se ha demostrado que ECG inhibe la entrada de glucosa en células Caco-2 (Shimizu *et al.*, 2000). También se ha visto que extractos de té verde inhiben la actividad lipasa pancreática y gástrica que se cree que está implicada en la digestión de las grasas en humanos (Juhel *et al.*, 2000).

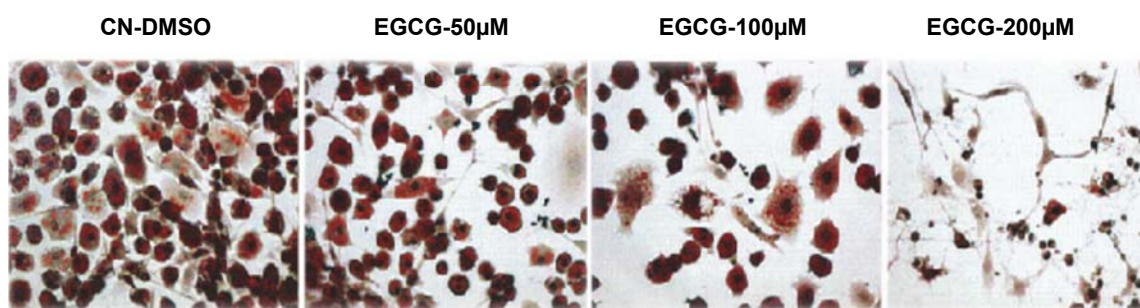


Figura 1.35. Efecto del tratamiento de adipocitos con EGCG durante 6 días.

*Imágenes de adipocitos teñidos con Oil-Red-O para analizar el contenido lipídico (Lin *et al.*, 2005). Se observa la disminución de la adipogénesis (color rojizo) y la disminución de la población celular mediante apoptosis.*

El té verde reduce el tejido adiposo en modelos animales de obesidad y tiene un pronunciado efecto sobre el metabolismo de lípidos en modelos de hiperlipidemia (Murase *et al.*, 2005), reduciendo los niveles en plasma de colesterol, glucosa, insulina y leptina, lo que finalmente, lleva a una reducción del peso corporal, de la masa de tejido adiposo y de la cantidad de grasa del hígado.

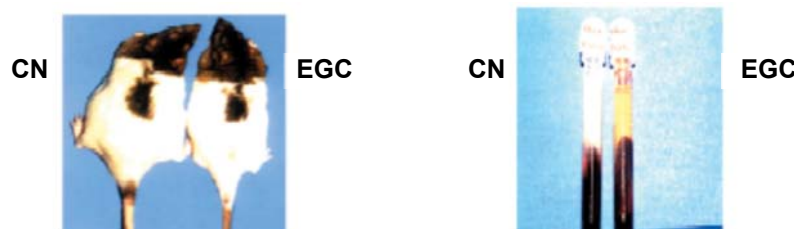


Figura 1.36. Efecto de la administración intraperitoneal de EGCG en ratas obesas Zucker (Kao *et al.*, 2006). Se observa una disminución en el peso corporal y en los niveles de lípidos totales en suero.

Estos efectos parecen estar mediados por un incremento en el gasto energético, disminución en la absorción de glucosa por músculo esquelético y tejido adiposo. El té verde previene la obesidad inducida por la dieta en una forma dependiente de la dosis y el consumo de catequinas del té verde en combinación con el ejercicio promueve la β -oxidación y mejora la capacidad de ejercicio de ratones (Kao *et al.* 2000). Aunque existe un número muy limitado de ensayos en humanos que estudien el efecto del té verde sobre la obesidad (Chantre y Lairon 2002; Hase *et al.*, 2001; Kovacs *et al.*, 2004; Nagao *et al.*, 2005; Tsuchida *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003a), todos ellos muestran una reducción del peso y de la grasa corporal en respuesta al té verde, aunque la respuesta es bastante menos acentuada que en el caso de los estudios con animales modelo. Por lo tanto, son necesarios estudios adicionales donde haya un control estricto de la toma de nutrientes y de energía, así como la actividad física de los sujetos del ensayo para confirmar estos hallazgos.

1.3.2.4 Protección frente a enfermedades cardiovasculares

El origen de determinadas enfermedades cardiovasculares depende de numerosos factores que pueden ser modulados mediante los componentes de la dieta. Los estudios epidemiológicos muestran una relación inversa entre la mortalidad debida a una enfermedad cardiovascular y el consumo de té (Hertog *et al.*, 1993; Nakachi *et al.*, 2000; Stensvold *et al.*, 1992). En este sentido se ha descrito un efecto preventivo frente al infarto (Weisburger, 1996), la aterosclerosis (Yang y Koo, 1997), la acumulación de colesterol y otros lípidos en la sangre e hígado (Sano *et al.*, 1995; Stensvold *et al.*, 1992; Yang y Koo, 1997), la peroxidación lipídica (Miura *et al.*, 1995) y la hipertensión (Stensvold *et al.*, 1992). En un estudio se señaló al EGCG y al ECG como las catequinas del té responsables de los efectos sobre los parámetros lipídicos

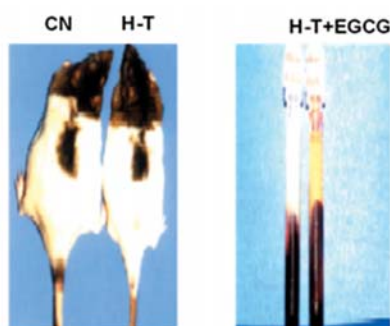


Figura 1.37. Efecto *in vivo* del EGCG sobre la hipertrofia del tejido muscular cardíaco inducida por hipertensión (Hao *et al.*, 2007) Los modelos de hipertensión (H-T) provocados por constricción aórtica muestran una hipertrofia cardíaca, que es revertida por el EGCG a través de regulación del tamaño de los miocitos, como se observa en las secciones teñidas con hematoxilina-eosina.

del suero (Matsuda *et al.*, 1986). Además, el consumo de té puede disminuir la concentración sanguínea de homocisteína (Hodgson *et al.*, 2006), cuya elevación ha sido, a su vez, relacionada con enfermedades cardiovasculares (Ramakrishnan *et al.*, 2006).

1.3.2.5 Efectos antiinflamatorios

El consumo de té ha sido relacionado con un efecto protector frente a varias enfermedades inflamatorias, como la artritis, el asma y diversas enfermedades autoinmunes, entre ellas la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn, la artritis reumatoide, la encefalomiелitis, la esclerosis múltiple, la diabetes tipo I, el lupus eritematoso, el síndrome de Sjögren y la psoriasis. En concreto, se ha visto que el EGCG produce una reducción significativa de la reacción asmática en ratones, mediante la disminución de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la regulación de la migración de células inflamatorias (Kim *et al.*, 2006). En ratas con colitis inducida, el tratamiento con extractos polifenólicos de té verde atenuó la diarrea y la pérdida de peso corporal, mejoró la arquitectura del colon, redujo la producción de la mieloperoxidasa colónica y el factor de necrosis tumoral α (TNF α), así como la aparición de inmunoreactividad a la nitrotirosina y la regulación positiva de la ICAM-1 en el colon (Mazzon *et al.*, 2005). En cuanto a la artritis reumatoide, un estudio con mujeres entre 55-69 años concluyó que existe una relación inversa entre el consumo de té y el desarrollo de artritis reumatoide (Hsu y Dickinson, 2006). En ratones se ha visto que la administración de té verde reduce en más de un 50% la artritis inducida por colágeno, reduciendo significativamente los niveles de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), del interferón γ (IFN- γ), del TNF α y de la inmunoglobulina G (IgG) en las articulaciones (Haqqi *et al.*, 1999). Estudios recientes acerca de la esclerosis múltiple y su modelo animal, la encefalomiелitis autoinmune experimental, muestran que, en ratones, la administración oral del EGCG reduce la inflamación del cerebro, el daño neuronal, la proliferación celular y la producción de TNF α de células T encefalitogénicas, lo cual lleva a una inhibición de la activación, en última instancia, del NF- κ B (Aktas *et al.*, 2004). Se ha demostrado en estudios con ratones modelos de lupus eritematoso que la administración de té verde consigue una mayor supervivencia de los ratones y una disminución de los anticuerpos anti-ADN (Sayama *et al.*, 2003). Además, el EGCG podría convertirse en una terapia a tener en cuenta para la psoriasis debido a resultados que indican un aumento en la diferenciación de queratinocitos epidérmicos en presencia de este compuesto (Hsu *et al.*, 2007).

Por lo tanto, podemos decir que administrando té verde se puede conseguir un retraso en el desarrollo de enfermedades inflamatorias/autoinmunes y/o una reducción de la severidad de sus síntomas. Aunque actualmente no existe una explicación global a nivel molecular y celular de dichos efectos, uno de los mecanismos posibles implicaría un papel central para el NF- κ B, ya que controla la expresión de genes que poseen papeles críticos en la mayoría de los procesos inflamatorios (Nam, 2006).

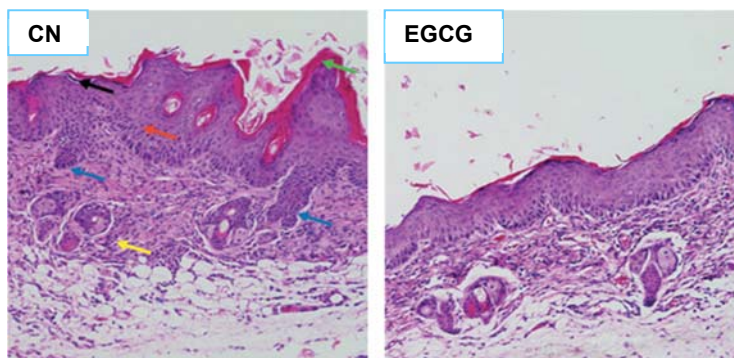


Figura 1.38. Secciones de piel de ratón modelo de psoriasis (*fsn/fsn*) teñidas con HE (Hsu et al., 2007). En las muestras de ratones no tratados, se observa marcada hiperqueratosis (verde), débil paraqueratosis (negro), acantosis (naranja), elongaciones dérmicas (azul) e inflamación de la dermis (amarillo), características típicas de dermatitis psoriásica que se reducen con el tratamiento en las muestras de piel de ratones lavados con EGCG.

1.3.2.6 Protección frente a enfermedades neurodegenerativas y envejecimiento

Las enfermedades neurodegenerativas son un tipo de desórdenes progresivos del sistema nervioso que engloban daño y pérdida de neuronas cerebrales y/o medula espinal, que pueden desencadenarse en cualquier momento de la vida. Este tipo de desórdenes engloban enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson, el Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

La neurodegeneración en estas enfermedades es multifactorial, donde un grupo complejo de reacciones tóxicas provoca la muerte de las neuronas. A pesar de que la etiología de estas enfermedades no está clara, existen evidencias a favor de la hipótesis de que un fallo en la regulación del hierro cerebral produce su acumulación en áreas del cerebro donde ocurre la degeneración. Además, el hierro iónico puede contribuir en la generación de ROS, iniciando un proceso inflamatorio. Estas enfermedades requieren de una terapia basada en diversas drogas para poder atajar los distintos aspectos patológicos de la enfermedad. Por eso, el uso de compuestos con actividades poli-farmacológicas como las catequinas del té verde supone

una aproximación esperanzadora para su tratamiento. El efecto protector del EGCG frente a estas enfermedades neuronales podría deberse a su capacidad de secuestrar radicales libres, de quelatar hierro y de regular enzimas prooxidantes y antioxidantes, pero también a su capacidad de modular genes relacionados con la supervivencia celular y de alterar las rutas de señalización de la proteína quinasa C (PKC).

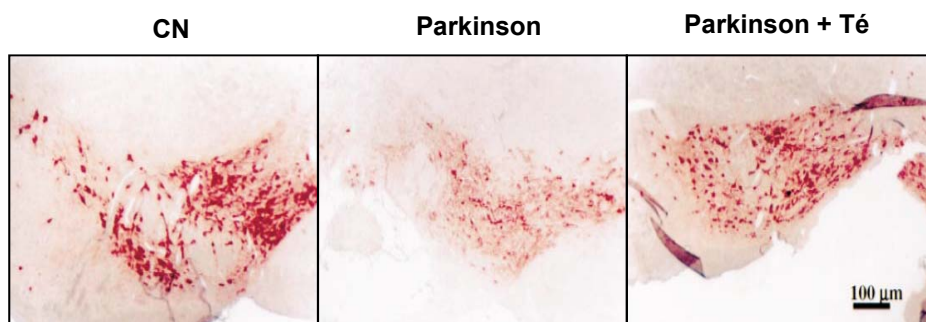


Figura 1.39. Análisis inmunohistoquímico de neuronas tiroxina hidrolasa (TH) positivas de la sustancia negra de ratones modelo con enfermedad de Parkinson (Levites et al., 2001). En los ratones tratados con MPTP para inducir la enfermedad de Parkinson, se reduce el número de neuronas TH positivas en un 40 % respecto al control, mientras que el tratamiento con MPTP y extracto de té verde recupera el número de neuronas TH positivas del 60% al 85% respecto al control.

Actualmente existe la convicción de que las catequinas del té pueden ejercer un papel protector de la neurodegeneración. Este efecto neuroprotector ha sido probado en numerosas ocasiones en animales modelo de desórdenes neuronales (Kuriyama et al., 2006). Se ha visto que el EGCG puede proteger frente a la pérdida de memoria relacionada con el envejecimiento, así como frente a los daños producidos en el cerebro tras episodios de isquemia/reperfusión (Lee et al., 2000; Sutherland et al., 2006), inflamación cerebral y daños neuronales en encefalomiелitis autoinmune (Aktas et al., 2004). El tratamiento con EGCG retrasa la aparición de síntomas y alarga la esperanza de vida en modelos de ratones con ELA (Koh et al. 2006). De manera similar, extractos de té verde o EGCG, previenen la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra tras la inducción de forma crónica con la neurotoxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) que provoca Parkinson (Levites et al., 2001). Más recientemente, se ha visto que la administración prolongada de catequinas del té verde o EGCG favorecen el reconocimiento espacial y el aprendizaje en ratas (Haque et al., 2006) y reduce la amiloidosis del cerebro en ratones transgénicos con Alzheimer (Reazai-Zadeh et al., 2005).

En algunos casos se ha postulado que la actividad antioxidante del té y sus catequinas podría ser la responsable de sus efectos neuroprotectores, de acuerdo con la teoría del envejecimiento por radicales libres (Harman, 1994). Según esta teoría, el aumento en la generación de radicales libres y el estrés oxidativo son la base de los cambios fenotípicos que llevan al deterioro asociado a la edad y a la neurodegeneración. Sin embargo, estudios sobre la esperanza de vida de ratones mantenidos con té verde como única bebida no demostraron significativamente un aumento en la longevidad, en referencia a los animales control (Kitani *et al.*, 2004). Por el contrario, se ha visto que el EGCG es capaz de proteger a las proteínas en ratones ancianos frente al estrés oxidativo inducido por etanol (Luczaj *et al.*, 2004) y se ha demostrado, en estudios con ratones modelos de senescencia acelerada (SAMP10), que las catequinas del té verde administradas en el agua de la bebida, tienen un efecto protector del deterioro cognitivo y suprime la atrofia cerebral de estos animales (Unno *et al.*, 2004). Incluso el té verde disminuye los niveles de 8-oxo-deoxiguanosina (8-oxodG) que es un marcador del daño del ADN en riñón, hígado y cerebro, lo que sugiere que los polifenoles del té verde podrían tener un efecto beneficioso en los daños derivados del proceso del envejecimiento.

1.3.2.7 Protección frente al cáncer

En los últimos años se ha valorado mucho la importancia del té y de sus catequinas como agente quimioterapéutico en el tratamiento del cáncer. Las publicaciones sobre el té y sus componentes como anticancerígenos han incrementado exponencialmente y una simple búsqueda bibliográfica en una base de datos científica, incluyendo las palabras cáncer y té, da lugar a casi 3000 publicaciones sobre este tema. Sin embargo, los resultados epidemiológicos en humanos distan mucho de ser consistentes, unos muestran una reducción de la incidencia, así como de la recurrencia del cáncer debido al consumo de té verde, mientras que otros estudios fracasan a la hora de mostrar algún efecto (Kim y Masuda, 1997, Yang *et al.*, 2002). Por el contrario, los estudios en modelos animales de diferentes tipos de cáncer son mucho más convincentes y demuestran de forma clara los efectos preventivos del té verde y el EGCG en la formación de tumores de mama, próstata, pulmón, y piel, entre otros. Estas evidencias llevaron a la selección del té verde por parte del Instituto Nacional del Cáncer de EEUU para un desarrollo más en profundidad como quimioterapéutico en cáncer (Steele *et al.*, 1999). El extracto de té verde descafeinado se encuentra actualmente en la Fase II de ensayos clínicos. Se han propuesto múltiples mecanismos a nivel molecular para explicar la actuación de las catequinas sobre el cáncer, los cuales podrían resumirse como una modulación de señales celulares asociadas con las distintas etapas de la carcinogénesis.

Un resumen de los efectos del té sobre distintas etapas de iniciación y progresión del cáncer se describen en la **Tabla 1.2**.

Tabla 1.2. Efecto de las catequinas del té sobre distintos tipos de cáncer		
Cáncer	Efectos en animales modelo	Efectos en humanos
Piel	Fotocarcinogénesis (Mukhtar y Ahmad, 2000; Yang y Wang, 1993) ↓ Crecimiento, multiplicidad e incidencia del tumor (Nihal <i>et al.</i> , 2005; Lu <i>et al.</i> , 1997) ↓ Formación y tamaño de papiloma (Conney <i>et al.</i> , 1999) ↓ Progresión de papilomas a SCC (Katiyar <i>et al.</i> , 1997)	↓ Riesgo de carcinoma de células escamosas SCC (Hakim y Harris, 2001) Efecto protector del té en melanoma maligno cutáneo (Naldi <i>et al.</i> , 2004)
Hígado	↓ Focos hepáticos GST+ (Xu <i>et al.</i> , 1992; Zhong <i>et al.</i> , 2001) ↓ Hepatocarcinogénesis, multiplicidad e incidencia del tumor (Landau <i>et al.</i> , 1998)	↓ Cáncer de hígado por té verde (Sueoka <i>et al.</i> , 2001)
Pulmón	↓ Volumen del tumor (Landau <i>et al.</i> , 1998) ↓ Incidencia y multiplicidad (Banerjee <i>et al.</i> , 2005) ↓ Progreso adenoma - adenocarcinoma (Naldi <i>et al.</i> , 2004)	↓ Riesgo en bebedores de té en Uruguay (Mendilaharsu <i>et al.</i> , 1998) ↓ Riesgo de cáncer de pulmón en mujeres no fumadoras (Zhong <i>et al.</i> , 2001; Kubik <i>et al.</i> , 2004)
Gastro-intestinal	↓ Incidencia, avance y multiplicidad del tumor (Hiura <i>et al.</i> , 1997; Takada <i>et al.</i> , 2002; Qanungo <i>et al.</i> , 2005) ↓ Tumorigénesis en intestino delgado (Ju <i>et al.</i> , 2005)	↓ Desarrollo de cáncer gástrico y esofágico en Japón (Wang <i>et al.</i> , 1999) ↓ Cáncer de estómago en 81% de alcohólicos y 16% de fumadores (Mu <i>et al.</i> , 2003)
Páncreas y Vejiga	Prevención de tumor pancreático, inhibición de hiperplasia y lesiones (Hirose <i>et al.</i> , 1995; Majima <i>et al.</i> , 1998) ↓ Formación de tumores de vejiga (Umemura <i>et al.</i> , 2003)	↓ Cáncer pancreático asociado al consumo de té verde (Ji <i>et al.</i> , 1997) ↓ Cáncer de vejiga (Lambert y Yang 2003a)
Mama	↑ Latencia de tumores (Li <i>et al.</i> , 1999) ↓ Formación de tumores multiplicidad y tamaño (Suganuma <i>et al.</i> , 2001) ↓ Crecimiento del tumor, aumento en la proporción	↓ Número de metástasis en nódulos linfoides axilares (Nakachi <i>et al.</i> , 2000) ↓ Riesgo de cáncer de mama (Wu <i>et al.</i> , 2003b; Sun <i>et al.</i> , 2006)

	Bax/Bcl-2, reducción en PCNA y activación de Caspasa-3 (Baliga <i>et al.</i> , 2005)	↓ Cáncer de mama, metástasis y recurrencia (Lambert y Yang, 2003a)
Próstata	Retraso en la incidencia de tumor primario e incremento en tiempo de supervivencia (Gupta <i>et al.</i> , 2001) ↓ Marcadores de angiogénesis y metástasis (Adhami <i>et al.</i> , 2004; Adhami y Mukhtar, 2006) ↓ Tamaño del tumor (Kavanagh <i>et al.</i> , 2001) ↓ Secreción de PSA (Wang <i>et al.</i> , 1999; Roomi <i>et al.</i> , 2005) ↓ Desarrollo y metástasis (Mantena <i>et al.</i> , 2005; Saleem <i>et al.</i> , 2005; Siddiqui <i>et al.</i> , 2006)	↓ Cáncer de próstata proporcional al consumo de té verde (Baliga <i>et al.</i> , 2005) Efecto quimiopreventivo del té verde en pacientes (Bettuzzi <i>et al.</i> , 2006)

Tabla 1.2. Efecto de las catequinas del té sobre distintos tipos de cáncer

1.3.3. EL TÉ COMO ANTIFOLATO

En la actualidad se han propuesto muchos mecanismos para explicar las actividades biológicas de los polifenoles del té (Hou *et al.*, 2004, Lambert y Yang, 2003b), que van desde su actividad antioxidante/prooxidante, inducción o inhibición de enzimas del metabolismo, inhibición de la proliferación celular, inhibición del metabolismo del ácido araquidónico, inducción de apoptosis, inhibición del ADN metiltransferasa, inhibición de la DHFR, de proteasas y de telomerasa, etc.

También se ha visto que las catequinas del té, en especial el EGCG, afectan a diferentes rutas de transducción de señales tales como la inhibición de proteína quinasa, supresión de la activación de los factores de transcripción AP1 y NF- κ B, etc. Sin embargo, todavía no está claro cuáles de estos mecanismos suceden *in vivo* y si son relevantes para la actividad preventiva y antitumoral del cáncer atribuida al té.

En base a la observación de que el EGCG posee efectos similares a los antifolatos a nivel fisiológico, celular y molecular, en nuestro laboratorio se propuso, por primera vez, la posibilidad de que los efectos, ampliamente descritos en la bibliografía, para las catequinas del té, y en especial los antitumorales, pudieran estar relacionados con su capacidad para inhibir a la enzima DHFR o, lo que es lo mismo, se propuso que las catequinas del té podrían actuar como antifolatos (Navarro-Perán *et al.*, 2005a). La primera indicación de esta posibilidad

fue aportada por la similitud estructural entre la EGCG y varios de los inhibidores de la DHFR, como MTX y la tetrahydroquinazolina (TQD) (**Figura 1.40**).

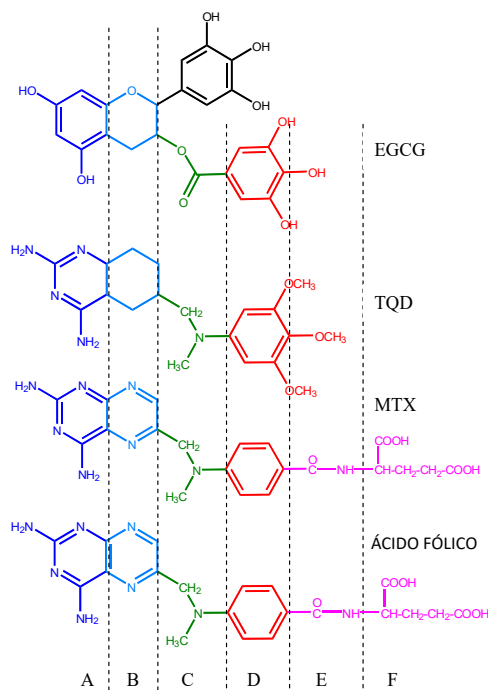


Figura 1.40. Comparación estructural del EGCG con el ácido fólico y dos inhibidores de la DHFR (MTX y TQD).

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 posición 6 del ácido fólico y los antifolatos. Es importante señalar que el EGCG en la región A, presenta dos grupos OH fenólicos 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 hDHFR). Las regiones B y C muestran una mayor tolerancia a otras posibilidades, aunque es importante no modificar la posición de la cadena lateral unida (posición 6) donde los esteres del gálico de las catequinas tienen un grupo éster. La región D es la misma en los esteres 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.

1.3.3.1 Inhibición de DHFR por las catequinas del té

Se ha observado que extractos de té verde, que contienen cantidades importantes de catequinas, inhiben significativamente la actividad de DHFR de hígado bovino (Navarro-Perán *et al.*, 2005b). Para profundizar en el estudio de esta inhibición y saber cuáles de los componentes del té eran responsables de tal inhibición, se ensayó en nuestro laboratorio la actividad DHFR en presencia de EC, EGC, ECG y EGCG dando como resultado que tanto ECG como EGCG eran potentes inhibidores de la enzima bovina y que aquellos polifenoles que carecen de la porción galato unida por enlace éster (EGC y EC) no inhibían a la DHFR. De estos resultados se dedujo que la fracción de galato unida por medio de un enlace éster es esencial para la inhibición de la DHFR de hígado bovino. Estudios cinéticos posteriores demostraron que el EGCG y el ECG inhiben la actividad de la DHFR humana y de hígado bovino de una forma dependiente del tiempo, cuyo origen es la formación de un complejo de disociación lenta después de la unión del NADPH al complejo de la enzima con el galato de catequina, siendo la unión del inhibidor a la holoenzima cinéticamente despreciable (Navarro-Perán *et al.*, 2005b; 2007). Se determinaron las constantes cinéticas individuales del mecanismo y la constante de inhibición global para cada catequina, la cual es del orden de las unidades de nanomolar para el EGCG y más de cinco veces mayor para el ECG.

1.3.3.2. Modelaje molecular e interacción EGCG-DHFR

El uso de modelaje molecular es una aproximación válida para comprobar la interacción entre una enzima y su inhibidor. De esta forma se analizó la unión entre el EGCG y la DHFR, utilizando como guía la posición del ligando tetrahydroquinazolina (TQD) para introducir la molécula de EGCG en la estructura de la DHFR humana y, posteriormente, se minimizó la energía (Navarro-Perán *et al.*, 2005a). Comparando con un amplio rango de estructuras de DHFRs conteniendo folato u otros inhibidores, se observó que la mayor parte de la molécula de EGCG encajaba con la superficie consenso sustrato/inhibidor, a excepción de la región del trihidroxibenceno que no está unida a la molécula con un enlace éster. Se pudieron detectar interacciones por puentes de hidrogeno específicas, la más importante, sin duda, la establecida entre el grupo OH fenólico y el residuo de Glu-30 de la DHFR (distancia O...O 2.7Å) (**Figura 1.41**).

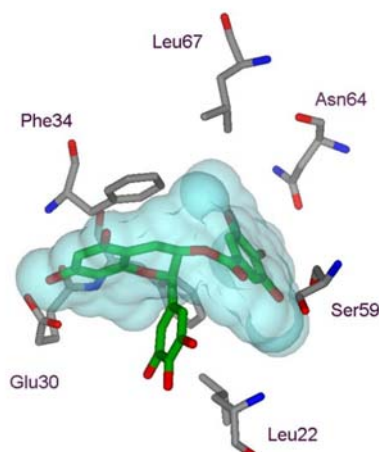


Figura 1.41. Modelo molecular de EGCG en el sitio de unión de folato de DHFR humana. Los átomos de carbono de EGCG y los de proteína están coloreados en verde y gris, respectivamente

En el caso de la interacción de DHFR con folato y metotrexato se forman dos puentes de hidrogeno en los que participan los dos oxígenos del Glu-30 y los nitrógenos del grupo amino adyacente de los compuestos (ambos con distancia O...N \leq 2.8 Å). Otros contactos moleculares entre EGCG-DHFR son similares a los encontrados para TQD. Utilizando esta misma aproximación, investigadores de otro laboratorio estudiaron la interacción de EGCG con la ecDHFR (Spina *et al.*, 2008), observando que el EGCG era capaz de unirse a dos sitios de la enzima, el sitio A que es el lugar de unión del cofactor y el sitio B donde se une el sustrato de la enzima.

Nuevas evidencias experimentales sobre la interacción EGCG-DHFR fueron aportadas utilizando una técnica distinta y novedosa (Hannewald *et al.*, 2008). Estos autores pusieron a punto una metodología basada en la detección de la unión de moléculas y proteínas mediante el uso de MALDI-TOF-MS. Para el caso de DHFR humana recombinante, determinaron su unión a diferentes compuestos, entre ellos el ácido fólico, el ácido folínico, AMT, MTX, PYR y EGCG. El protocolo consistió en la incubación de la enzima DHFR con el compuesto con el que se quería evaluar su interacción. Después de una hora, la mezcla se filtraba a través de un filtro de 10 kDa, de forma que, después de una centrifugación, las moléculas no unidas pueden atravesar el filtro, mientras que las unidas a la enzima eran retenidas. Después de varios lavados para eliminar las moléculas no unidas, la DHFR unida con los sustratos e inhibidores era eluída con agua ultrapura invirtiendo el filtro. El volumen eluído se analizó mediante MALDI-TOF-MS detectando la presencia de las moléculas por sus espectros de

masas característicos. De esta forma, los autores probaron la interacción de EGCG con DHFR determinando que su afinidad era superior a la encontrada para PYR aunque más débil que la del MTX.

1.3.3.3. Inhibición de DHFR por EGCG en células tumorales

En nuestro laboratorio se llevaron a cabo una serie de experimentos con cultivos celulares con el fin de poder extrapolar los efectos de la inhibición de DHFR por EGCG a una situación *in vivo* (Navarro-Perán *et al.*, 2005a). Para ello, células de linfoma de ratón (línea celular L1210) se trataron con diferentes concentraciones de EGCG, observándose que este compuesto inhibía significativamente el crecimiento de las células de una forma dependiente de la concentración ($IC_{50} = 20 \mu M$). Los resultados indicaban que el EGCG poseía actividad antifolato y que su efecto pro-oxidante también contribuía a su citotoxicidad, sobre todo a la alta concentración ($20 \mu M$) utilizada en el ensayo.

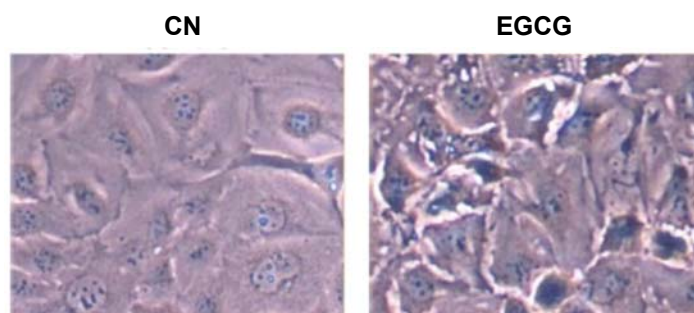


Figura 1.42. Efecto del EGCG en células modelo del epitelio intestinal.

La morfología de las células tumorales CACO-2 sufre cambios significativos que sugieren apoptosis, como la pérdida de volumen celular y de contactos intercelulares y la fragmentación de las membranas.

Para lograr una aproximación más real, los experimentos sobre la actividad del EGCG sobre células L1210 se realizaron en medios que contenían bajas concentraciones de folatos reducidos y, en estos medios, el IC_{50} del EGCG fue mucho menor ($3 \mu M$). Los resultados indicaban que en condiciones fisiológicas de bajo folato, la actividad antifolato de esta catequina era el efecto antiproliferativo predominante. La actividad antifolato del EGCG también se demostró sobre células CACO-2 derivadas de adenocarcinoma de colon (Navarro-Perán *et al.*, 2007). Estas células a menudo han servido como un modelo celular del epitelio intestinal humano, por lo que los resultados podrían ser de interés para esclarecer la relación existente entre la ingesta habitual de té verde y el bajo riesgo de padecer cáncer gastrointestinal (Mu *et al.*, 2005).

1.3.3.4 Efectos de la interrupción del ciclo del fólico por EGCG

Un bloqueo en el ciclo del fólico por parte del EGCG podría explicar gran parte de los efectos celulares y moleculares descritos para esta catequina. Los antifolatos ejercen su acción interrumpiendo el metabolismo de los ácidos nucleicos, incluyendo su síntesis, metilación y estabilidad. En experimentos realizados para determinar el efecto del EGCG sobre la síntesis de ADN (Navarro-Perán *et al.*, 2007) se estudió la cantidad de timidina tritiada ($^3\text{H-Thy}$) incorporada en el ADN de células tratadas con EGCG o MTX. El efecto de los antifolatos sobre la incorporación de $^3\text{H-Thy}$ al ADN es bien conocido (da Costa *et al.*, 1972). La adición de antifolatos, como el MTX, al medio de cultivo de células provoca la inhibición de la DHFR y, por lo tanto, se bloquea la metilación de novo de dUMP a TMP, lo que hace que se favorezca la incorporación exógena de $^3\text{H-Thy}$ al ADN. En estos ensayos, se observó que las células tratadas con EGCG o MTX incorporaban un 175% y un 225% de $^3\text{H-Thy}$ más que las células control, respectivamente, demostrándose que, al igual que el MTX, el EGCG era capaz de alterar la ruta de síntesis del ADN.

Además de su acción sobre la síntesis del ADN, el tratamiento con antifolatos también ha sido relacionado con una disminución de la metilación celular. Los patrones de metilación se encuentran con frecuencia alterados en células cancerosas e incluyen desde hipometilación a lo largo del genoma completo como casos de hipermetilación en regiones concretas denominadas islas CpG (Jones y Laird, 1999; Widschwendter y Jones, 2002). Se ha propuesto recientemente, que el efecto del EGCG sobre la desmetilación de las islas CpG y la reactivación de genes silenciados mediante metilación se produce a través de la inhibición de la ADN metiltransferasa (DNMT) (Fang *et al.*, 2003). Sin embargo, por otro lado, también se conoce que una deficiencia en ácido fólico puede dar lugar a defectos en la metilación del ADN (Kim, 2003; Niculescu y Zeisel, 2002). Así, el ADN se ha encontrado hipometilado en el cerebro de ratas alimentadas con una dieta pobre en folato (Kim *et al.*, 1997) o tratadas con MTX (Alonso-Apperte y Varela-Moreiras, 1996). A pesar de que el EGCG pueda inhibir a la DNMT *in vitro* (Fang *et al.*, 2003), en nuestro laboratorio demostramos que la hipometilación de p16 por EGCG en células de Caco-2 era debida a un bloqueo en el ciclo del ácido fólico, ya que la presencia de leucovorin (un antídoto contra los antifolatos) era capaz de revertir la acción del EGCG (Navarro-Perán *et al.*, 2007). Los resultados indicaban que la bajada celular de THF en presencia de EGCG prevenía la hipermetilación y el silenciamiento de genes supresores de tumores, lo cual podría contribuir a la prevención y a la regresión del cáncer.

Aunque los antifolatos han sido ampliamente utilizados durante décadas como anticancerígenos, en la actualidad estas drogas tienen otro importante papel terapéutico en enfermedades no neoplásicas, actuando como anti-inflamatorios y drogas inmunosupresoras. En concreto, el MTX es usado de forma común en el tratamiento de artritis reumatoide, psoriasis, cirrosis biliar primaria, enfermedad de Crohn y asma intrínseco (Majumdar y Aggarwal, 2001). El mecanismo mediante el cual el MTX actúa como un anti-inflamatorio todavía hoy se desconoce, aunque muchos de sus efectos se han explicado mediante la supresión de la activación del NF- κ B. Al igual que con el MTX, existen numerosos estudios que demuestran que el EGCG presenta una marcada actividad anti-inflamatoria tanto en sistemas de cultivos celulares como en modelos animales (Suekoa *et al.*, 2001). Parece ser que la actividad anti-inflamatoria de los antifolatos podría estar relacionada con la disminución de la biosíntesis de purinas asociada con su tratamiento (Cutolo *et al.*, 2001; Majumdar y Aggarwal, 2001). Esta inhibición resulta en un aumento de la adenosina en el espacio extracelular, la cual es un potente regulador endógeno de varios procesos fisiológicos a través de su unión a receptores específicos de la superficie celular, denominados receptores de adenosina A1, A2A, A2B y A3, los cuales se encuentran en gran cantidad de células (Fishman *et al.*, 2001). Se ha demostrado que el MTX suprime la activación de NF- κ B, a través de la liberación de adenosina, lo cual contribuye a sus propiedades anti-inflamatorias e inmunomoduladoras (Majumdar y Aggarwal, 2001). En experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio se observó que el EGCG era capaz de modular la activación constitutiva de NF- κ B en células de cáncer de colon mediante la liberación de adenosina (Navarro-Perán *et al.*, 2008). Al igual que el MTX (Ochaion *et al.*, 2006), el EGCG era capaz de sobreexpresar los niveles del receptor A3, lo que es necesario para que actúe la adenosina uniéndose e inhibiendo la activación de NF- κ B, lo que en última instancia lleva a un arresto del ciclo celular y a la inducción de apoptosis (Chen *et al.*, 2003, Hwang *et al.*, 2007). Estos datos muestran una relación entre inflamación y cáncer y explicarían como el EGCG actuando como un antiinflamatorio podría prevenir la formación del cáncer.

1.4 VENENOS DE SERPIENTES

Las serpientes pertenecen al grupo de los ofidios, son reptiles de cuerpo muy alargado, por lo general cilíndrico y desprovisto de miembros aparentes. Las mordeduras de serpiente son un problema importante de salud pública en los países en desarrollo como África y son las responsables de una alta mortalidad (Shimi *et al.*, 2011). En Túnez, especies como *Cerastes cerastes*, *Cerastes vipera* y *Macrovipera lebetina*, se consideran como las más peligrosas y

venenosas. Se encuentran repartidas geográficamente en gran parte en las zonas sub-húmedas y semiáridas de la región del norte de Túnez y en las regiones áridas y saharianas del sur de Túnez (Bazaa *et al.*, 2005). Así, ***Macrovipera lebetina*** es una de las víboras más comunes y venenosas en Túnez.

1.4.1. COMPONENTES DE LOS VENENOS DE SERPIENTE

Los venenos de serpientes están compuestos por una mezcla compleja de moléculas biológicas, tales como enzimas y toxinas que son proteínas de pequeño tamaño cuya función principal es la de participar en la inmovilización y/o la digestión de la presa. Además, los venenos de serpientes pueden causar, después de la picadura, una coagulación o anti coagulación, edema o necrosis. Entre los efectos producidos por la mordedura de una serpiente estarían, salivación intensa, asfixia, caída de la presión arterial, alteraciones celulares, parálisis respiratoria o parálisis de la extremidad mordida.

Algunas toxinas, presentes en el veneno de serpiente, tienen la capacidad de causar toxicidad asociada con su alta especificidad y afinidad por células y tejidos. Sin embargo, a pesar de sus efectos toxicológicos, varios péptidos y proteínas extraídos de los venenos de serpientes se utilizan como productos farmacéuticos (Waheed *et al.*, 2017). De hecho, muchas proteínas aisladas a partir de venenos de serpientes tienen un potencial anti-angiogénico, anti-plaquetario y anti-metastásico, y pueden tener aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de muchas enfermedades tales como trombosis, hipertensión y cáncer (Doley y Kini, 2009; Vyas *et al.*, 2013).

Varias proteínas purificadas a partir de los venenos de serpientes de origen tunecino se han caracterizado y se ha estudiado sus aplicaciones terapéuticas y farmacológicas en varias patologías. Estas proteínas pertenecen a diferentes familias tales como: L-amino ácido oxidasas (Abdelkafi-Koubaa *et al.*, 2014), fosfolipasas A2 (Bazaa *et al.*, 2010; Kessentini-Zouari *et al.*, 2010), serin-proteasas (Morjen *et al.*, 2014), desintegrinas (Ben Mabrouk *et al.*, 2016. Limam *et al.*, 2010; Olfa *et al.*, 2005) y lectinas de tipo C (Sarray *et al.*, 2003, 2004, 2007, Pilorget *et al.*, 2007, Jebali *et al.*, 2014 y Montassar *et al.*, 2017).

La mayoría de las proteínas de estas familias han sido validadas por su efecto inhibitor sobre la proliferación, adhesión, migración celular y la invasión, a través de ciertas moléculas de adhesión, como las integrinas (Sarray *et al.*, 2003, 2004, 2007; Olfa *et al.*, 2005; Bazaa *et al.*, 2005, 2010; Pilorget *et al.*, 2007; Kessentini-Zouari *et al.*, 2010; Jebali *et al.*, 2014; Morjen *et*

al., 2014; Abdelkafi-Koubaa *et al.*, 2014; Zakraoui *et al.*, 2016). En esta Tesis estudiaremos sólo la familia de las desintegrinas y las lectinas de tipo C como fuente de moléculas bioactivas de interés farmacológico.

1.4.1.1. Las desintegrinas

Las desintegrinas son polipéptidos no enzimáticos y no tóxicos de bajo peso molecular (5-10 kDa), derivados del veneno de Atractaspididés, Elapidae, Colubridae y Viperidae (Calvete, 2005; Calvete *et al.*, 2005; McLane *et al.*, 2004). Estos polipéptidos contienen una secuencia RGD (Arg-Gly-Asp), KGD (Lys-Gly-Asp) u otras que les permiten unirse específicamente a sus objetivos (integrinas u otras proteínas). De acuerdo con su estructura y función, las desintegrinas se pueden clasificar en diferentes subfamilias (Marcinkiewicz, 2005). A nivel estructural, las desintegrinas se pueden subdividir en monómeros y dímeros de formas homodiméricas y heterodiméricas. Las desintegrinas monoméricas se clasifican según la longitud de su cadena polipeptídica y el número de cisteínas: corto con 8 cisteínas, promedio con 12 cisteínas y largo que contiene 14 cisteínas. Para las desintegrinas diméricas, cada subunidad contiene 10 cisteínas (Ifigeneia *et al.*, 2015).

1.4.1.1.1 Clasificación y diversidad de desintegrinas

La clasificación funcional de las desintegrinas, derivadas de los venenos de víbora, se basó en la presencia de un motivo tripeptídico localizado en el sitio activo. Se pueden distinguir varios grupos funcionales de las desintegrinas que expresan secuencias RGD, WGD, KGD, MLD o KTS, RTS (Marcinkiewicz, 2013). Otras características estructurales también son importantes en la afinidad y selectividad de esta familia de moléculas, como la región C-terminal (Marcinkiewicz *et al.*, 1997). La mayoría de estas desintegrinas contienen la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) en la posición conservada, pero esto puede alterarse, lo que modifica la afinidad y la especificidad de estas moléculas antagonistas de las integrinas. Esta inhibición se rige por el emparejamiento apropiado de las cisteínas que determina la conformación del bucle inhibidor de las desintegrinas.

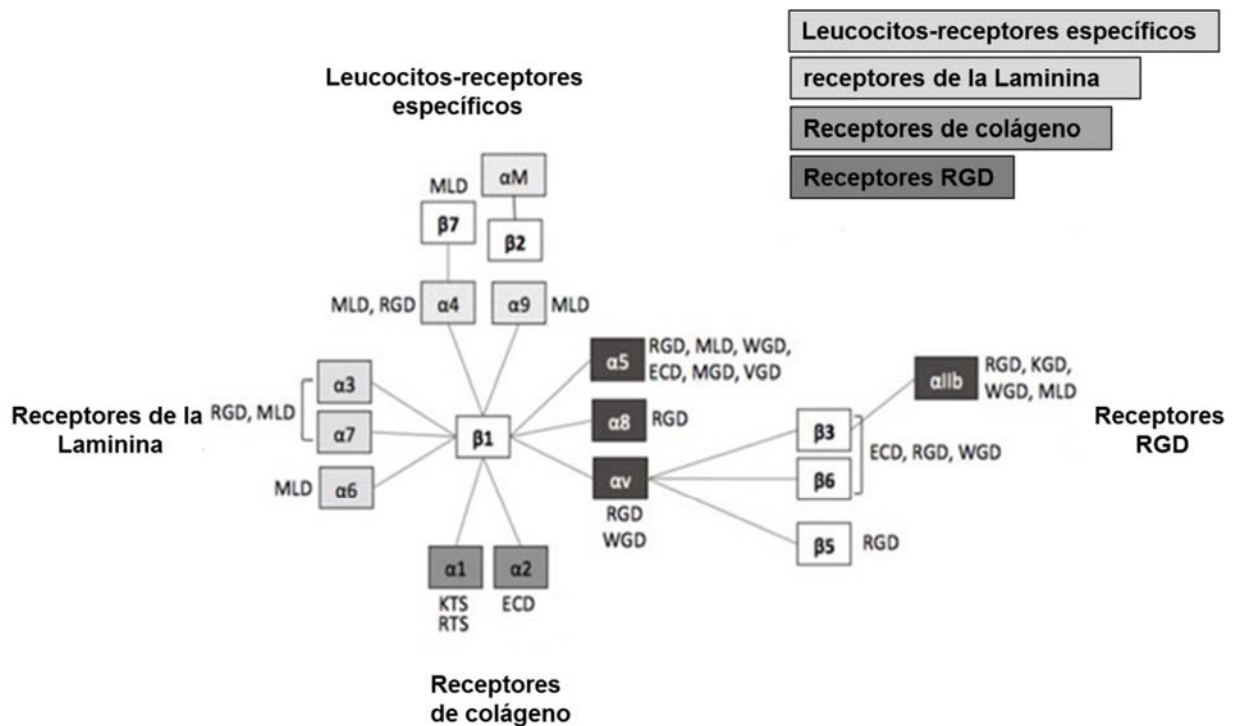


Figura 1.43. Diagrama de la familia de las integrinas y diferentes motivos de inhibidores identificados en las desintegrina (Arruda et al, 2015). Este diagrama muestra los motivos en los cuales las desintegrinas, una vez reconocidas por las integrinas correspondientes, bloquean la unión específicamente a sus ligandos. (R: arginina; G: glicina; D: ácido aspártico; V: valina; M: metionina; L: leucina; W: triptófano; K: lisina; T: treonina; S: serina).

Filogenéticamente, existen evidencias sólidas de que la diversidad de las desintegrinas podría ser debida a una evolución acelerada de los residuos expuestos en la superficie de un motivo de reconocimiento ancestral, RGD. Otras desintegrinas se caracterizaron por sustituciones de una sola base para generar otros motivos de unión tales como KGD, MGD, WGD y VGD. Las desintegrinas que contienen el motivo RGD muestran así una afinidad y selectividad diferente con las integrinas que reconocen la secuencia RGD en sus ligandos tales como, la integrina $\alpha v\beta 3$ (receptor de la vitronectina), la integrina $\alpha 5\beta 1$ (receptor de la fibronectina) y la integrina $\alpha IIb\beta 3$ (receptor del fibrinógeno). Las desintegrinas que contienen la secuencia MLD son heterodiméricas y se unen a las integrinas $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ y $\alpha 9\beta 1$. Estas integrinas se encuentran en la superficie de los leucocitos y contribuyen a la respuesta inmunitaria durante la inflamación. La presencia de otro motivo en la segunda subunidad, como RGD, determina su actividad en comparación con las demás, incluyendo las integrinas $\alpha 5\beta 1$. Estructuralmente, las desintegrinas que contienen el motivo KTS, son moléculas monoméricas cortas que actúan

específicamente a través de la integrina $\alpha 1\beta 1$, receptor específico del colágeno de tipo IV (Kallech-Ziri et al., 2007). La **Figura 1.43** muestra un diagrama de la familia de las integrinas y los diferentes motivos de los tripéptidos identificados en las desintegrinas bloqueando las interacciones específicas integrina-ligando (Arruda et al., 2015).

1.4.1.1.2 Implicaciones terapéuticas de las desintegrinas

Varias desintegrinas, gracias a sus interacciones con diferentes integrinas, han demostrado actividad antitumoral en etapas clave de la progresión tumoral (Marcinkiewicz, 2013; Arruda et al., 2015).

El bloqueo de las integrinas, en varias líneas celulares tumorales, contribuye a la inhibición de la adhesión a la matriz extracelular y a la reducción de su movilidad, lo que conduce a la inhibición de la metástasis (Kim et al., 2004 y Sheu et al., 1994; Zhou et al, 2000). La integrina $\alpha v\beta 3$ ha sido considerada como una diana potencial en la terapia contra el cáncer (Raab-Westphal et al., 2017). Varios estudios han demostrado que las desintegrinas purificadas de los venenos de serpientes actúan específicamente contra esta integrina (Marcinkiewicz, 2013). Estudios previos han demostrado que la interacción de una desintegrina (que tienen un motivo RGD) con la integrina $\alpha v\beta 3$ da como resultado la aparición de una señal apoptótica antes del desprendimiento de la matriz extracelular en células $\alpha v\beta 3$ -293 transfectadas con esta integrina.

Otra desintegrina, con una secuencia RGD, y obtenida del crótalo norteamericano *Agkistrodon contortrix*, la contortrostatina (CN), ha demostrado un papel modulador en la angiogénesis a través de su interacción con la integrina $\alpha v\beta 3$ en las células endoteliales (Selistre de Araujo et al., 2010).

Se ha demostrado también que la CN podría potenciar la adhesión de las células cancerosas a través de proteínas estructurales, impidiendo, a dichas células, atravesar las membranas basales y bloquear su difusión a otras zonas del cuerpo. La interacción de CN con otras integrinas, tales como $\alpha 11\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 5\beta 3$, y $\alpha 5\beta 5$ se demostró por su potencial anticancerígeno. Dos estudios independientes (Radu et al., 2005; Zhou et al., 2000) han demostrado que la CN es un agente antitumoral que tiene actividades anti-angiogénicas y anti-metastáticas. Además, otros trabajos han mostrado que esta proteína no inhibe solamente el crecimiento del tumor, sino que también reduce el número de micro y macro metástasis pulmonares (Markland et al., 2001).

Desintegrinas	Estructura	Motivo adhesivo	Integrina preferida	Especie	Actividad inhibidora
Rodostomina	Monomérica corta	RGD	$\alpha v\beta 3$	<i>Calleselasma rhodostoma</i>	tumor angiogénesis
Albolabrina	Monomérica media	RGD		<i>Trimeresurus albolabris</i>	melanoma metástasis
Triflavina	Monomérica corta	RGD	$\alpha v\beta 3$	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	angiogénesis
Trigramina	Monomérica media	RGD	$\alpha v\beta 3$	<i>Trimeresurus gramineus</i>	metástasis
Eristostatina	Monomérica media	RGD	$\alpha_{ii} \beta 3$	<i>Eristicophis macmahoni</i>	melanoma metástasis
Echisitatina	Monomérica media	RGD	$\alpha v\beta 3$	<i>Echis carinatus</i>	Osteoclastos migración
Contortrostatina	Monomérica media	RGD	$\alpha v\beta 5, \alpha v\beta 3$	<i>Agistrodon contortrix</i>	tumor angiogénesis
Obtustatina	Monomérica corta	KTS	$\alpha 1\beta 1$	<i>Vipera lebetina obtusa</i>	células endoteliales proliferación
Viperistatina	Monomérica corta	KTS	$\alpha 1\beta 1$	<i>Vipera plaestonae</i>	células de melanoma Transmigración
Lebestatina	Monomérica corta	KTS	$\alpha 1\beta 1$	<i>Macrovipera lebetina</i>	angiogénesis
VLO5	Heterodimérica	VGD, MLD	$\alpha 9\beta 1$	<i>Vipera lebetina optusa</i>	glioblastoma Crecimiento
Lebeina	Heterodimérica	RGD	$\alpha 5\beta 1$	<i>Macrovipera lebetina</i>	angiogénesis proliferación
CC5 CC8	Homodimérica Heterodimérica	RGD	$\alpha 5\beta 1$ $\alpha v\beta 3$	<i>Cerastes cerastes</i>	Angiogénesis
Leberagina-C	Monomérica	SECD	$\alpha v\beta 3$	<i>Macrovipera lebetina Transmediterranea</i>	Adhesión celular

Tabla 1.3. Los efectos de diversas desintegrinas purificadas a partir de venenos de serpientes en varias líneas tumorales (Ifigeneia et al., 2015).

Otra desintegrina, la Obtustatina, purificada a partir del veneno de *Macrovipera lebetina obtusa*, mostró que posee un poder inhibitor del crecimiento de las células de carcinoma de pulmón *in vivo*. Su efecto inhibitor de la angiogénesis se induce mediante la interacción específica con la integrina $\alpha 1\beta 1$ (Marcinkiewicz *et al.*, 2003). Otras desintegrinas se caracterizaron por sus actividades anti-proliferativas, anti-adhesivas, anti-angiogénicas y anti-metastásicas en líneas tumorales, como la Salmosin, la Rhodostomin y la Albolabrin, a partir de venenos de *Agkistrodon halys brevicaudus*, *Calloselasma rhodostoma* y *Trimeresurus albolabris*, respectivamente (Arruda *et al.*, 2015).

Varias desintegrinas aisladas del veneno de dos víboras de Túnez, *Cerastes cerastes* y *Macrovipera lebetina*, fueron validadas por sus actividades anti-tumorales (Zakraoui *et al.*, 2016; Ben-Mabrouk *et al.*, 2016; Limam *et al.*, 2010; Olfa *et al.*, 2005). La lebestatina, una desintegrina purificada a partir del veneno de *Macrovipera lebetina* que interactúa específicamente con la integrina $\alpha 1\beta 1$, indujo el bloqueo de la adhesión y la migración celular, lo que resultó en una inhibición de la angiogénesis *ex vivo* (Olfa *et al.*, 2005). Otro tipo de desintegrina, purificada del mismo veneno, Leberagin C, bloqueó la adhesión de las células tumorales de melanoma al interferir con la integrina $\alpha v\beta 3$ (Limam *et al.*, 2010). Ben-Mabrouk *et al.* (2016) han demostrado que CC5 y CC8, dos desintegrinas purificadas del veneno de *Cerastes cerastes*, bloquean la angiogénesis de las células endoteliales *in vitro* y *ex vivo* a través de las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha 5\beta 1$.

Estudios anteriores demostraron que la Lebeina, una desintegrina heterodímera purificada a partir del veneno *Macrovipera lebetina*, se unía fuertemente a la laminina a través de las integrinas beta 1 ($\alpha 7\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ y $\alpha 3\beta 1$) mientras que no interaccionaba con las integrinas de unión al colágeno ($\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$) (Eble *et al.*, 2003). Un estudio más reciente demostró que esta proteína era capaz de reducir las metástasis *in vivo* en el hígado mediante el bloqueo directo de las células tumorales con componentes específicos de la matriz extracelular, la laminina y el colágeno (Rosenow *et al.*, 2008). Kusuma *et al.* (2012), mostró que esta desintegrina inhibe la invasión de células tumorales de mama y bloquea la metástasis (Kusuma *et al.*, 2012) a través de una respuesta dependiente de la integrina vis-a-vis y una proteína de la membrana basal, la laminina (LM)-511. Recientemente, nuestro grupo de investigación demostró que la Lebeina, caracterizada previamente como una inhibidora de la agregación plaquetaria (Gasmi *et al.*, 2001), también inhibía la proliferación de las células tumorales colorrectales *in vitro* a través del bloqueo del ciclo celular y la inducción de apoptosis, en un proceso que involucraba múltiples efectores celulares (Zakraoui *et al.*, 2016). Del mismo modo,

esta proteína era capaz de bloquear la progresión del tumor *in vivo* mediante la inhibición de la angiogénesis que dependía, en parte, de un bloqueo de la integrina $\alpha 5\beta 1$, una disminución en la expresión de VEGF (un factor clave de angiogénesis patológica) y su correceptor Neuropilin 1 (NRP1) (Zakraoui *et al.*, 2016).

1.4.1.2. Las lectinas de tipo C

Las lectinas de tipo C (CLEC) se refieren a un grupo de proteínas que tienen un dominio de proteína de unión a carbohidratos conocido como lectina (Zelensky y Gready, 2005). Esta familia de moléculas se ha identificado en plantas y en algunos animales. La designación de tipo C se debe al hecho de que esta familia de moléculas requiere calcio para unir carbohidratos. Las lectinas de tipo C tienen varias funciones en la respuesta inmune a los patógenos, la adhesión célula-célula y la muerte programada (Drickamer 1999, Cambi y Figdor 2009).

1.4.1.2.1. Clasificación y diversidad de las lectinas de tipo C

Las lectinas de tipo C, derivadas de venenos de serpientes se pueden dividir en dos clases:

- Lectinas clásicas, dependientes de Ca^{2+} y que contienen un dominio CRD 8, uniendo azúcares específicos de manera reversible y no covalente. Estas lectinas tienen una estructura homodimérica con puentes disulfuro entre cadenas que, mediante su asociación, forman grandes multímeros.
- Los snaclecs, desprovista de Ca^{2+} y con un dominio de fijación del azúcar 5. Tienen una estructura heterodimérica $\alpha\beta$ (unidad estructural a partir del cual los diferentes lectinas están formados por oligomerización) (Toyama *et al.*, 2001). Estas lectinas son las más abundantes en los venenos de serpientes.

Debido a la especificidad de nuestro trabajo y para evitar una excesiva extensión, en esta introducción, sólo nos centraremos en la clase snaclecs o CLP.

- Clase de snaclec o CLP

El término snaclecs se dio para designar a las lectinas de tipo C (CLPs) que derivan de los venenos de serpientes. Esta nomenclatura fue dada por Clemetson *et al.* (2009) para evitar la confusión con las lectinas de tipo C clásicas y para transmitir información sobre la estructura de hetero u oligómeros. La mayoría de snaclecs son heterodímeros que tienen una subunidad

alfa (14-15 kDa) y otra beta (13-14 kDa) casi siempre unidas de manera covalente mediante un enlace disulfuro suplementario (Lu *et al.*, 2005 y Ogawa *et al.*, 2005). Los heterodímeros son a menudo multiméricos unidos de manera no covalente o bien de manera covalente a través de enlaces disulfuro adicionales, para formar estructuras más grandes. Las snaclecs son conocidas por sus estructuras heterodiméricas $\alpha\beta$ de base. Se unen a una amplia gama de factores de coagulación, otras proteínas implicadas en la hemostasis y a receptores de membrana en las plaquetas (Clemetson *et al.*, 2010). Sin embargo, muchos tienen más de un sitio de unión y/o pueden interactuar con más de un conjunto de proteínas/receptores.

1.4.1.2.2. Implicaciones terapéuticas de las lectinas de tipo C

Los CLPs se describen principalmente como moduladores de la agregación plaquetaria, dirigidos al factor de von Willebrand (vWF) (Arlinghaus et Eble, 2012), GPIb-IX-V, GPVI y, opcionalmente, a otros receptores plaquetarios (Clemetson *et al.*, 2005).

La lebetina y la lebetina, purificadas del veneno de serpiente *Macrovipera lebetina*, fueron las primeras snaclec descritas por sus efectos antitumorales además de por sus actividades plaquetarias antiagregantes (Sarray *et al.*, 2007). Estas proteínas son capaces de inhibir la adhesión de diversas líneas celulares de melanoma (IGR39), adenocarcinoma (HT29-D4), fibrosarcoma (HT1080) y células leucémicas (K562) a diferentes proteínas de la matriz extracelular (ECM). Además, se ha demostrado que la lebetina inhibe la proliferación, la migración y la invasión de células HT1080 (Sarray *et al.*, 2004, 2007) y también está dotada de actividad antiangiogénica (Pilorget *et al.*, 2007). Estos efectos se han asociado con la inhibición de las integrinas αv y $\alpha 5\beta 1$ (Sarray *et al.*, 2007, Pilorget *et al.*, 2007).

Las CLP extraídas de los venenos de serpientes interfieren con la actividad de la integrina y actúan inhibiendo al receptor de colágeno $\alpha 2\beta 1$ (Jakubowski *et al.*, 2013). Sin embargo, Marcinkiewicz y sus colaboradores (2000) describieron una actividad anti-integrina $\alpha 2\beta 1$ para la EMS16, una lectina de tipo C derivada de *Echis multisquamatus*. Otras CLPs, como la bilinexina de *Agkistrodon bilineatus* (Du *et al.*, 2001) y la aggreтина de *Calloselasma rhodostoma* (Suzuki-Inoue *et al.*, 2001), también parecen estar dirigidas a la integrina $\alpha 2\beta 1$, aunque la pareja de unión de este último péptido se discute controvertidamente (Suzuki-Inoue *et al.*, 2006).

CTL	Especie	Diana	Secuencia	Función
Mucétina	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	GPIb	+	Agonista de plaquetas
Mucrocétina	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	GPIb	+	Aglutinante
Flavocétina-A	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	GPIb	+	Antagonista de plaquetas
Mamushigina	<i>Agkistrodon blays blomboffii</i>	GPIb	+	Agonista de plaquetas
Alboggregina-B	<i>Trimeresurus albolabris</i>	GPIb	-	Agonista de plaquetas
Alboggregina-C	<i>Trimeresurus albolabris</i>	GPIb	-	
Agglucétina	<i>Agkistrodon acutus</i>	GPIb	-	Pro-aglutinante
GPIb-BP	<i>Bothrops jararaca</i>	GPIb	+	
Agkicétina	<i>Agkistrodon acutus</i>	GPIb	+	Anti-aglutinante
CHH-A et B	<i>Crotalus borridus borridus</i>	GPIb	+	Antagonista de plaquetas
Echicétina	<i>Echis carinatus</i>	GPIb/IgMk	+	Antagonista de plaquetas
Lebécétina	<i>Macrovipera lebetina</i>	GPIb	+	Antagonista de plaquetas
TSV-GPIB-BP	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	GPIb	+	Antagonista de plaquetas y anti-aglutinante
Tokaracétina	<i>Trimeresurus tokarensis</i>	GPIb	-	Antagonista de plaquetas
Dabocétina	<i>Daboia russellii siamensis</i>	GPIb	+	anti-aglutinante
Purpuréotina	<i>Trimeresurus purpureomaculatus</i>	GPIb	+	Agonista de plaquetas anti-aglutinante y antagonista de plaquetas
Agkistina	<i>Agkistrodon acutus</i>	GPIb	+	
Convulxina	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	GPIb, GPVI	+	Agonista de plaquetas
Alboggregina-A	<i>Trimeresurus albolabris</i>	GPIb, GPVI	+	Agonista de plaquetas
Stejnuxina	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	GPVI	+	Agonista de plaquetas
Ophioluxina	<i>Ophiophagus bannab</i>	GPVI	-	Agonista de plaquetas
Alboluxina	<i>Trimeresurus albolabris</i>	GPIb, GPVI	-	Agonista de plaquetas
Botrocétina	<i>Bothrops jararaca</i>	fvW / GPIb	+	Pro-aglutinante
Bitiscétina	<i>Bitis arietans</i>	fvW / GPIb	+	Agonista de plaquetas
EMS16	<i>Echis multiquamatus</i>	GPa/Ila	+	Antagonista de plaquetas
Aggretina	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	GPIb, GPa/Ila	+	Agonista de plaquetas
Rhodocétina	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	GPa/Ila	+	Antagonista de plaquetas
Bilinoxina	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	GPIb, GPa/Ila	+	Aglutinante
Ba25	<i>Bitis arietans</i>	GPIb, GPa/Ila	+	Pro-aglutinante
Agkisacutacina	<i>Agkistrodon acutus</i>	GPIb, IX/X	+	Anti-coagulante y anti-aglutinante
Agkaggregina	<i>Agkistrodon acutus</i>	Desconocido	-	Agonista de plaquetas
Crotacétina	<i>Crotalus durissus cascavella</i>	Desconocido	+	Agonista de plaquetas
BML1 et BML2	<i>Bungarus muticinetus</i>	Desconocido	+	Pro-aglutinante
Rhodaggretina	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	Desconocido	-	Agonista de plaquetas
CRL	<i>Crotalus atrox</i>	Galactosa	+	-
TSL	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	Galactosa	+	-
LsL	<i>Lachesis muta stenophrys</i>	Galactosa	+	Pro-aglutinante
RSL	<i>Crotalus atrox</i>	Galactosa	+	Pro-aglutinante
CAL	<i>Crotalus atrox</i>	Galactosa	+	-
APL	<i>Agkistrodon piscivorus</i>	Galactosa		Pro-aglutinante
BAL	<i>Bitis arietans</i>	Galactosa	+	
BjcuL	<i>Bothrops jararacussu</i>	Galactosa	+	Pro-aglutinante

Tabla 1.4. Efectos de diversas lectinas de tipo C purificadas de venenos de serpientes, en varias líneas tumorales.

BJcuL, una proteína purificada a partir del veneno de serpiente *Bothrops jararacussu* se ha descrito por su efecto antiangiogénico y antitumoral (De Carvalho *et al.*, 2001). Esta proteína

homodimérica inhibe la proliferación de varias líneas celulares tumorales procedentes de cánceres de riñón, páncreas, próstata y melanoma, pero no tiene ningún efecto sobre las células de cáncer de colon y mama (Pereira-Bittencourt et al., 1999). Del mismo modo, la Rhodocetina y la Vixapatina, dos lectinas de tipo C derivadas de *Calloselasma rhodostoma* y *Vipera Xantina Palestinae*, respectivamente, ejercen efectos antitumorales a través de la integrina $\alpha 2\beta 1$. La rhodocetina fue capaz de inhibir el crecimiento tumoral y las metástasis hepáticas (Rosenow et al., 2008) y la Vixapatina (VP12) bloqueó la adhesión y la migración de líneas celulares de melanoma *in vitro* (Staniszewka et al., 2009). Del mismo modo, VP12 fue capaz de bloquear la proliferación de células endoteliales humanas de la dermis y de inhibir la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* (Momic et al., 2011).

Nunes et al (2012) demostraron que la actividad citotóxica de la proteína BIL, una lectina de unión c-galactósido aislada del veneno de *Bothrops Jararacussu*, estaba asociada con la inducción de la apoptosis en las células tumorales K562. La actividad antitumoral de esta proteína se verificó mediante el análisis de externalización de la fosfatidilserina y la determinación del potencial de la membrana mitocondrial (Nunes et al., 2012). De forma similar, BJcuL, una lectina purificada a partir del mismo veneno (*Bothrops jararacussu*) indujo la muerte celular programada en células de carcinoma gástrico bloqueando la adhesión celular e induciendo la alteración en el ensamblaje del filamento de actina a nivel del citoesqueleto (Nolte et al., 2012).

En 2014, otro estudio demostró la actividad antitumoral de la Lebecina, una lectina de tipo C aislada del veneno de *Macrovipera lebetina*, en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 (Jebali et al., 2014). Recientemente, Montassar et al. (2017) han demostrado que la lebecetina, una lectina de tipo C, purificada a partir del mismo veneno era capaz de inhibir las coroides y la neovascularización de la retina *in vivo* (Montassar et al., 2017).

Del mismo modo, Pathan y sus colaboradores identificaron una lectina de tipo C en el veneno de la víbora de *Russell*, el Daboialectin que induce daño del citoesqueleto y la apoptosis de las células de cáncer de pulmón *in vitro* (Pathan et al., 2017).

En este contexto, la identificación de biomoléculas activas a partir de Macrovipera lebetina como la lebeina y la macrovipecetina y nuevos efectores celulares susceptibles de actuar como fármacos contra los cánceres epiteliales podría ayudar a desarrollar nuevas terapias y combinaciones de fármacos para mejorar la eficiencia y la respuesta al tratamiento.

CHAPITRE 1



INTRODUCTION GÉNÉRALE

*Plus nous acquérons
des connaissances, les choses ne sont
pas plus compréhensibles, mais plus mystérieuses.*

Albert Schweitzer

1. INTRODUCTION

1.1. CANCER

1.1.1. CONCEPTS GENERAUX DU CANCER

Le mot cancer est utilisé pour décrire un complexe et un groupe hétérogène des états pathologiques dans lesquels les cellules prolifèrent de manière excessive et envahissent les tissus avoisinants. Le cancer est une maladie de caractère génétique qui se produit pour éliminer des restrictions limitant la division cellulaire dans les cellules et les tissus différenciés. Dans la plupart des cas, c'est une maladie acquise et souvent à caractère irréversible. Il existe de nombreuses études qui sont en corrélation avec le lien entre l'incidence des cancers et certains modes de vies, tels que ; les habitudes, les régimes alimentaires, les professions, la situation géographique, etc. Il a été constaté, par exemple, une relation importante entre les leucémies myéloïdes et les personnes exposées à de fortes doses de rayons X ; entre le cancer du poumon et le tabagisme ; entre les cancers de la peau et les pêcheurs ou les marins exposés au rayonnement ultraviolet solaire durant des périodes de temps prolongées, etc.

L'incidence du cancer augmente avec l'âge, ce qui indique qu'il existe un facteur cumulatif de causes responsables, et qu'un événement unique ne suffit pas pour déclencher immédiatement, un cancer. Au niveau cellulaire, comme conséquence d'une ou plusieurs modifications de l'ADN, il se produit une altération de caractère permanent affectant de manière irréversible l'organisme et empêchant la division cellulaire. Le cancer est la croissance incontrôlée d'un groupe de cellules au sein d'un tissu entraînant la production d'une masse de cellules différenciées, appelée tumeur. Cette tumeur sera désignée par bénigne lorsqu'elle est composée d'un ensemble de cellules non-invasives restant encapsulées dans l'emplacement où elles ont pris naissance. Inversement, si à la croissance et à la prolifération incontrôlée, se rajoute l'envahissement d'autres tissus produisant des métastases, cette tumeur aura un caractère malin. Les métastases sont donc des tumeurs secondaires provoquées suite à la propagation des cellules cancéreuses à partir d'une tumeur primaire. Elles peuvent être éloignées de la tumeur primaire en étant transportées dans la circulation sanguine.

1.1.2. CAUSES DU CANCER

Une tumeur maligne se caractérise par l'acquisition de plusieurs propriétés intrinsèques telles que, le maintien d'une signalisation pro-proliférative, l'échappement aux suppresseurs de

tumeurs et aux mécanismes d'immunosurveillance, la résistance à la mort cellulaire, l'immortalité réplivative, un métabolisme énergétique dérégulé, l'induction de l'angiogénèse et l'activation de l'invasion et la métastase. Ces propriétés favorisent la complexité de la maladie néoplasique (Hanahan et Weinberg, 2011). Cependant, le développement des tumeurs solides, n'est pas limité à ces anomalies. En effet, de très nombreuses études ont mis en exergue l'importance des interactions entre les cellules précancéreuses et cancéreuses avec leur microenvironnement au cours des différentes étapes de l'évolution de la pathologie

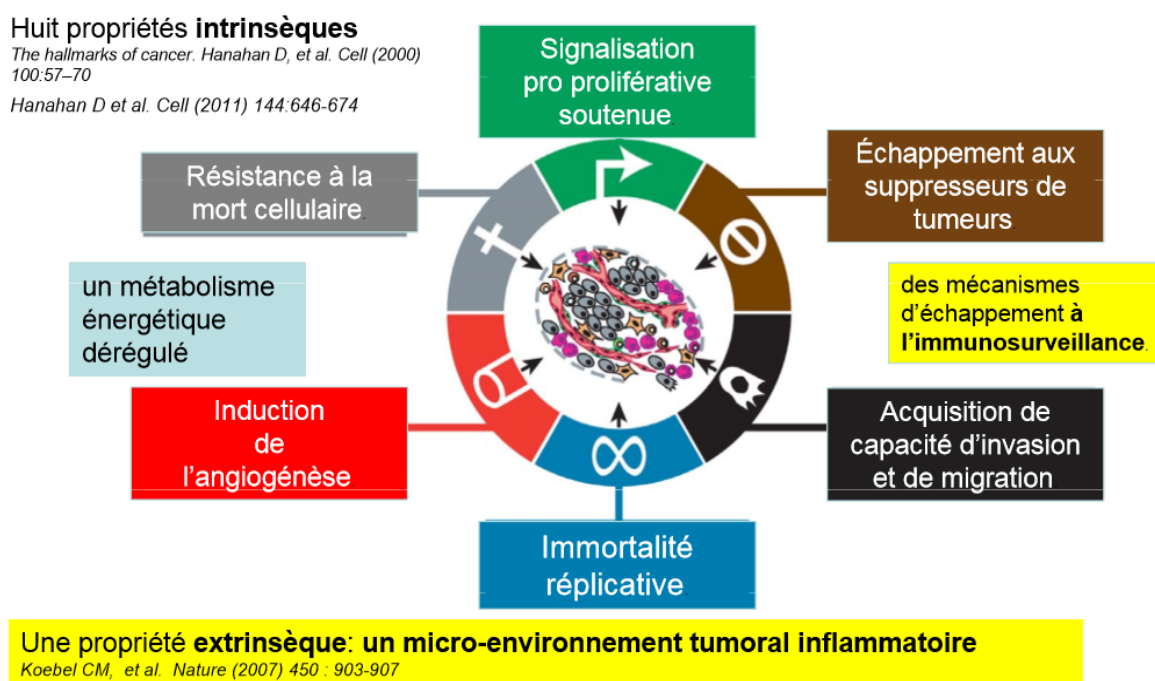


Figure 1.1. Caractéristiques des tumeurs solides.

Le cancer se caractérise par des propriétés intrinsèques (Hanahan et Weinberg, 2000 ; 2011) propres à la cellule cancéreuse et une propriété extrinsèque qui caractérise le microenvironnement tumoral (Koebel et al., 2007).

1.1.2.1. Autosuffisance des signaux de croissance

Les cellules normales nécessitent des signaux de croissance pour qu'elles puissent passer d'un état de repos à un état actif de prolifération. Ces signaux sont transmis dans la cellule par l'intermédiaire de récepteurs membranaires qui se lient à différents types de signaux tels que des facteurs de croissance et des composantes diffuses de la matrice extracellulaire... etc.

La plupart des oncogènes (gènes dont l'altération produit ou contribue au cancer) agissent en imitant les signaux de prolifération normale. La dépendance des signaux de croissance est évidente pour les cellules normales en culture qui ne sont capables de proliférer, que si elles sont activées par des facteurs mitogènes. Par contre, les cellules tumorales génèrent la plupart de leurs signaux de croissance afin de réduire leur dépendance à la stimulation par l'environnement tissulaire qui les entoure. Cette autonomie des signaux de croissance peut être réalisée de différentes manières, entre autres, en générant leurs propres facteurs de croissance tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance transformant α (TGF α), générés par les glioblastomes et sarcomes, respectivement (Fedi *et al.*, 1997).

1.1.2.2. Insensibilité aux signaux qui inhibent la croissance

Dans les cellules normales, il existe de multiples signaux prolifératifs qui maintiennent l'homéostasie tissulaire et l'état de latence des cellules. Ces signaux comprennent à la fois des inhibiteurs de croissance solubles et des inhibiteurs immobilisés présents dans la matrice extracellulaire ou sur la surface des cellules voisines. Ces signaux inhibiteurs de la croissance, sont reconnus par les récepteurs cellulaires transmembranaires couplés à des voies de signalisation intracellulaires. Ils bloquent la prolifération cellulaire de deux façons : 1/ en arrêtant les cellules dans la phase G0 du cycle cellulaire, ce qui peut les débloquent lorsque les signaux cellulaires le permettent ou 2/ en bloquant d'une manière permanente leur potentiel prolifératif en faisant entrer la cellule dans un état post-mitotique associé à l'acquisition d'une caractéristique de différenciation. Les cellules cancéreuses naissantes doivent échapper à ces signaux prolifératifs alors que les cellules normales réagissent à des signaux inhibiteurs de croissance contrôlés par les points de contrôle du cycle cellulaire (**Figure 1.2**).

Les cellules définissent leurs environnements au cours de cette période et en fonction des signaux reus, décident si oui ou non elles prolifrent, en entrant dans l'état post-mitotique ou de repos. Au niveau moléculaire, la majorité des signaux antiprolifératifs, passe travers la protéine du rétinoblastome (Rb) et la protéine p53.

Ainsi, dans son état hypo-phosphorylé, Rb bloque la prolifération cellulaire, en modifiant et séquestrant la fonction du facteur de transcription, E2F, qui son tour contrle l'expression d'un certain nombre de gnes essentiels pour la progression de la phase G1 la phase S du cycle cellulaire (Weinberg, 1995). Dans certaines tumeurs induites par des virus, en particulier

dans le cas des carcinomes cervicaux, la fonction Rb est éliminée par des onco-protéines virales comme l'onco-protéine E7 du papillomavirus humain (Dyson *et al.*, 1989).

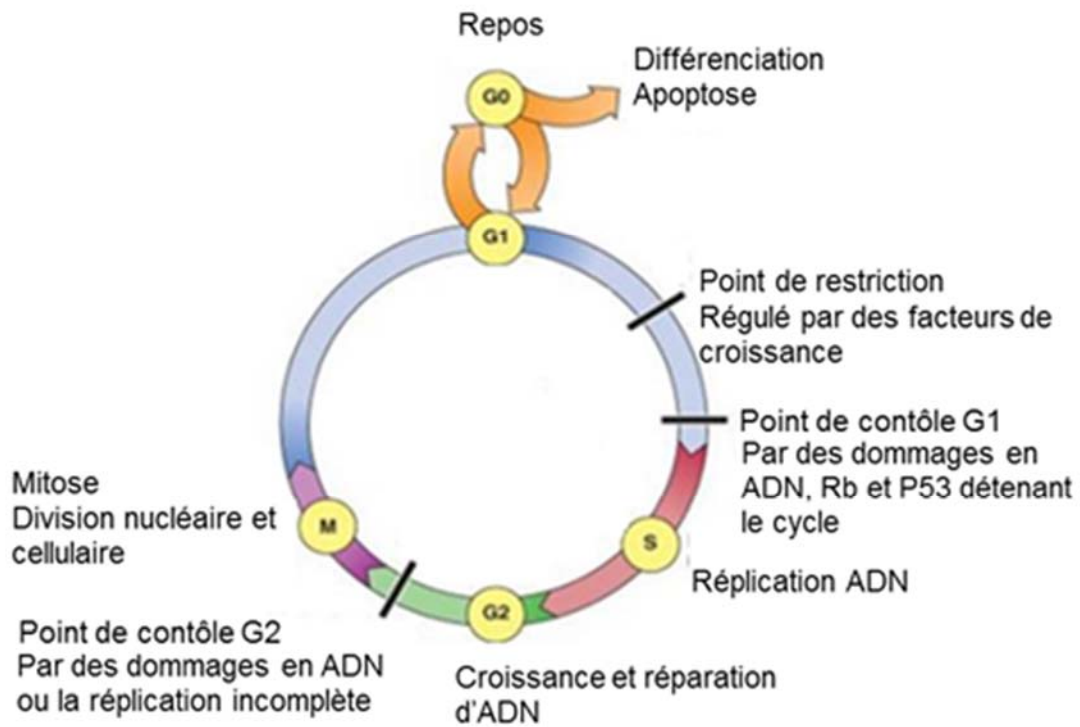


Figure 1.2. Schéma du cycle cellulaire.

Les différentes phases du cycle cellulaire, G0, G1, S, G2 et M et les principaux points de contrôle responsables de l'échappement des cellules tumorales

1.1.2.3. Résistance à la mort programmée

La capacité des cellules tumorales de croître est déterminée, non seulement par leur vitesse de prolifération mais aussi pour leur résistance à la mort programmée. La mort cellulaire programmée ou apoptose est le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. Plusieurs études de tumeurs chez des souris et des cellules en culture ont montré un phénomène de résistance de ces cellules à l'apoptose. Les observations durant ces dernières années, indiquent que l'apoptose est existante dans toutes les cellules humaines. Une fois lancée, suite à différents signaux physiologiques, les membranes cellulaires sont rompues, le squelette cytosolique et nucléaire se désorganisent, le cytosol est comprimé, les chromosomes se dégradent et le noyau se fragmente. Enfin, les

cellules se rompent au niveau des corpuscules qui sont engloutis par d'autres cellules du tissu, et enfin disparaissent.

La résistance à l'apoptose peut être acquise dans les cellules cancéreuses par des stratégies différentes. La plus connue est due à une mutation de p53, un régulateur pro-apoptotique ou gène suppresseur de tumeur. Il a été observé que l'inactivation fonctionnelle de cette protéine se produit dans plus de 50% des cancers humains et résulte de la répression d'un élément clé qui agit en tant que détecteur de lésions de l'ADN, ce qui induit la cascade apoptotique (Harris, 1996). Le gène p53, appelé « Clé du cycle cellulaire » est un gène suppresseur de tumeur le plus souvent modifié dans différents types de cancers humains. Alternativement, les tumeurs échappent à l'apoptose en augmentant l'expression des régulateurs anti-apoptotiques (Bcl-2) et diminution de l'expression de facteurs pro-apoptotiques (Bax, Bim, Puma) ou en bloquant la voie la mort extrinsèque (Hanahan et Weinberg, 2011).

1.1.2.4. Potentiel répliatif illimité

En principe, la prolifération incontrôlée pourrait être suffisante pour former une tumeur macroscopique. Toutefois, les recherches menées au cours des 30-40 dernières années montrent que la perte de la signalisation cellulaire, seule, ne garantit pas l'expansion de la croissance tumorale. La grande majorité des cellules de mammifères contiennent intrinsèquement un programme cellulaire autonome qui limite leurs multiplications. Des travaux sur des cellules en culture, ont montré que les cellules peuvent être divisées un certain nombre de fois et, une fois ce nombre est dépassé, elles arrêtent de croître. Ce processus est dit sénescence (Hayflick, 1997).

Cette sénescence peut être surmontée par l'inactivation de protéines suppressives de tumeurs Rb et p53 et les cellules peuvent continuer à se diviser en plusieurs générations supplémentaires jusqu'à ce qu'elles entrent dans une seconde phase caractérisée de mort massive des cellules, un trouble du caryotype, associé à la fusion des chromosomes et parfois la génération de cellules (1 chaque 10^7) qui ont acquis une capacité illimitée de multiplication définie par l'immortalité (Wright *et al.*, 1989). Ce mécanisme, de compte à rebours, de nombre des divisions a été étudié durant les 15 dernières années. Il consiste à ce que les télomères qui caractérisent l'extrémité des chromosomes et qui se composent de plusieurs milliers de répétitions de courtes séquences de six paires de bases, se rétrécissent à chaque nouvelle division en 50-100 paires de bases. Ce raccourcissement progressif est attribué à l'incapacité de l'ADN polymérase à répliquer totalement l'extrémité 3' de l'ADN chromosomique au cours

de la phase S du cycle cellulaire. Le raccourcissement progressif des télomères, après plusieurs cycles de réplication, cause la perte de la capacité de protéger les extrémités des chromosomes impliquées dans la fusion de ces télomères au cours de la phase de crise, entraînant ainsi la mort des cellules affectées. La plupart du temps, le maintien est requis par la surexpression de l'enzyme télomérase en ajoutant des répétitions hexanucléotide à l'extrémité de l'ADN télomérique (Bryan et Cech, 1999). De ce fait, les télomères maintiennent une longueur supérieure à leurs seuils critiques, permettant la multiplication illimitée à leurs cellules filles (**Figure 1.3**).

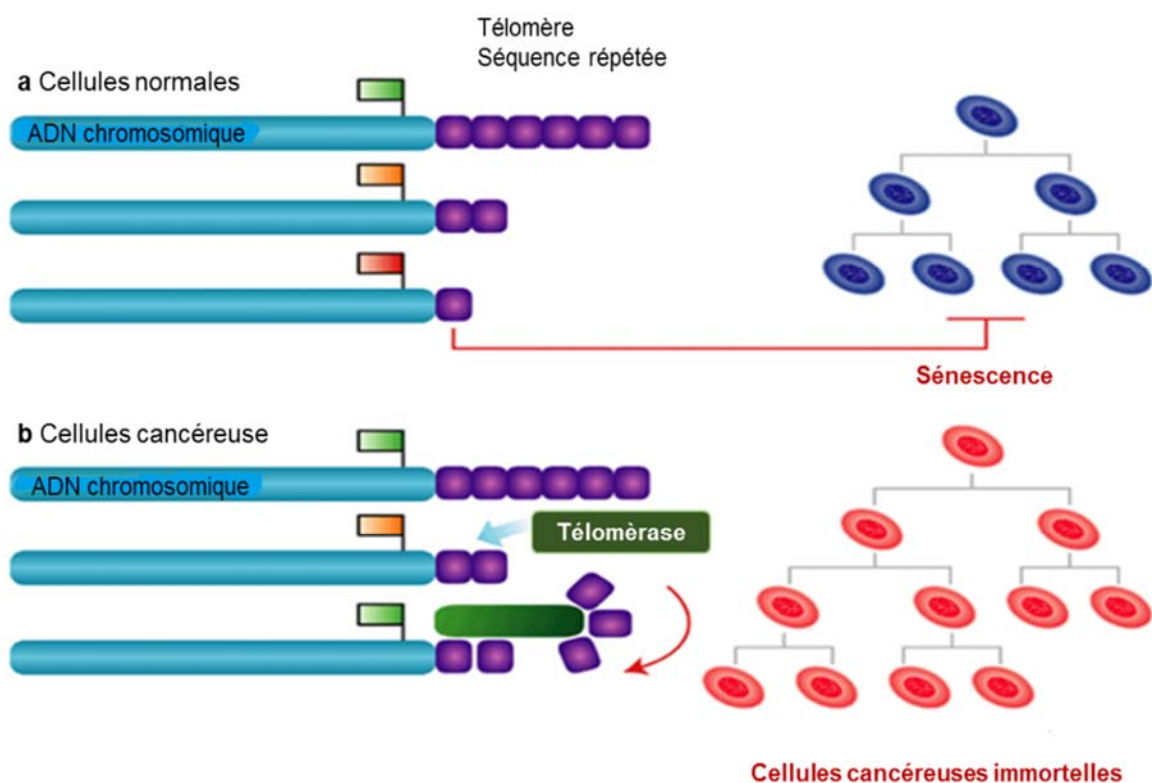


Figure 1.3. La régulation de la longueur du télomère.

(La régulation de la longueur du télomère dans les cellules normales et cancéreuses par l'enzyme télomérase).

1.1.2.5. Angiogenèse

L'oxygène et les nutriments apportés par la vascularisation sont cruciaux pour la fonction et la survie cellulaire, de sorte que toutes les cellules d'un tissu doivent résider à 100 µm du capillaire sanguin. Au cours de l'organogenèse, cette proximité est assurée grâce à la croissance coordonnée des vaisseaux sanguins et le parenchyme. Une fois que le tissu est

formé, la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogense) est transitoire et soigneusement réglementée. En raison de cette dépendance l'égard de la proximité de vaisseaux sanguins ; les cellules prolifèrent dans les tissus en ayant la capacité de stimuler la croissance des vaisseaux sanguins. Dans le but de progresser vers une plus grande taille, les néoplasies doivent développer l'angiogense (Bouck *et al.*, 1996 ; Folkman, 1997 ; Hanahan et Folkman, 1996). L'équilibre entre les signaux positifs et négatifs, fait de sorte que l'angiogense se développe ou se bloque. Deux exemples de facteurs de croissance qui initient l'angiogense sont le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et le facteur de croissance des fibroblastes (FGF). La thrombospondine 1 (TSP-1) est parmi les facteurs inhibiteurs de l'angiogense. La signalisation impliquant les intégrines contribue également cet équilibre de régulation de l'angiogense. De nombreuses tumeurs présentent une expression accrue de VEGF et/ou du FGF, en comparaison aux tissus normaux. Dans d'autres tissus, l'expression des inhibiteurs endogènes est diminuée (Singh *et al.*, 1995 ; Volpert *et al.*, 1997). Le rôle essentiel de l'angiogense est également étayé par des expériences montrant que le traitement avec des composés anti-angiogéniques génèrent une réduction de la croissance tumorale chez les souris inoculées par voie sous-cutanée (Folkman, 1997).

1.1.2.6. Invasion et métastases

Il arrive un moment au cours du développement de la plupart des cancers humains que la masse de la tumeur primaire favorise les cellules pionnières à se mobiliser. Elles envahissent les tissus avoisinants et se rendent dans des sites éloignés formant de nouvelles colonies. Ces nouvelles colonies lointaines de cellules tumorales (métastases) sont la cause de 90% de tous les décès par cancer (Sporn, 1996). La capacité d'invasion et de métastases permettent aux cellules d'échapper à la masse de la tumeur primaire, colonisant de nouvelles parties du corps, où l'espace et les nutriments ne sont pas un problème limitant. Plusieurs protéines responsables du maintien des cellules au sein d'un tissu sont dérégulées ce qui donne à ces cellules la capacité d'envahir ou de métastaser. Ces protéines comprennent des molécules d'adhésion cellule-cellule (CAMs) et les intégrines qui lient les cellules à la matrice extracellulaire. L'E-cadhérine, molécule d'interaction cellule-cellule exprimée dans les cellules épithéliales est un bon exemple puisque sa fonction est altérée dans la plupart des cancers épithéliaux à cause de mutations, de répression de la transcription et/ou la protéolyse du domaine extracellulaire (Christofori et Semb 1999).

1.1.3. CANCER DE LA PEAU

1.1.3.1. Mélanome

Le cancer de la peau se produit lorsque les cellules de la couche la plus externe de la peau appelée l'épiderme affichent une croissance incontrôlée. L'épiderme est formé de trois couches : la couche supérieure, la couche épidermoïde intermédiaire et la couche la plus profonde où se trouvent les mélanocytes et les cellules basales. Les différents types de cancer de la peau affectent plusieurs types de cellules de l'épiderme. Le principal facteur de risque du cancer de la peau est la lumière ultraviolette (UV). L'exposition aux rayons UV dépend de plusieurs facteurs tels que l'intensité, la durée d'exposition et si la peau a été protégée avec des vêtements ou un écran solaire ou non.

De nombreuses études montrent l'existence d'un effet mémoire de la peau aux radiations solaires puisque les coups de soleil reçus à un âge précoce augmentent le risque de développer un cancer de la peau des décennies plus tard. L'autre facteur de risque principal est la coloration claire de la peau. Le cancer de la peau, par exemple, est beaucoup plus fréquent chez les Caucasiens que chez les Afro-Américains et ceci est dû au pigment de mélanine qui protège contre les rayons UV, qui est plus abondant chez les personnes qui ont la peau foncée. Les individus à peau claire, qui sont plus sensibles aux coups de soleil, courent un risque accru de développer un cancer de la peau, mais il faut noter aussi que les gens de toutes races et couleurs de peau peuvent développer ce cancer. Les autres causes de cancer de la peau sont : des expositions prolongées à des produits chimiques tels que l'arsenic, le goudron et les lubrifiants, des radiations pour le traitement d'autres cancers, des antécédents familiaux de cancer de la peau, des cicatrices de brûlures ou des infections de la peau. Certains traitements du psoriasis, y compris les rayons UV, certaines maladies de la peau telles que xeroderma pigmentosum, la faiblesse du système immunitaire et l'infection par certains types de virus humains comme le papillomavirus peuvent être responsables d'un cancer de la peau. En général, les cancers de la peau peuvent être divisés en deux sous types : le type mélanome et le type non-mélanome selon le devenir des mélanocytes de la peau ou non.

1.1.3.1.1. Cancer de la peau de type non-mélanome

Il existe deux principaux types de cancer de la peau non mélanome selon les cellules à partir desquelles ils se développent :

Cancer de la peau des cellules basales ou carcinome basocellulaire : Il dérive de cellules basales de la couche la plus interne de l'épiderme.

Il s'agit de la néoplasie la plus fréquente chez l'homme et aussi le type le plus courant (75%) de cancers de la peau. Il est très rare qu'il se propage vers d'autres parties du corps, mais le plus souvent il se développe dans plus d'un foyer simultanément. Bien qu'il soit associé à un excès de rayonnement UV, il peut avoir une origine multifactorielle.

Cancer de la peau des cellules squameuses, squamocellulaire ou épidermoïde : *Il représente 20% des cancers de la peau diagnostiqués et le deuxième des cancers de la peau en fréquence. Son origine cellulaire, c'est les kératinocytes épidermiques qui subissent une transformation maligne due à des mutations induites par le rayonnement UV. Il est très fréquent chez les personnes à peau claire et se guérit dans 95% de cas. Parfois, il peut se propager vers les ganglions lymphatiques et d'autres organes causant ainsi des cancers secondaires.*

D'autres types moins fréquents : *Ils représentent moins de 1% des cancers diagnostiqués de la peau et comprennent le carcinome de Merkel ou neuroendocrine, le sarcome de Kaposi et le lymphome des cellules T de la peau.*

1.1.3.1.2. Cancer de la peau de type mélanome

Le mélanome se développe par la croissance incontrôlée des mélanocytes de la peau. Il existe également différents types :

- 1- Mélanome d'extension superficielle :** Il est le type le plus commun des mélanomes (70%). En principe, les mélanocytes se prolongent plus superficiellement en profondeur, connue cliniquement comme phase de croissance radiale. Ils sont des nevus ou des tâches qui se développent sans pénétrer dans les couches profondes de la peau.
- 2- Mélanome nodulaire :** Il tend à se développer très rapidement et apparaît souvent dans des zones fréquemment exposées au soleil comme le torse ou le dos. Ce sont des tâches brunes foncées ou noires qui poussent vers l'intérieur, pénétrant les couches internes de la peau et ne se développent pas à partir de grains de beauté préexistants.
- 3- Mélanome malin *in situ* ou Lentigine :** Il représente 10% des mélanomes. Il est le plus fréquent chez les personnes âgées. Il apparaît sur les zones de peau qui ont été exposées au soleil pendant une longue période de sorte qu'il est très fréquent sur le

visage et chez les personnes qui passent du temps à l'extérieur. Ce type de mélanome se développe très lentement en s'étendant sur plusieurs années.

4- Mélanome Acral-lentigineux : Ce type est souvent localisé sur la paume des mains, la plante des pieds ou même sous les ongles. Il est très commun chez les personnes à peau foncée.

5- D'autres types de mélanome : le mélanome peut se produire n'importe où sur le corps, y compris les organes internes de sorte qu'il est souvent appelé mélanome malin. La zone où se produit le mélanome, bien que rarement, est à l'intérieur de l'œil en raison des altérations au niveau des mélanocytes de l'iris formant des tâches sombres dans la partie colorée de l'œil. Il est également rare, bien que possible, l'apparition de mélanomes dans la vulve, le vagin et le rectum.

1.1.3.2. Evolution du mélanome

Les mélanocytes sont des cellules spécialisées identifiées principalement dans la peau et les yeux, où se produit le pigment responsable de la couleur de la peau et les cheveux, la mélanine. Les mélanocytes de la peau proviennent des progéniteurs de la crête neurale qui migrent vers la peau au cours du développement embryonnaire.

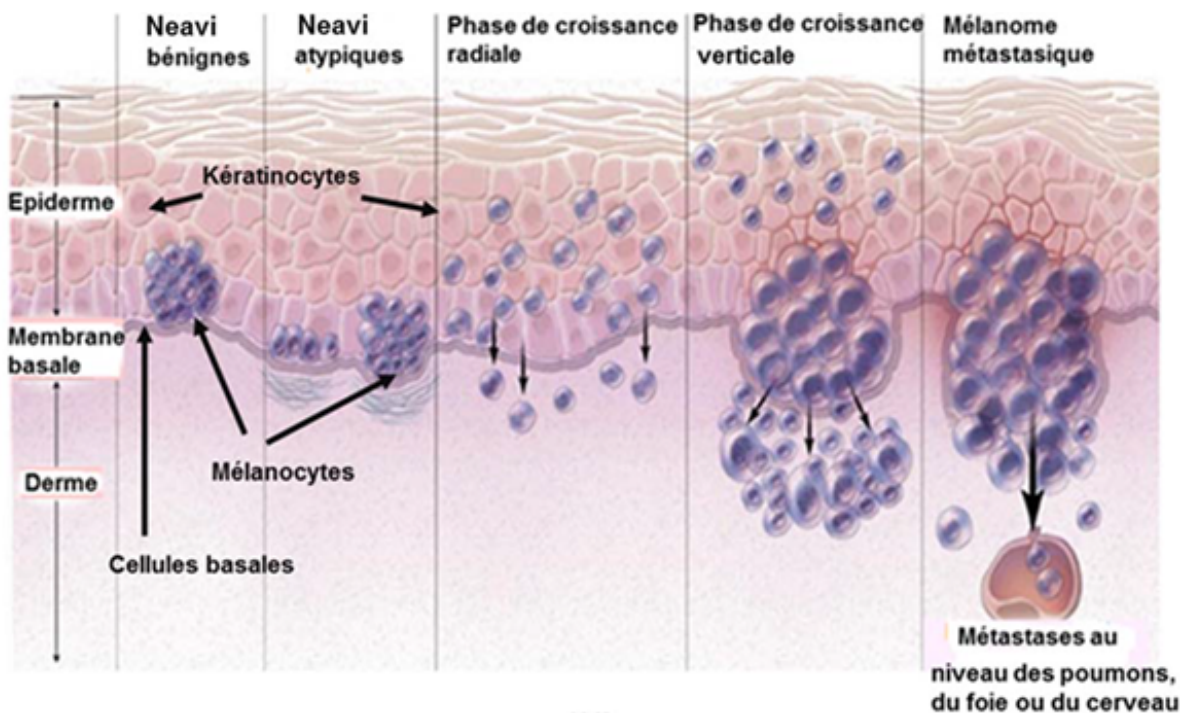


Figure 1.4. Etapes de l'évolution du mélanome cutané malin.

Dans la peau, les mélanocytes demeurent dans la couche basale de l'épiderme et dans les follicules pileux. Leur équilibre est réglementé par les kératinocytes épidermiques (Slominski *et al.*, 2004). En réponse au rayonnement UV, les kératinocytes sécrètent des facteurs qui régulent la survie, la différenciation, la mobilité et la prolifération des mélanocytes, ce qui stimule la production de la mélanine. Ainsi, les mélanocytes jouent un rôle essentiel dans la protection de la peau contre les effets nocifs des rayonnements UV et à la prévention du cancer de la peau. Les mutations des gènes régulateurs de la prolifération, la production des facteurs de croissance autocrine et la perte des récepteurs d'adhérence permettent aux mélanocytes de s'échapper à la régulation stricte des kératinocytes (Haass *et al.*, 2004). En conséquence, les mélanocytes peuvent proliférer et se propager formant des naevi (**Figure 1.4**). La prolifération des mélanocytes peut être limitée à l'épiderme, le derme ou le chevauchement entre les deux (naevus composé). Les naevi sont généralement bénins, mais ils peuvent progresser à la phase de croissance radiale (RGP) représentée par une lésion intra-épidermique qui peut envahir le derme localement. Les mélanocytes, peuvent passer à une phase plus dangereuse de croissance verticale (VGP), dans laquelle les cellules ont un potentiel métastatique avec l'apparition de nodules cellulaires envahissant le derme. Par la suite, à la phase de mélanome métastatique, les cellules peuvent infiltrer les systèmes vasculaires et lymphatiques pour coloniser d'autres organes (**Figure 1.4**). D'une manière générale, cette succession d'évènements ne caractérise pas tous les mélanomes. Les phases VGP ou RGP peuvent se développer directement à partir de mélanocytes isolés ou à partir des naevi et les deux peuvent évoluer en un mélanome malin métastatique.

1.1.3.3. Épidémiologie du mélanome

Le mélanome est une tumeur qui présente des indices épidémiologiques différents des autres tumeurs. Aux Etats-Unis, entre 1999-2014, il a été observé une augmentation notable du taux d'incidence du mélanome chez les populations blanches (CDC, 2017). Avec cette augmentation, on estime que tous les 10 ou 20 ans, l'incidence double d'où sa considération comme l'un des cancers les plus malins dans ces dernières années. De même, il est l'un des dix tumeurs malignes les plus courantes dans le monde occidental, mais il est rare dans la plupart des pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Sud. Les taux d'incidence les plus élevés caractérisent l'Australie et la Nouvelle-Zélande (Parkin *et al.*, 1997), suivie par l'Amérique du Nord et l'Europe du Nord, probablement en raison du phototype plus faible de la population de l'Europe du nord et de l'exposition intense au soleil pendant les périodes de vacances (Rodenas *et al.*, 1996).

En Europe, environ 60 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année, ce qui représente 1% de tous les cancers. Les taux d'incidence sont légèrement plus élevés chez les femmes que chez les hommes et sont encore plus élevés dans le Nord que dans le Sud de l'Europe (Boyle et Smans, 2003 ; Ferlay et al., 2001). En Europe, figure un gradient nord-sud, de sorte que les taux d'incidence les plus élevés correspondent aux pays nordiques. En revanche, les pays méditerranéens ont les taux les plus bas, dont l'Espagne (Garbe et Blue, 2001), bien que dans ces pays il y a eu une augmentation significative du nombre de mélanomes ces dernières années

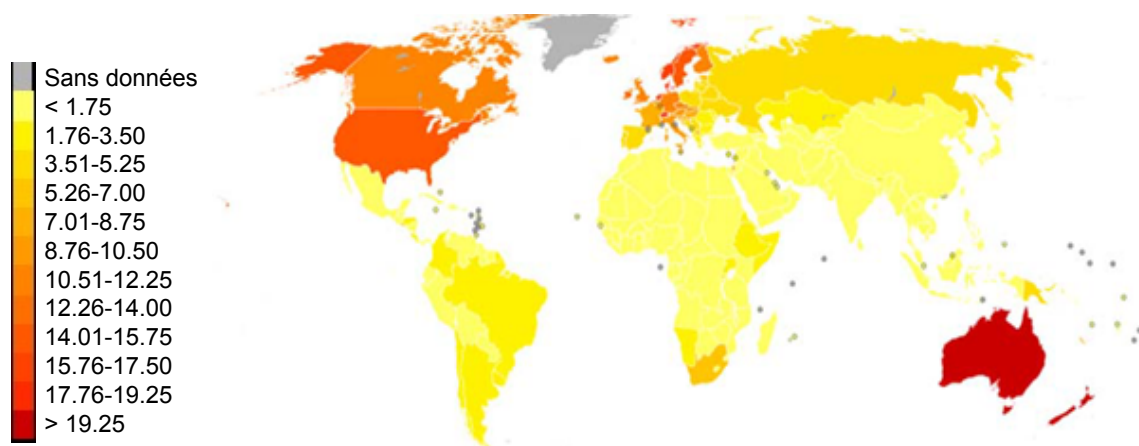


Figure 1.5. Les données épidémiologiques sur l'incidence du mélanome.

Incidence du mélanome en 2008 exprimé pour 100.000 habitants pour les hommes et les femmes dans différentes parties du monde

En Espagne, le mélanome n'est pas très répandu comme dans d'autres pays développés. Il représente 1,3 et 2,5% des tumeurs malignes chez les hommes et les femmes (Saenz *et al.*, 2005). Les taux d'incidence les plus élevés des registres du cancer du mélanome en Espagne sont ceux de Tarragone et Gérone chez les deux sexes, tandis que les plus bas correspondent aux îles Canaries chez les hommes et de Zaragosse chez les femmes. Ces taux placent l'Espagne en bas de l'échelle par rapport à la plupart des pays européens. Une augmentation significative de l'incidence observée a attiré l'attention ces dernières années, ce qui signifie que dans 20 ans, le taux d'incidence du mélanome en Espagne augmentera de plus de 10 fois.

En Tunisie, l'incidence du mélanome cutané (MC) est estimée à 0,5/100 000 habitants et par an, faisant placer le pays parmi ceux dits à faible incidence. Dans une étude publiée par Damak *et al.*, en 2014, le MC ne représentait que 1% des tumeurs malignes et 6% des cancers cutanés (Damak *et al.*, 2014). Cette maladie est de plus en plus répandue en Tunisie et 10% de mélanomes surviennent dans un contexte familial défini par la survenue d'au moins 2 mélanomes ou 3 sur une génération. En Tunisie, les cancers cutanés sont en forte évolution à cause d'une peau claire chez une tranche de la population, la pollution et l'appauvrissement de la couche d'ozone qui rendent le soleil encore plus nocif.

1.1.3.4. Étiologie du mélanome

Plusieurs facteurs génétiques, familiaux et environnementaux sont associés au développement du mélanome. Les facteurs familiaux et génétiques sont liés au type de peau, le nombre de naevi mélanocytaires, la présence de naevi atypiques et aux antécédents familiaux du cancer cutané. L'exposition aux rayons UV et la réduction de la couche d'ozone sont parmi les facteurs environnementaux et familiaux associés au mélanome. Le rayonnement solaire est le facteur étiopathogénique le plus important dans le développement du mélanome malin.

Les facteurs de risque les plus importants sont la présence d'antécédents familiaux de mélanome et d'un grand nombre de naevi. L'existence de cas de mélanome familial représente un facteur de risque du développement du mélanome. Il existe un pourcentage de cas chez lesquels le mélanome est héréditaire et qui est lié à des mutations au niveau de certains gènes codant pour des protéines de contrôle du cycle cellulaire telles que CDKN2A et CDK4. L'existence préalable d'un mélanome est un autre facteur de risque très important. Le risque de développer un deuxième mélanome est 70 fois supérieur à celui de l'élaboration d'un premier mélanome. L'existence de naevi mélanocytaires congénitaux ou plusieurs naevi représentent également un facteur de risque majeur pour le développement du mélanome malin. Les personnes ayant plus de 50 naevi mélanocytaires communs ont un facteur de risque 3 fois plus élevé que la population normale et les gens avec plus de 100 naevi ont 7,6 fois le risque de développer un mélanome. Les naevi mélanocytaires congénitaux géants présentent un risque de transformation maligne de 6% à 8% et se développent habituellement à un mélanome avant l'âge de 10 ans du patient. Les petits naevi mélanocytaires congénitaux ne semblent présenter aucun risque considérable, mais l'existence de naevi mélanocytaires atypiques est un marqueur de risque de développer un mélanome.

Les personnes de phototype clair sont prédisposées à avoir des brûlures solaires sans développer de pigmentation. Cette photosensibilité est associée à un polymorphisme du récepteur de la mélanocortine 1 (MCR1). Il est aussi observé chez les personnes à peau claire ou aux cheveux roux, à présence de l'eumélanine (pigment brun) ou le pheomelanin (rouge ou pigment jaune) déterminée par la présence de variants du gène codant pour le récepteur de la mélanocortine dans les mélanocytes. Le pheomelanin peut avoir un effet amplificateur des dommages mutagènes contre le rayonnement UV, contribuant ainsi à un risque accru de cancer de peau chez les individus roux.

D'autres facteurs de risque identifiés comprennent les agents chimiques, physiques et immunologiques. Le développement du mélanome est plus fréquent et plus agressif chez les patients immunodéprimés. La cause de l'immunosuppression est variable et peut inclure des immunodéficiences primaires, les lymphomes, les immunosuppresseurs ou l'infection par le virus de l'immunodéficiência humaine. La base génétique du mélanome est :

a. Héritaire : des défauts dans les gènes *CDKN2A* et *CDK4*

Les mélanomes héréditaires ne représentent que 5-10% de tous les cas. Le premier gène associé à cette maladie a été identifié dans les études génétiques des familles avec une prédisposition à développer un mélanome malin cutané (Hayward, 2003). Dans ce même travail, des aberrations cytogénétiques et des suppressions de marqueurs d'ADN au niveau du bras court du chromosome 9 ont été identifiées dans les lignées cellulaires primaires et les mélanomes malins cutanés. Dans une autre étude, le gène suppresseur de tumeur de mélanome a été localisé dans la région chromosomique 9p21 (Fontaine *et al.*, 1992).

Des études chez de nombreuses familles avec une forte incidence de mélanome ont identifié l'existence de mutations dans le gène *CDKN2A* (*p16^{INK4A}*) (Kamb *et al.*, 1994 ; Potrony *et al.*, 2015). Ce gène code pour une protéine *p16^{INK4A}*, qui joue un rôle très important dans la progression du cycle cellulaire (**Figure 1.6**). Pour inhiber la progression du cycle cellulaire, la protéine de *p16^{INK4A}* se lie à la kinase *CDK4* en l'inactivant de sorte que la phosphorylation normale de la protéine Rb soit altérée. Lorsque cette dernière est hypo-phosphorylée, les facteurs de transcription E2F ne peuvent pas être libérés d'où un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G1. Ainsi, si la fonction de *p16^{INK4A}* est perdue par mutation et / ou par délétion de *CDKN2A*, un inhibiteur important de la progression du cycle cellulaire et un suppresseur du développement tumoral est inhibé. Dans certains cas moins importants, des mutations se produisent dans le gène *CDK4* de sorte que la liaison avec *p16^{INK4A}* ne se produise pas. Le

résultat final est le même, du fait que l'interaction entre ces deux protéines intervient dans la pathogenèse du mélanome malin cutané.

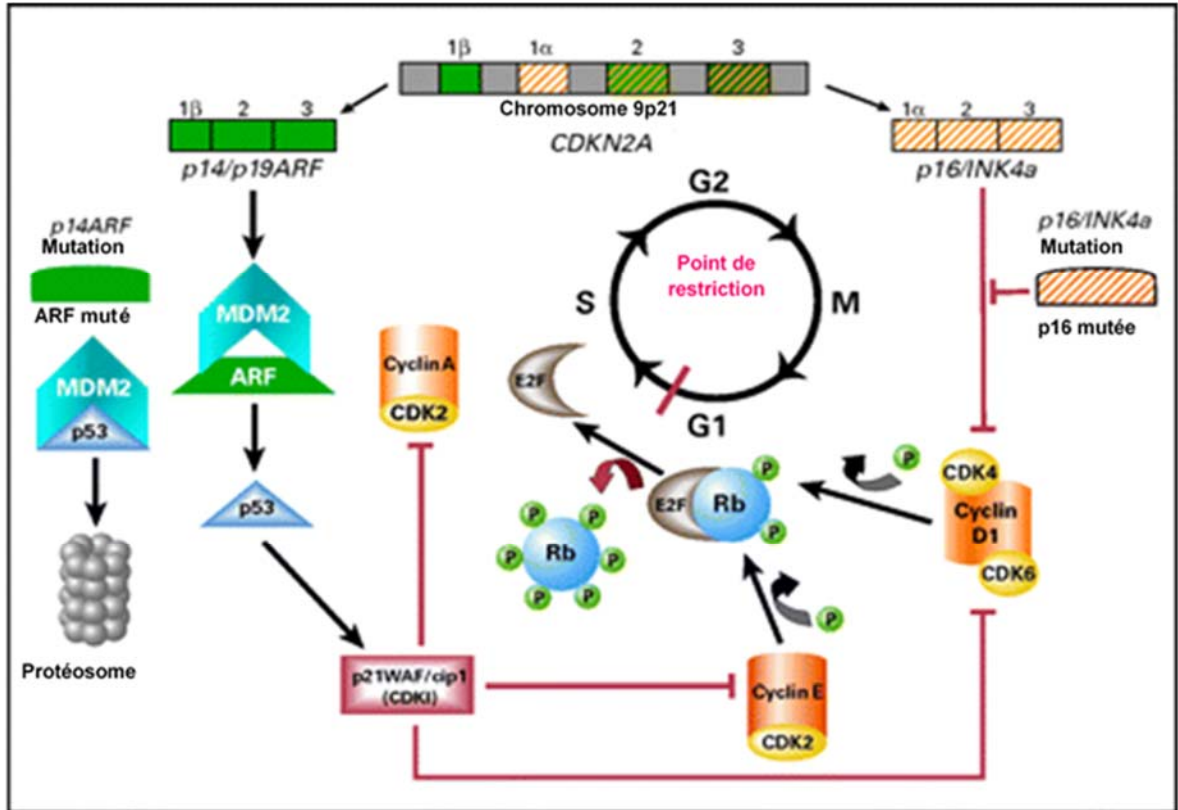


Figure 1.6. Le codage génomique et le mécanisme d'action des gènes suppresseurs de tumeurs p16INK4a et p14ARF.
Le gène CDKN2A code pour 2 suppresseurs p16INK4a et p14ARF à travers des cadres de lecture alternatifs.

Dans la même région du chromosome 9, un autre gène, augmentant la susceptibilité au mélanome a été découvert. Ce gène codant pour $p14^{ARF}$ est muté dans de nombreux cas de mélanome malin. $P14^{ARF}$ comme $p16^{INK4A}$ dérivent du même locus, CDKN2A mais, ce sont des protéines distinctes sans homologie dans les séquences d'acides aminés et sont générés en raison de l'existence de différents promoteurs utilisant différents cadres de lecture pour la traduction. De plus, la manière avec laquelle elles influencent la progression du cycle cellulaire est également différente. Pendant que $p16^{INK4A}$ inhibe la phosphorylation de Rb médié par CDK4, en bloquant le cycle cellulaire en phase G1, $p14^{ARF}$ stimule la stabilisation de la protéine p53. L'inactivation de CDKN2A, que ce soit par délétion, mutation ou inhibition de la transcription par méthylation du promoteur, a été observé dans pratiquement toutes les lignées

cellulaires de mélanome (Castille *et al.*, 1997). De même, des mutations au niveau du gène CDK4 ont été identifiées dans plusieurs cas atteints d'un mélanome malin cutané sporadique, bien que leur fréquence est beaucoup plus faible dans le cas du mélanome familial (Guldberg *et al.*, 1997 ; Wölfel *et al.*, 1995).

b. Autres loci génétiques dans le mélanome malin cutané

En plus des gènes CDKN2A et CDK4, il existe de nombreuses données indiquant l'existence d'autres gènes qui contribuent au développement du mélanome cutané malin sur le chromosome 9p (Holland *et al.*, 1994). Des études d'autres mélanomes familiaux ont révélé de nombreux autres loci, pouvant atteindre les gènes qui sont impliqués dans la formation du mélanome malin cutané. Ces loci ont pu être localisés sur les chromosomes 1p, 3p, 6q, 6p, 10p, 11q et 17p (Bastian *et al.*, 1998 ; Walker *et al.*, 1994).

c. Défauts au niveau de gène PTEN dans le mélanome malin cutané

Dans le mélanome cutané malin, il a été découvert des délétions fréquentes de marqueurs d'ADN sur le chromosome 10q et des défauts dans le gène PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), qui se trouve dans la région 10q23. Des délétions ou des mutations de PTEN, un gène suppresseur de tumeur, ont souvent été identifiées dans divers cancers. La protéine PTEN fonctionne de la même manière que *p16^{INK4A}*, de sorte que la perte de la fonction modifie la régulation du cycle cellulaire par des mécanismes liés à la voie Rb. Ainsi, il a été observé que 30 à 50% des lignées cellulaires de mélanome et d'environ 5 à 20% des mélanomes présentent des défauts au niveau du gène PTEN (Wu *et al.*, 2003c). Egalement, des études fonctionnelles ont montré que la prolifération des cellules de mélanome peut être inhibée par la restauration de ce gène (Robertson *et al.*, 1998). Ces résultats indiquent que les défauts dans le gène PTEN pourraient être impliqués dans la pathogenèse de certains mélanomes malins cutanés sporadiques.

d. Défauts au niveau des gènes RAS et RAF dans le mélanome malin cutané

Les gènes de la famille RAS (H-RAS, K-RAS et N-RAS) codent pour les GTPases liées à la membrane dont le fonctionnement est associé à des récepteurs cellulaires, tels que les récepteurs de tyrosine kinases, récepteurs couplés aux protéines G, et les récepteurs de l'adhésion cellulaire (intégrines) (**Figure 1.7**).

Les protéines RAS régulent la transmission des signaux à partir de la membrane cellulaire vers le noyau pour affecter l'expression des gènes et réguler la prolifération et la différenciation cellulaire (Shields *et al.*, 2000). Souvent, dans les cancers humains, les gènes RAS sont activés par des mutations et peuvent contribuer au développement des mélanomes malins cutanés (Herlyng et Satyamoorthy, 1996).

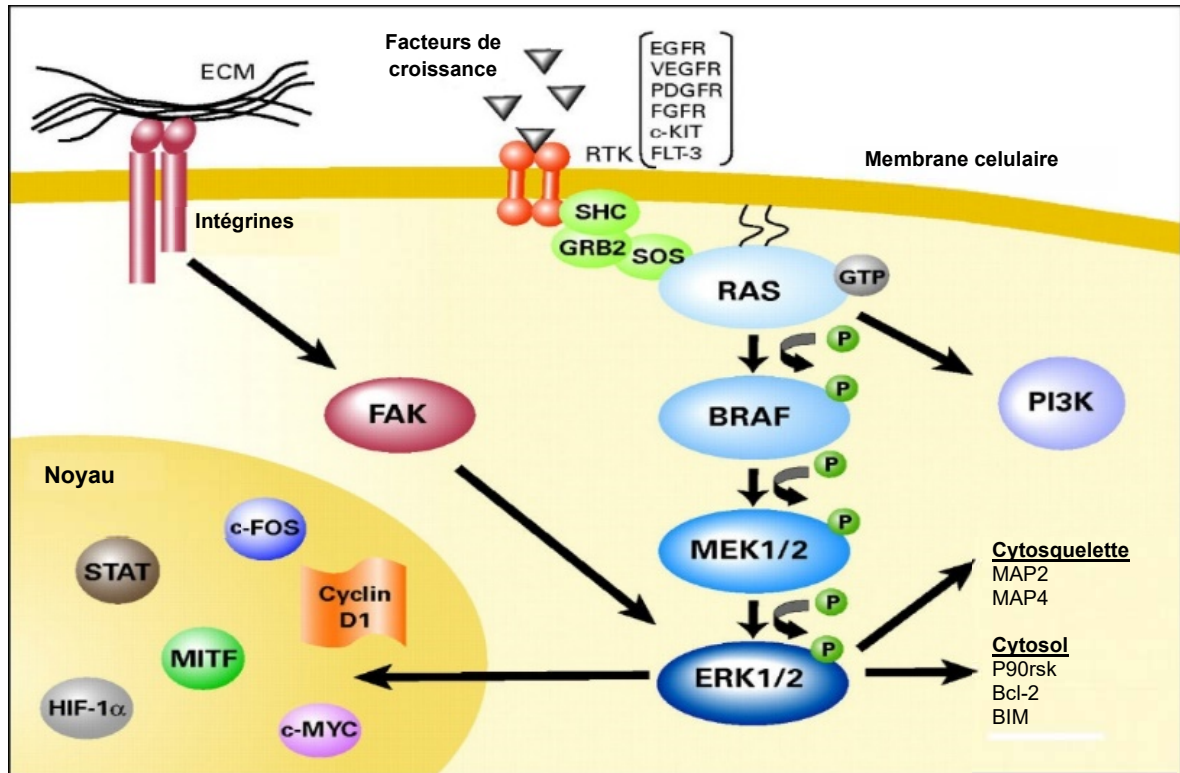


Figure 1.7. Les voies de signalisation RAS / RAF. Des mutations activatrices des gènes RAS et de la RAF évitant les points de contrôles normaux et activent constitutivement cette voie.

Des mutations activatrices du gène N-RAS ont été détectées dans 95% de mélanomes héréditaires chez des patients présentant des mutations CDKN2A (Eskandarpour *et al.*, 2003). En revanche, dans les mélanomes sporadiques et dans des lignées cellulaires, des mutations de RAS sont beaucoup moins fréquentes (de 4 à 31%). Dans le cas des mélanomes malins cutanés sporadiques, les mutations au niveau du gène BRAF sont les plus fréquentes (Davies *et al.*, 2002).

Ces altérations génétiques engendrent des protéines qui ont subi des modifications ou des dérégulations dans leurs modes d'action et sont impliquées dans différentes voies de signalisations. Dans le cas des mélanomes, la voie Wnt/ β -caténine, la voie TGF- β , la voie des

MAP Kinases, la voie PI3K/AKT, la voie de l'AMPC et MITF, la voie JAK/STAT3, la voie du facteur de transcription NF- κ B et la voie p53 sont fréquemment altérées.

1.1.3.5. Les voies de signalisations impliquées dans le mélanome

1.1.3.5.1. La voie Wnt/ β -caténine

La voie de signalisation Wnt fait intervenir les ligands de la famille Wnt, le récepteur Frizzled (FZD) couplé au co-récepteur LRP5/6 (low-density lipoprotein-related receptor protein) et de Dishevelled (Dsh), deux sérine/thréonine kinases (GSK-3 and CK1), deux protéines d'échafaudage (Axin et APC), β -caténine et ses partenaires TCF/LEF (Liu *et al.*, 2015).

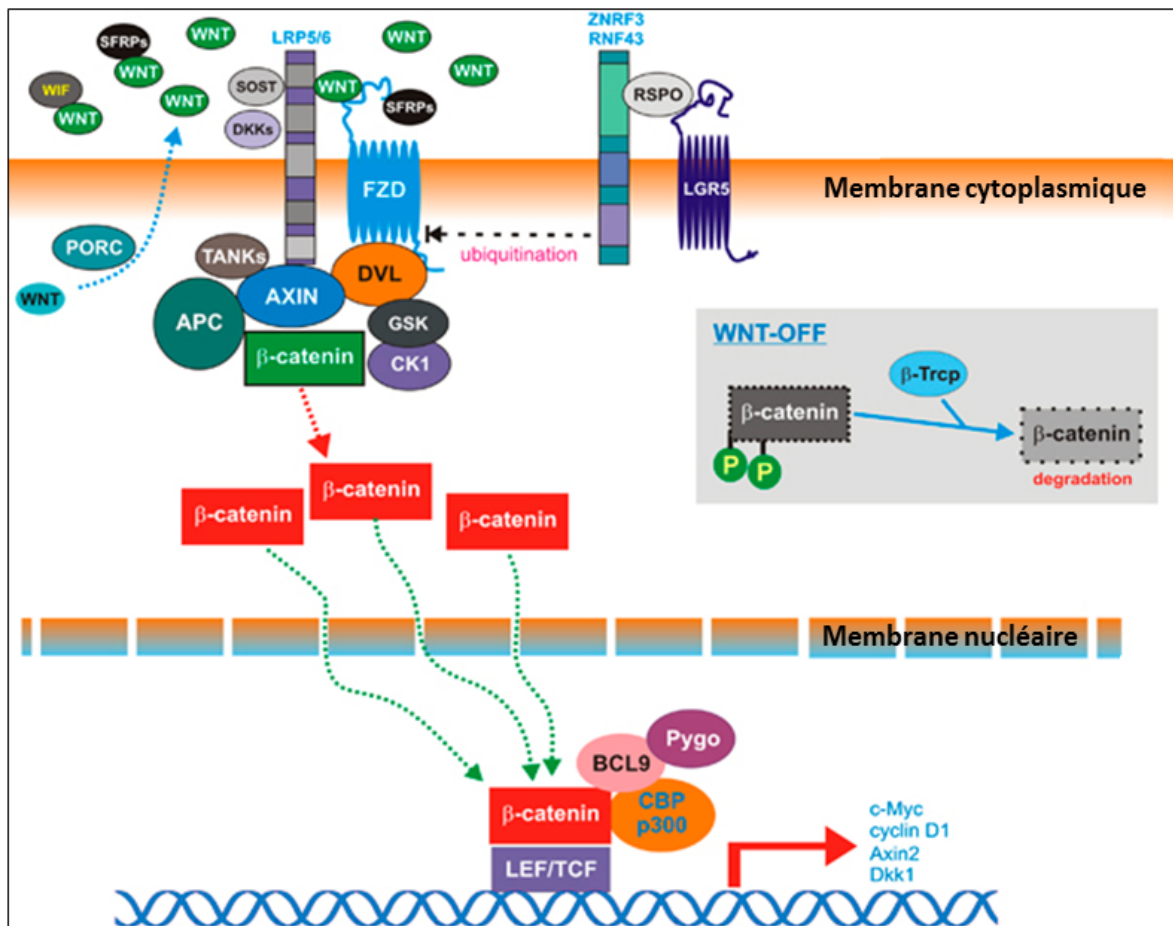


Figure 1.8. La voie Wnt/ β -caténine (Yang *et al.*, 2016). Les facteurs Wnt interagissent avec le récepteur FZD couplé au co-récepteur LRP5/6 favorisant le désassemblage du complexe de destruction (Axine, APC, DVL, GSK3, CK1), ce qui entraîne la libération de la β -caténine qui va être transloquée dans le noyau pour réguler l'expression des gènes cibles. En absence de Wnt, la β -caténine est associée à ce complexe de destruction qui conduit à sa dégradation.

En absence de ligand de Wnt, la formation du complexe axine (Axine, APC, DVL, GSK3, CK1) conduit à la dégradation de la β -caténine. Par contre, la présence de facteurs Wnt stimule le récepteur Frizzled couplé au co-récepteur LRP5/6 et Dsh. La phosphorylation de ces derniers recrute le complexe axine vers la membrane plasmique empêchant ainsi la dégradation de la β -caténine (**Figure 1.8**). Cette protéine s'accumule et permet donc, en association au TCF/LEF, l'émission du signal de prolifération (Song *et al.*, 2015).

La dérégulation ou les mutations de la voie WNT / β -caténine sont impliquées dans la formation et la progression tumorale de divers cancers (Kovaks *et al.*, 2016). Cependant, malgré le fait que mélanome ait été l'une des premières tumeurs associées à une dérégulation de la β -caténine (Rubinfeld *et al.*, 1997), son rôle dans cette maladie mortelle n'est toujours pas complètement élucidé. En effet, plusieurs études ont suggéré qu'une augmentation de la translocation nucléaire et de l'activité de la β -caténine favorisent la prolifération des mélanomes (Chien *et al.*, 2009), alors que d'autres ont conclu que des taux élevés de β -caténine nucléaire sont en corrélation avec un pronostic plus favorable et une maladie moins agressive (Bachmann *et al.*, 2005). La β -caténine est impliquée non seulement dans le contrôle de la transcription du gène de différenciation des mélanocytes, MITF (Schepsky *et al.*, 2006), mais aussi dans la modulation de sa fonction à travers la protéine E-cadhérine impliquée dans l'interaction directe protéine-protéine afin de favoriser la propagation métastatique du mélanome en augmentant la migration et / ou l'invasion cellulaire (Gallagher *et al.*, 2013).

1.1.3.5.2. La voie TGF- β dépendante des protéines Smads

La voie de signalisation TGF- β (Transforming growth factor- β) implique des récepteurs à activité sérine-thréonine kinase, T β R-I et T β R-II situés en amont de cette voie. La liaison du ligand TGF- β au récepteur de type II permet la formation d'un complexe hétérodimérique avec le récepteur de type I et donc sa phosphorylation. Le T β R-I phosphoryle à son tour les dimères Smad 2/3 qui vont se dissocier des récepteurs formant ainsi le complexe Smad 2/Smad 3/Smad 4. Ce complexe est transloqué dans le noyau pour réguler la transcription de plusieurs gènes cibles (**Figure 1.9**) (Jung *et al.*, 2016).

D'une manière générale, à un stade précoce du cancer, la signalisation TGF- β fonctionne comme une voie à rôle suppresseur de tumeurs à travers l'inhibition des signaux de prolifération et l'initiation de l'apoptose. Néanmoins, à un stade avancé du développement tumoral, le TGF- β favorise l'invasion et la métastase, augmente l'angiogenèse, et supprime la réponse immunitaire (Wu *et al.*, 2013). Le facteur de croissance transformant- β (TGF- β) a été

noté en tant que cible thérapeutique car il joue un rôle important et pléiotropique dans la progression du mélanome (Busse et Keilholz, 2011) et dans la suppression de la prolifération et l'induction de l'apoptose dans les mélanocytes normaux (Cohen-Solal et al., 2011). Une étude réalisée par Cohen-Solal et ses collaborateurs a montré que différentes lignées de mélanome ainsi que des échantillons de tumeurs présentaient une phosphorylation constitutive dans le domaine régulateur, appelé aussi région de liaison, au niveau de Smad2 et Smad3, les deux principaux effecteurs en aval de TGF β (Cohen-Solal et al., 2011).

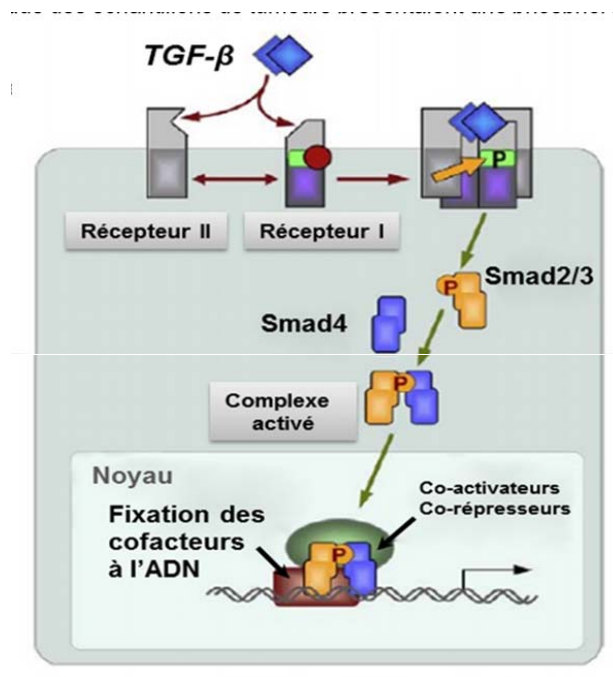


Figure 1.9. La voie TGF- β dépendante des protéines Smads. (Massagué et Gomis, 2006). Le TGF β se lie au récepteur de type II (T β R-II) constitutivement autophosphorylé, qui recrute le récepteur de type I (T β R-I) et le transphosphoryle. Ensuite, le T β R-I phosphoryle les protéines Smad2 et Smad3 qui s'associent à la protéine Smad4. Les protéines Smads activées forment un complexe final qui se dirige vers le noyau pour réguler la transcription des gènes cibles.

1.1.3.5.3. La voie des MAP kinases

La voie MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) joue un rôle clé dans le développement du mélanome, ce qui en fait une cible thérapeutique importante (Inamdar et al., 2010). La cascade des MAPK comprend ERK (Extracellular signal-Related protein Kinase), JNK/SAPK (c-Jun N-terminal Kinase/Stress Activated Protein Kinase) et p38 Kinase (**Figure 1.10**) (Sui et al., 2014).

Cette voie est généralement activée suite à des mutations dans l'oncogène RAS et RAF conduisant à une activation constitutive des protéines MEK et ERK dans 80% des mélanomes cutanés (Wang et Qi, 2013).

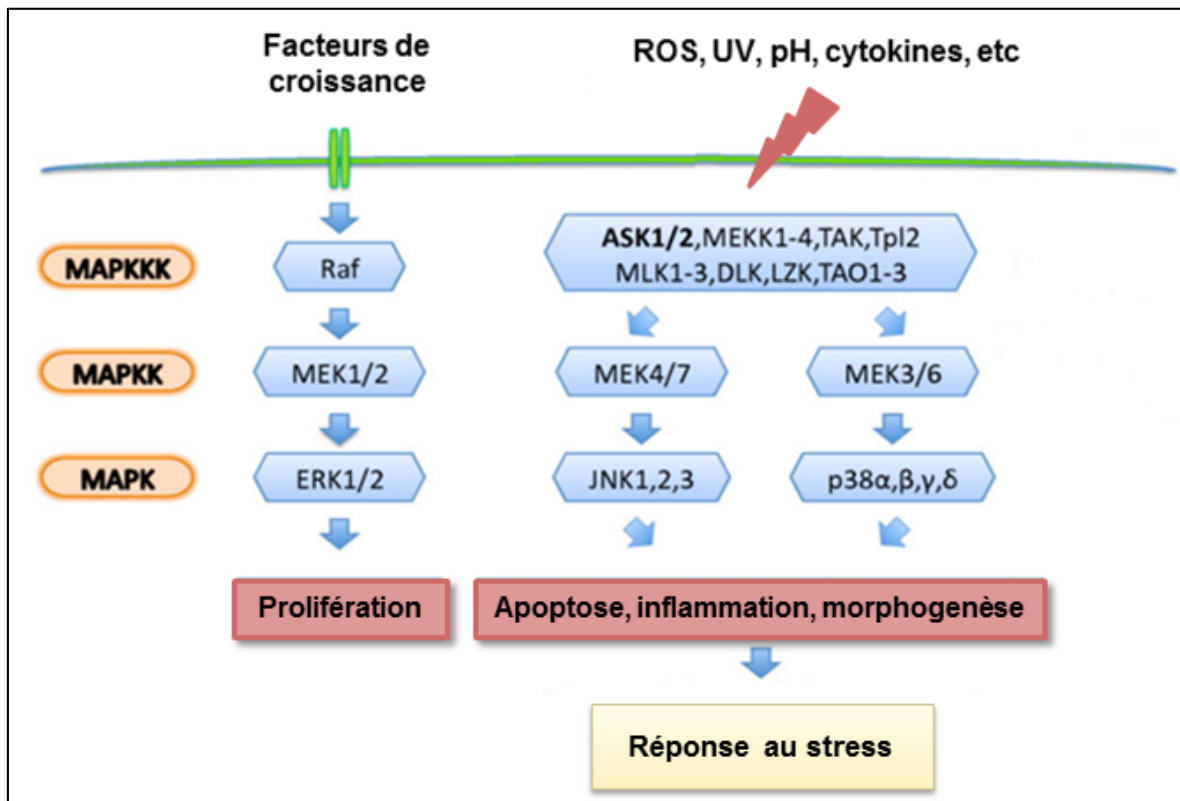


Figure 1.10. La voie des MAP Kinases.

La cascade des MAP Kinases implique la voie ERK1/2, la voie JNK/SAPK et la voie p38 Kinase qui sont activées en réponse à divers stimuli pour réguler de façon coordonnée plusieurs activités cellulaires : la prolifération, la différenciation, l'inflammation, la survie et l'apoptose.

a. La voie RAS-RAF-MEK-ERK

Les protéines RAS sont de petites GTPase oncogéniques, situées à la membrane plasmique, codées par les gènes KRAS, NRAS et HRAS (Wu *et al.*, 2013). L'activation de RAS en réponse à des facteurs de croissance ou de différenciation implique des récepteurs hétérotrimériques couplés aux protéines G ou des récepteurs à activité tyrosine kinase. Ainsi, RAS activée permet l'activation des membres de la famille des sérine/thréonine kinases, RAF. Concernant les protéines de la famille RAF-1, seul BRAF a été décrit comme muté. Une mutation quasiment unique est observée au niveau de ce gène, conduisant à une substitution d'une valine en un acide glutamique au niveau du codon 600 (V600E). Cette mutation activatrice est responsable

d'une augmentation de l'activité kinase de la protéine BRAF, et il a été montré qu'elle avait des capacités oncogéniques dans des modèles cellulaires (Davis *et al.*, 2002). Environ 50% des mélanomes abritent des mutations oncogéniques, BRAF, dont 90% sont *BRAFV600E* (Box *et al.*, 2014). Une mutation au niveau de NRAS et BRAF est responsable de la plupart des effets oncogéniques par l'activation de la voie MAPK, qui stimule la croissance incontrôlée des cellules de mélanome et régule la survie cellulaire (Wang et Qi. 2013).

Les protéines RAF phosphorylent, ensuite, les kinases MEK1/2 (mitogen associated/extracellular regulated kinase) qui à leur tour, induisent la double phosphorylation de ERK1/2 (extracellular regulated kinase) sur les résidus thréonine et tyrosine (Efferth, 2012). En tant que médiateur majeur de la formation du mélanome induite par un oncogène, MEK joue un rôle dans la promotion de la transformation cellulaire et l'inhibition de l'apoptose par des mécanismes transcriptionnels / post-traductionnels. Ceci a été confirmé par l'évidence que l'inhibition de MEK réduit la prolifération et l'invasion des cellules de mélanome mutées au niveau de *BRAFV600E in vitro* (Byron *et al.*, 2012). Une fois activées, les kinases ERK1/2 se détachent de MEK1/2 et phosphorylent de nombreux substrats membranaires et cytoplasmiques avant de migrer dans le noyau pour y phosphoryler des facteurs de transcription, régulant ainsi l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Cagnol *et al.*, 2012). Egalement, il a été décrit que l'activation constitutive de la voie ERK, survenant dans la grande majorité des néoplasmes mélanocytaires, joue un rôle central dans le mélanome (Jiang *et al.*, 2014).

b. La voie JNK/SAPK (c-Jun N-terminal Kinase/ Stress Activated Protein Kinase)

La cascade de JNK est un système de réponse au stress activé par des facteurs environnementaux, des cytokines inflammatoires et des facteurs de croissance. Comme avec les autres MAPK, la kinase membranaire proximale est une MAPKKK, généralement MEKK1-4 qui phosphoryle et active MKK4 ou MKK7. Alternativement, MKK4/7 peut être activée d'une manière indépendante des GTPases. Les SAPK/JNK sont activées suite à une translocation vers le noyau où elles régulent l'activité de plusieurs facteurs de transcription par phosphorylation de nombreux substrats, y compris, le facteur de transcription ATF2, Elk-1, c-Jun et le facteur NF- κ B (Basu et Kolesnick, 1998). Le c-Jun a été surexprimé dans plusieurs lignées cellulaires originaires d'un mélanome et le co-traitement de ces cellules avec les inhibiteurs de RAF et de la kinase JNK a entraîné une induction synergique de leur apoptose (Fallahi-Sichani *et al.*, 2015).

c. La voie P38 MAPK

La voie p38 MAPK est activée par des kinases en amont telles que MKK6 et MKK3 et agit via des effecteurs en aval incluant des protéines kinases comme MAPK APK-2 (MEK2) ou des facteurs de transcription (Yang *et al.*, 2014). Quatre isoformes (α , β , γ , et δ) constituent la famille p38 MAPK qui sont régulés par les cytokines pro-inflammatoires, les facteurs de croissance, et le stress cellulaire. L'activation de cette voie permet à la cellule de répondre à différents stimuli extracellulaires par la génération de réactions inflammatoires et l'induction des signaux de prolifération, de survie et de différenciation (Sosa *et al.*, 2011). Au début de la transformation maligne, p38 peut agir comme un suppresseur de tumeurs. En outre, cette protéine est impliquée dans le maintien des critères d'agressivité tumorale tels que l'invasion et la migration des cellules cancéreuses dans de nombreux cancers. Une étude de Khanna *et al.*, a démontré que les protéines p38 régulent le désassemblage de la jonction VE-cadhérine, facilitant la migration du mélanome à travers les cellules endothéliales (Khanna *et al.*, 2010). Il a été démontré que p38 protège les cellules de mélanome de l'apoptose induite par les UV par régulation négative de l'activité de NF-kappa B et de l'expression de Fas (Ivanov et Ronai, 2000).

1.1.3.5.3. La voie PI3K/AKT

La voie PI3K/AKT est une voie de signalisation intracellulaire jouant un rôle important dans la régulation de la croissance, la prolifération, la différenciation et l'angiogenèse (Wu *et al.*, 2013). La PI3 Kinase est un hétérodimère à activité kinase constitué de deux protéines : une sous-unité régulatrice p85, et une sous-unité catalytique p110. Cette protéine est activée directement par un récepteur à activité tyrosine-kinase ou par l'intermédiaire de la protéine RAS. La PI3K participe à la formation d'un composé lipidique membranaire, le phosphatidylinositol (PI)-3,4,5-triphosphate. Ce composé recrute la sérine/thréonine kinase AKT à proximité de la membrane plasmique, où elle est phosphorylée et activée par la PDK1 (phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1) (Dreyer *et al.*, 2009). Cette voie est altérée par la protéine PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome Ten) qui réverse l'action de la PI3 Kinase grâce à son activité lipide phosphatase (Wu *et al.*, 2013). L'expression de la protéine codant pour le gène suppresseur de tumeurs PTEN induit la déphosphorylation de la phosphatidylinositol (PI)-3,4,5-triphosphate en phosphatidylinositol (PI)-4,5-bisphosphate bloquant ainsi les signaux de survie stimulés suite à l'activation de la kinase AKT (**Figure 1.11**) (Molinari et Frattini, 2014).

De nombreuses mutations des protéines constituant cette voie sont décrites dans plusieurs cancers. De nombreux points nodaux établis dans la voie PI3K (c'est-à-dire PIK3CA, AKT, PTEN) ont été liés à la progression du mélanome. Les mutations de la voie PI3K, bien qu'elles soient hétérogènes, elles étaient présentes dans 41% des mélanomes et PTEN est le gène le plus muté de la voie PI3K dans les mélanomes (22%) (Shull *et al.*, 2012). Egalement, plusieurs nouvelles mutations de la voie PI3K ont été découvertes dans mTOR, IRS4, PIK3R1, PIK3R4, PIK3R5 et NFKB1 (Shull *et al.*, 2012). Ces modifications permettent l'accumulation de PIP3 à la membrane et la stimulation incontrôlée de la kinase AKT. L'activation de cette kinase oncogénique AKT stimule la prolifération, bloque l'apoptose et améliore le métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse (Efferth, 2012).

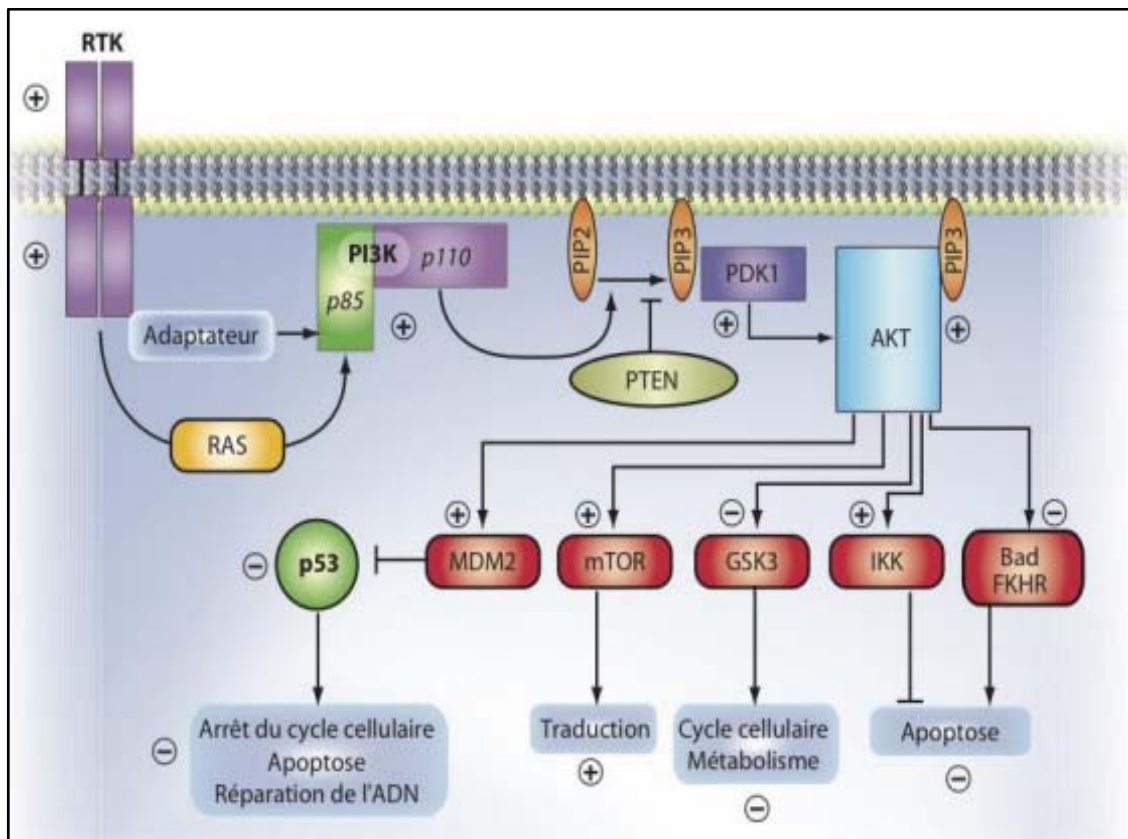


Figure 1.11. La voie PI3K/AKT (Cortot *et al.*, 2006). La PI3K est composée d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110. Cette voie est activée directement par un récepteur à activité tyrosine-kinase (RTK) ou à travers la protéine Ras. L'activation de PI3K permet de phosphoryler PIP2 (Phosphatidylinositol 3,4 biphosphate) en PIP3 (Phosphatidylinositol triphosphate). Ce composé recrute à la membrane des PDK1 qui activent et phosphorylent la kinase AKT. Cette kinase régule l'activité de nombreuses protéines cibles impliquées dans l'apoptose, la croissance et le cycle cellulaire. Un contrôle négatif de PI3K est possible par l'action antagoniste de la protéine PTEN.

1.1.3.5.4. La voie de l'AMPc et MITF

La voie de l'AMPc est stimulée par des hormones mélanotropes produites par les kératinocytes comme l' α -MSH (alpha-Melanocyte Stimulating Hormone), qui se lie au récepteur MC1R (Melanocortin 1 Receptor) et stimule la production d'AMPc.

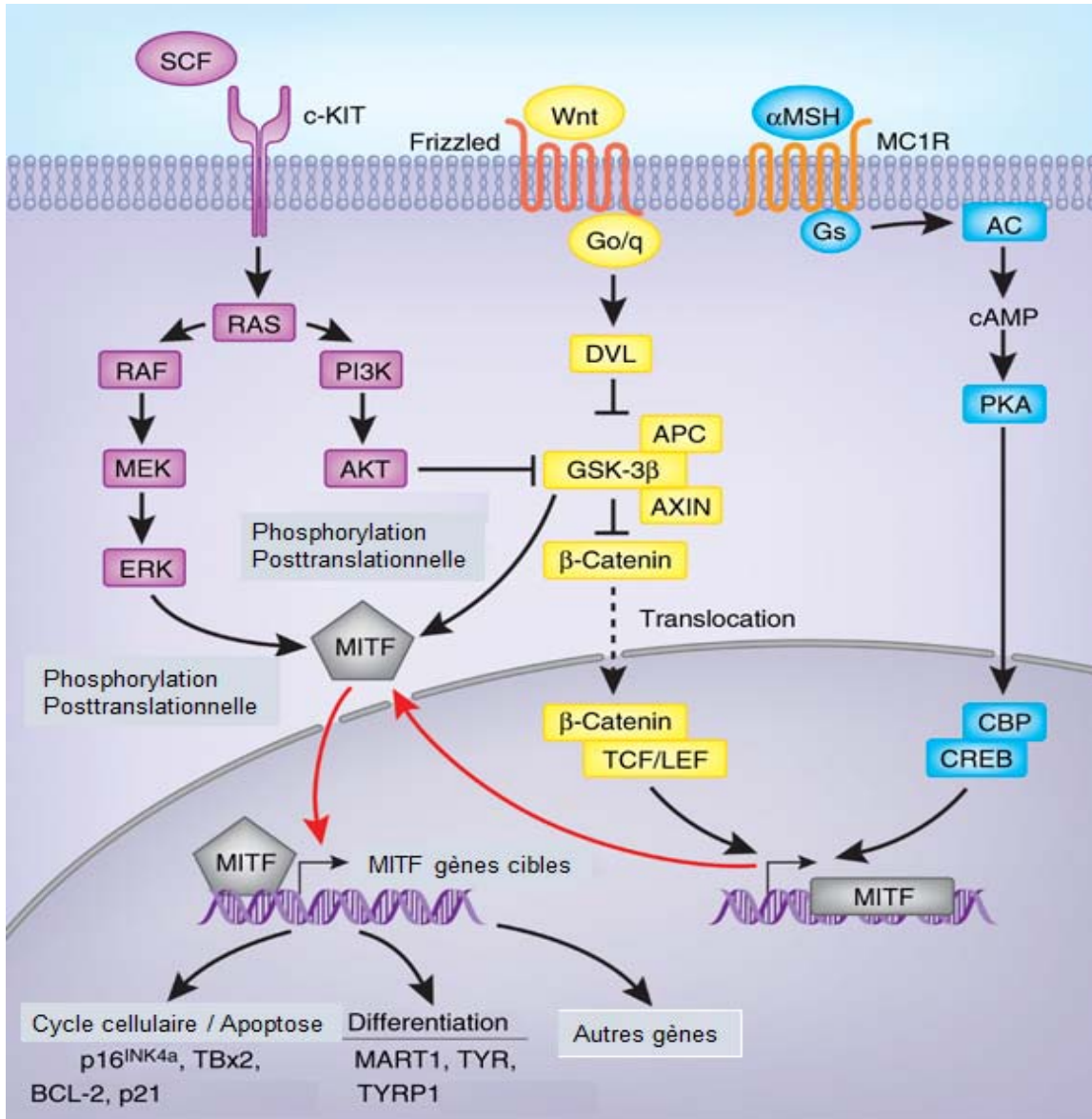


Figure 1.12. Voie de l'AMPc et MITF (Hocker et al., 2008). Régulation des gènes de la pigmentation de la peau par α -MSH/MC1R. Les effets de l' α -MSH sur la mélanogenèse passent par l'activation de la voie de l'AMPc. L' α -MSH se fixe sur son récepteur MC1R. Les protéines G transmettent le signal à l'AC, qui catalyse l'ATP en AMPc. L'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc provoque l'activation de la PKA qui est transloquée vers le noyau où elle phosphoryle le CREB. La présence d'un domaine CRE dans le promoteur de MITF explique son rôle central dans la régulation de l'expression des gènes de pigmentation TRP1 et TRP2.

L'AMPc active la protéine kinase A (PKA), qui phosphoryle et active le facteur de transcription CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein), qui à son tour, stimule l'expression de la protéine MITF (Levy *et al.*, 2006).

En plus de la régulation transcriptionnelle, MITF est également sujet à diverses modifications post-traductionnelles, en particulier la phosphorylation par MAPK, S6 kinase ribosomale (RSK), glycogène synthase kinase-3 β (GSK3 β) et p38. Ces kinases existent dans diverses voies de signalisation homéostatiques importantes et pourraient donc moduler l'activité transcriptionnelle du MITF en réponse à des signaux environnementaux spécifiques (Weilbaecher *et al.*, 2001). De plus, l'expression du MITF est régulée par la voie β -caténine (Hocker *et al.*, 2008) (**Figure 1.12**), qui représente une voie restreinte aux tissus influençant significativement la prolifération et la survie des cellules résistantes au traitement (Widlund *et al.*, 2002).

La protéine MITF est un facteur de transcription situé au centre de multiples voies de signalisation contrôlant la différenciation, la morphologie, la prolifération et la survie des différentes cellules mélanocytaires : les mélanoblastes, les mélanocytes et les mélanomes (Lin et Fisher, 2007). Il a été démontré que le gène MITF était amplifié dans environ 20 % des mélanomes, mais pas dans les nævi (Garraway *et al.*, 2005). Selon le niveau d'expression et les modifications post-traductionnelles de MITF, les cellules de mélanome peuvent soit se différencier ou proliférer. L'activité élevée du MITF favorise la différenciation précédée par l'arrêt du cycle cellulaire G1 médié par p16 et p21. Une faible activité de MITF est attribuée au phénotype invasif de cellules souches alors qu'un épuisement prolongé de MITF provoque la sénescence des cellules de mélanome (Hartman et Czyz, 2015).

1.1.3.5.5. La voie JAKs/STAT3

La voie JAKs/STAT3 est impliquée dans plusieurs processus oncogéniques impliquant la prolifération, la différenciation, l'invasion et la métastase tumorale. Dans la plupart des tumeurs solides, l'activation de Janus Kinases (JAK) se produit en réponse à une abondance de cytokines inflammatoires ou facteurs de croissance qui se lient à leurs récepteurs membranaires (Buchert *et al.*, 2016). L'activation de ces kinases conduit à la phosphorylation des facteurs STATs et la stimulation de leur activité transcriptionnelle en ciblant plusieurs gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose et l'angiogenèse et jouant un rôle important dans l'oncogénèse tumorale (**Figure 1.13**) (Zhang *et al.*, 2014).

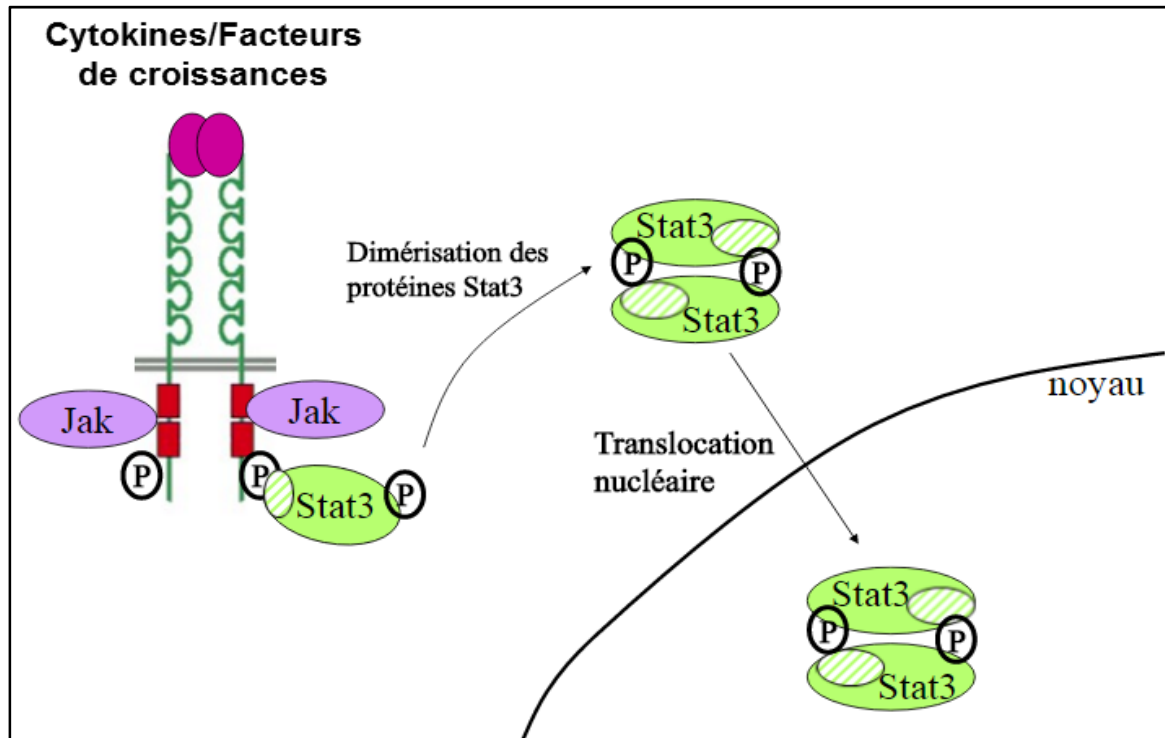


Figure 1.13. La voie JAKs/STAT3.

La voie de transmission du signal JAK/STAT permet l'activation des protéines STAT en réponse à des signaux de cytokines et facteurs de croissance. L'activation des STATs a lieu au niveau de récepteurs membranaires qui se rassemblent alors en dimères et migrent dans le noyau où elles stimulent la transcription de gènes cibles spécifiques.

La voie de signalisation JAK2/STAT3 joue un rôle critique dans la tumorigénèse et elle a été suggérée comme cible moléculaire potentielle pour les traitements anti-mélanomes (Wu *et al.*, 2017). STAT3 est reconnu comme un oncogène, constitutivement activé chez les patients atteints de mélanome avec des métastases cérébrales. De ce fait, l'activité de STAT3 est significativement plus élevée dans les cellules de mélanome métastatique du cerveau humain par rapport à celle des cellules de mélanome cutané (Xie *et al.*, 2006). La phosphorylation de STAT3 stimule l'accélération de la prolifération cellulaire et induit le blocage des signaux pro-apoptotiques dans les cellules du mélanome. L'activation de la voie JAK/STAT3 régule également l'expression de certaines molécules oncogéniques, contribuant à la migration, l'invasion, l'angiogénèse et la métastase tumorale, telles que VEGF-A, bFGF et HGF (Liu *et al.*, 2015).

1.1.3.5.6. La voie NF- κ B

Dans sa forme la plus basique, la voie de signalisation NF- κ B regroupe des récepteurs et des molécules adaptatrices : le complexe IKK avec les protéines I κ B et les dimères NF- κ B. En réponse à plusieurs stimuli, parmi lesquels les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-8 ou TNF- α , des produits d'origine bactérienne tels que le LPS, ou diverses formes de stress telles que les radiations UV, la kinase IKK est activée entraînant ainsi la phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation des protéines I κ B. Les dimères de NF- κ B libérés sont ensuite activés via des modifications post traductionnelles et sont transloqués dans le noyau où ils se lient à des séquences spécifiques et induisent la transcription de gènes cibles (**Figure 1.14**). Ces gènes interviennent dans l'adhésion cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire, la protection contre l'apoptose et dans les réponses inflammatoires et immunitaires innées et acquises (Sun et Zhang, 2007 ; Moorchung *et al.*, 2014).

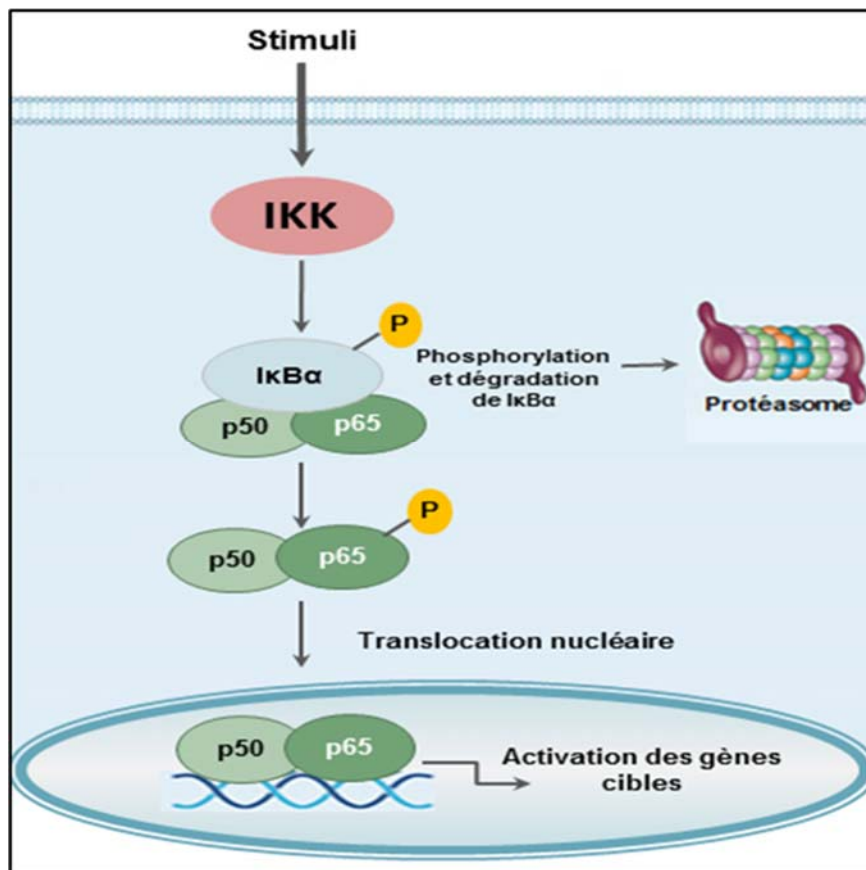


Figure 1.14. La voie NF- κ B.

En réponse à des stimuli extracellulaires, I κ B est phosphorylée par le complexe IKK α / β (I κ B kinase), pour être dégradé par le protéasome libérant ainsi le dimère NF- κ B qui peut être transloqué dans le noyau pour activer des gènes cibles.

L'activation de la voie NF- κ B est généralement associée à la progression tumorale du mélanome (Ueda et Richmond, 2006). Dans les cellules de mélanome, des études ont mis en évidence que certains composants de la famille NF- κ B, comme les protéines p50 et p65 / RelA, sont surexprimés dans les noyaux des cellules naïvi et dysplasiques de mélanome respectivement (McNulty *et al.*, 2004). Ces phénomènes sont étroitement associés à une activité accrue d'IKK, entraînant une dégradation plus rapide d'I κ B avec une localisation nucléaire de NF- κ B et une grande capacité de transactivation du complexe NF- κ B. En fait, l'équilibre entre la dégradation d'I κ B α et sa synthèse a été modifié dans les cellules de mélanome Hs294T par l'intermédiaire d'un processus impliquant sa dégradation, ce qui conduit à la translocation nucléaire et l'activation constitutive de NF- κ B (Shattuck-Brandt et Richmond, 1997). L'activation mutationnelle de BRAF, commune dans les mélanomes humains, a également été associée à une grande activité IKK et à une augmentation concomitante du taux d'ubiquitination d'I κ B α et de sa dégradation ultérieure. L'utilisation de deux inhibiteurs ; tels que le Bortezomib (généralement combiné au temozolomide) et le Curcumin a bloqué l'activité de NF- κ B en stimulant ainsi l'inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses du mélanome (Madonna *et al.*, 2012).

1.1.3.5.7. La voie p53

La protéine p53 est un facteur de transcription codée par le gène suppresseur des tumeurs, TP53 situé chez l'homme sur le bras court du chromosome 17. Dans une cellule normale qui n'a pas subi de stress, l'absence de p53 est due à l'enzyme Mdm2, une E3 ubiquitine ligase qui se fixe sur p53, induisant ainsi sa dégradation. Lorsque la cellule se trouve en situation de stress, suite à des lésions de l'ADN et des défauts de division ou activation d'oncogènes, l'association entre p53 et Mdm2 est abolie conduisant à une stabilisation de p53 (**Figure 1.15**) (Li *et al.*, 2015).

Il a été démontré que la protéine p53 induit les réactions de stress cellulaires en initiant la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et, surtout, l'apoptose (Nowsheen et Yang, 2012). L'altération du gène TP53, aussi appelé « gardien du génome » constitue donc le centre de la transformation maligne. Bien que dans la plupart des tumeurs, p53 est muté, ce qui non seulement désactive son activité suppresseur de tumeur, mais peut conférer un potentiel oncogène (Box *et al.*, 2014), l'inactivation mutationnelle de p53 dans le mélanome est rare et la p53 de type sauvage est fréquemment exprimée à des niveaux élevés (Li *et al.*, 2006). En outre, contrairement à d'autres cancers, l'expression de p53 de type sauvage dans le mélanome semble augmenter avec la progression tumorale (Li *et al.*, 2006). Aussi, Il a été

suggéré que l'expression altérée de p53 dans le mélanome n'était pas liée au statut de p53 (Avery-Kiejda *et al.*, 2011).

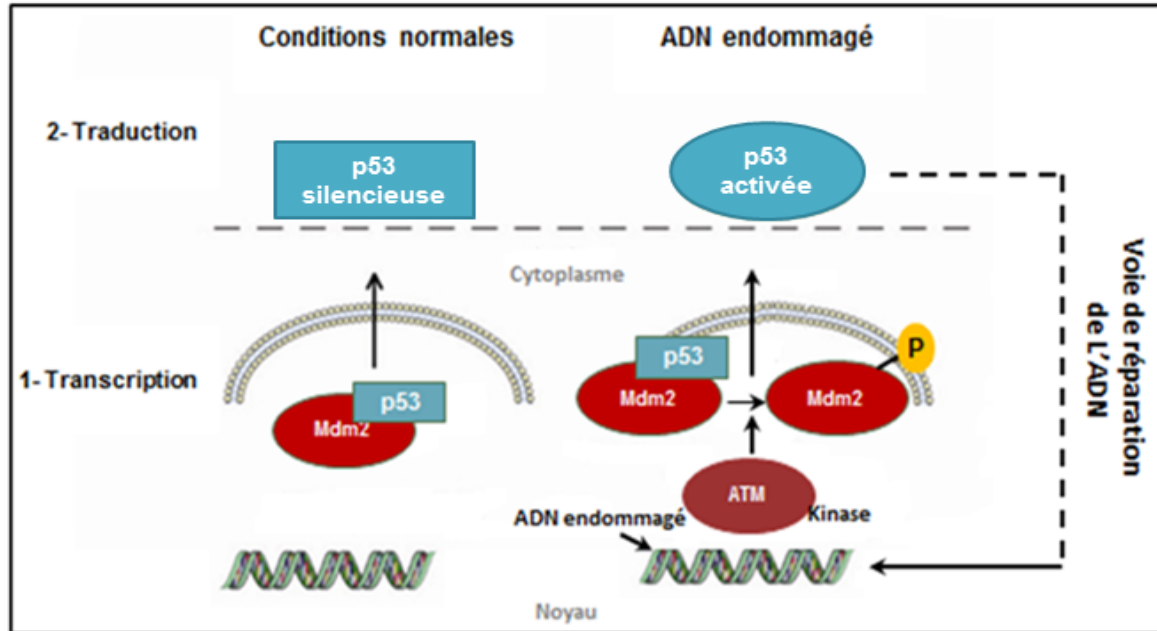


Figure 15. La voie p53.

Dans des conditions normales, la Mdm2 se fixe de façon spécifique sur la partie amino-terminale de la p53. Cette interaction bloque le domaine de transactivation de la p53 conduisant ainsi à sa dégradation. Suite à des lésions génotoxiques, la phosphorylation de la p53 bloque l'interaction p53-Mdm2. Il en résulte une accumulation de la protéine p53 par diminution de sa dégradation dépendante de Mdm2.

Il est aussi connu qu'une perturbation dans la transduction de ces signaux intracellulaires confère aux cellules mutées des propriétés malignes se répercutant sur la progression du cycle cellulaire, l'échappement à l'apoptose, la prolifération cellulaire, l'invasion, la progression métastatique, la migration, la survie, l'adhésion et l'angiogenèse (Monteiro *et al.*, 2015).

1.1.3.6. Cycle cellulaire et mélanome

Le cycle cellulaire est classiquement divisé en quatre phases, G1, S, G2, M. Au cours de la phase G1 ou point de restriction, les cellules prolifèrent indépendamment des facteurs mitogènes et de croissance. Cette phase est préparatrice à la phase S où se produit la réplication de l'ADN. La phase G2 désigne la préparation à la mitose M où la cellule se divise pour former deux cellules filles. Après la mitose, les cellules peuvent soit passer en G1, soit entrer en G0, stade quiescent de non division (Sánchez-Martínez *et al.*, 2015). Le contrôle du cycle cellulaire implique l'intervention des protéines de régulation, y compris les cyclines

(cycline A, B, D, ou E) ; les kinases cycline-dépendantes (CDK) (CDK1, 2, 4 ou 6) et les inhibiteurs des CDK, CKI, comme p21, p27, p53, et la protéine du rétinoblastome (pRB) (Araújo et al., 2011).

Les CDK sont actives uniquement sous forme d'un complexe entre une sous-unité catalytique (CDK) et une sous-unité régulatrice (cycline) (Meijer, 2003). D'une manière générale (**Figure 1.16**), les CDK4 et CDK6 associées à des cyclines de type D, régulent le déroulement de la phase G1. Puis, CDK2/cycline E prend le relais pour assurer la transition G1/S, suivie par CDK2/cycline A qui assure le contrôle de la phase S. CDK1/cycline A intervient en G2 et CDK1/cycline B régule la transition G2/M et l'entrée en mitose (Meijer, 2003). Les kinases dépendantes des cyclines (CDKs) et leurs activités catalytiques sont modulées par des interactions avec les cyclines et les inhibiteurs de CDK, (CKI) (*cyclin-dependent kinase inhibitors*) (Lim et Kaldis, 2013), appartenant aux familles INK4 et Cip/Kip (Sherr et Roberts, 1999). Les membres de la famille INK4 ($p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$ et $p19^{INK4d}$) contiennent des motifs ankyrine répétés. Ils se lient spécifiquement aux kinases Cdk4 et Cdk6, qu'ils inhibent en empêchant la liaison de la cycline D. La $p16^{INK4a}$ et la $p15^{INK4b}$ ont donc un rôle important en empêchant le déclenchement de la prolifération cellulaire, et sont de ce fait des gènes suppresseurs de tumeurs, fréquemment altérés dans les tumeurs (Pommier et Kohn, 2003).

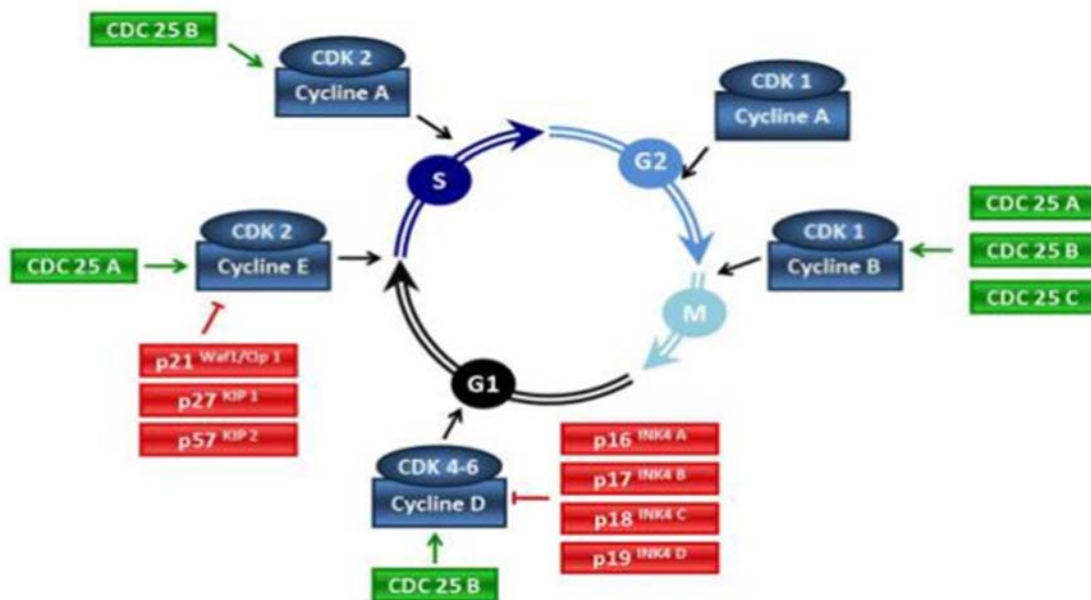


Figure 1.16. Le contrôle du cycle cellulaire.

La transition entre les différentes phases du cycle cellulaire est contrôlée par des variations dans l'activité des protéines régulatrices : les cyclines, les CDK et les inhibiteurs des CDK ou CKI.

Une dérégulation des kinases cyclines-dépendantes (CDK) (une famille de sérine / thréonine kinases) associée à la surexpression, l'amplification ou la mutation de la sous-unité CDK ou cycline sont souvent associées à un mauvais pronostic (Malumbres et Barbacid, 2009) et contribuent à la prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses (Peyressatre *et al.*, 2015). CDK2, une protéine appartenant à la famille CDK, joue un rôle unique dans le développement et la progression du mélanome, où son expression est contrôlée par le facteur de transcription MITF spécifique de la lignée mélanocytaire (Desai *et al.*, 2013). La régulation du cycle cellulaire est une caractéristique de la mélanomagenèse. Les agents ciblant les phases G1-S et G2-M, ainsi que les anti-mitotiques directs, ont tous montré une activité préclinique prometteuse dans le mélanome (Xu et McArthur, 2016). Des inhibiteurs spécifiques de CDK 4/6 ciblant la transition G1-S ont amélioré l'index thérapeutique. Il existe une synergie d'action avec la combinaison d'inhibiteurs de CDK4 / 6 et les thérapies existantes ciblant la voie MAPK, en particulier dans des mélanomes métastatiques (où NRAS et BRAF sont mutés) (Xu et McArthur, 2016).

1.1.3.7. Apoptose et mélanome

L'apoptose ou mort cellulaire programmée, est un processus physiologique qui permet à l'organisme d'éliminer les cellules non désirées ou endommagées et potentiellement dangereuses sans provoquer l'inflammation du tissu. C'est un processus contrôlé génétiquement, activé par des stimuli physiologiques normaux, intra ou extracellulaires mais également contrôlé par des stimuli pathologiques qui perturbent le fonctionnement de la cellule tels que, par exemple, une infection virale, un choc thermique, un stress oxydatif ou des dommages induits à l'ADN. La peau est l'organe le plus important du corps et protège l'organisme contre les agressions physiques, chimiques et biologiques externes, telles que les blessures, les rayons ultraviolets et les micro-organismes. L'épiderme est la partie supérieure de la peau subissant un auto-renouvellement continu et rapide (Lippens *et al.*, 2009).

L'apoptose se produit principalement par deux voies bien connues dans la cellule qui implique l'activité des caspases, et une voie caspase-indépendante (Zeng *et al.*, 2015).

1.1.3.7.1. Les voies d'activation des caspases

Les caspases sont des protéases à cystéine possédant un site catalytique comprenant un résidu cystéine localisé dans un motif Q-A-C-X-G (X pouvant être un résidu R, Q ou G). Elles sont synthétisées sous forme inactive, les procaspases dont l'activation se fait par des coupures protéolytiques intra ou intermoléculaires.

Les caspases reconnaissent un motif tétra-peptidique, puis clivent la chaîne polypeptidique au niveau d'un résidu aspartate. Elles sont activées principalement par deux voies de signalisation qui entraînent leur dimérisation : la voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque et la voie mitochondriale ou voie intrinsèque (**Figure 1.17**).

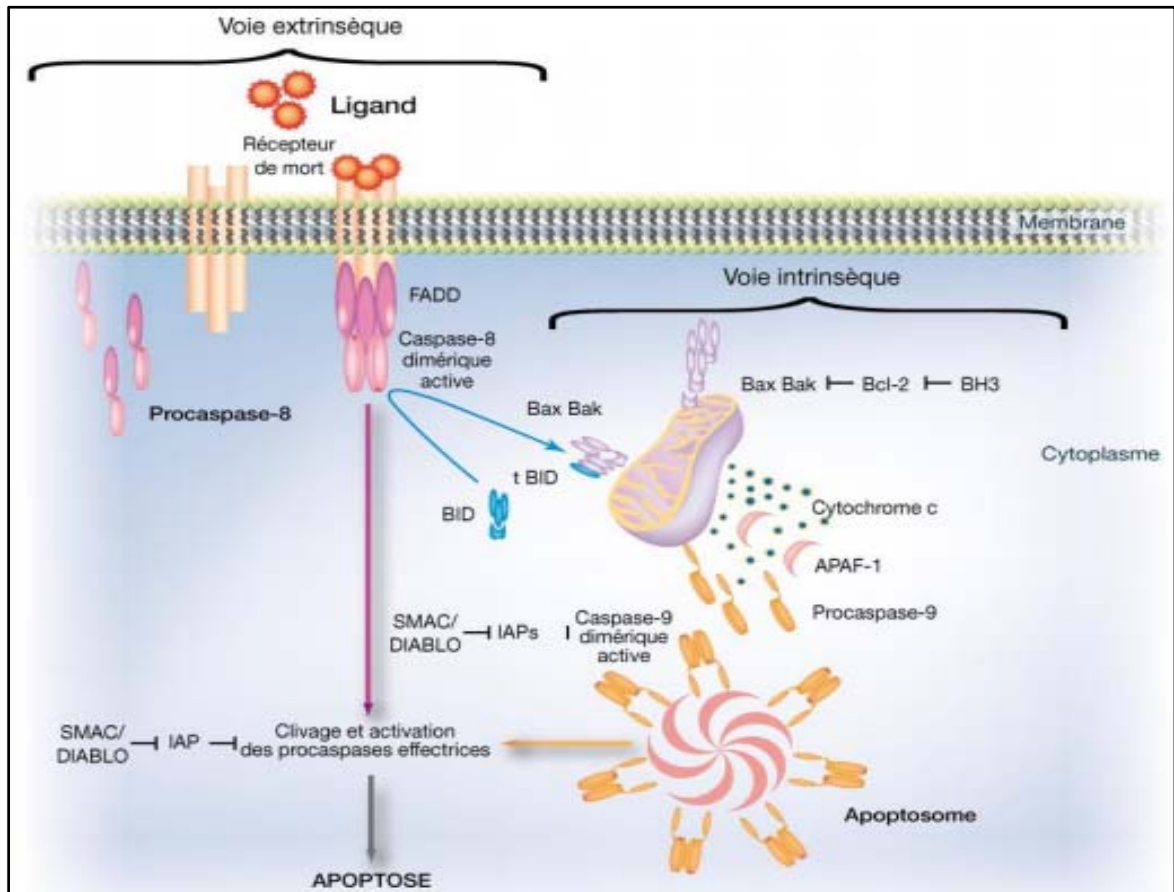


Figure 1.17. Mécanisme du déclenchement de l'apoptose caspase-dépendante.
L'apoptose caspase-dépendante est un processus complexe pouvant être déclenché par deux voies majeures : la voie intrinsèque dépendante de la mitochondrie et la voie extrinsèque qui implique l'activation des récepteurs de mort.

a. La voie intrinsèque mitochondriale

La voie principale d'activation des caspases est la voie dépendante de la mitochondrie. Cette voie implique des protéines appartenant à la superfamille de Bcl-2. La famille Bcl-2 renferme des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-W et des protéines pro-apoptotiques comme Bid, Bad, Bak, Bax, Bim, NOXA et PUMA. Cette voie est reliée à la libération du cytochrome c dans le cytosol où il se lie avec APAF-1 (Apoptotic Protease-

Activating Factor 1) et la procaspase 9. Cette liaison ATP-dépendante permet de former l'apoptosome qui assure l'activation de la caspase 9 et le clivage des caspases 3, 6 et 7 (Araújo *et al.*, 2011).

Les protéines de la famille Bcl-2 sont des régulateurs clés de l'apoptose et jouent un rôle important dans la chimiorésistance et sont indispensables à la survie des mélanocytes. Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1) sont fortement exprimés dans le mélanome (Wolter *et al.*, 2007) et un ratio Bcl-2/Bax élevé est corrélé avec une résistance à l'apoptose (Raisova *et al.*, 2001). Deux membres de famille de l'IAPs (inhibitor of apoptosis proteins : survivine et ML-IAP) et FLIP sont des facteurs anti-apoptotiques et ont été associés à la progression tumorale (Soengas et Lowe, 2003). L'activité pro-apoptotique de cette famille est inhibée suite à l'activation des voies de survie RAS/RAF/MEK/ERK et PI3K/AKT, seules ou via l'activation de la voie NF- κ B (Soengas et Lowe, 2003).

b. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque implique les récepteurs de mort CD95, Fas, TRAIL et les récepteurs 1 et 2 de TNF (Tumour Necrosis Factor). Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires qui possèdent une région extracellulaire en position aminoterminal riche en cystéines et un domaine cytoplasmique appelé « domaine de mort » (DD ou death domain) responsable de la formation du DISC (death-inducing signaling complex) après interaction avec des protéines adaptatrices telles que FADD (Fas associated death domain protein) et TRADD (TNFR associated death domain protein). La stimulation de ces récepteurs conduit à l'activation de la caspase 8. Une fois activée, la caspase 8 peut propager le signal apoptotique soit en activant la caspase 3, de façon indépendante de la mitochondrie, soit en clivant Bid qui, à son tour, va déclencher la signalisation mitochondriale impliquant les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak et conduisant ainsi à une amplification du processus (Koehler *et al.*, 2014).

Durant la carcinogenèse du mélanome, différents récepteurs, tels que : TNF- α , FasL et TRAIL / Apo 2L, inducteurs de la voie de la caspase 8 ont été mis en évidence afin d'expliquer la résistance au signal apoptotique médiée par cette voie (Soengas et Lowe, 2003). L'inactivation des protéases de type non-cétase comme les cathepsines, les granzymes et les calpaïnes a été associée à la résistance des cellules de mélanome aux inducteurs de la voie de mort extrinsèque comme le TRAIL (Hersey et Zhang, 2001).

1.1.3.7.2. La voie indépendante des caspases

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des caspases a montré que les cellules peuvent mourir aussi bien par des mécanismes impliquant les caspases que par des mécanismes indépendants des caspases (Herr et Debatin, 2001). Cette voie implique l'activation de la flavoprotéine AIF « apoptosis inducing factor » et/ou la ribonucléase Endo G « endonuclease G ». Ces protéines sont initialement localisées dans l'espace inter-membranaire mitochondrial. Plusieurs études ont montré que plusieurs drogues chimiothérapeutiques ou composés naturels induisent l'apoptose de plusieurs lignées tumorales à travers l'activation du facteur apoptotique AIF (Millan et Huerta, 2009 ; Kim *et al.*, 2015). Un autre facteur qui peut moduler la sensibilité aux médicaments contre le mélanome est la protéine du choc thermique 70 (Hsp70). En plus de son rôle dans le contrôle de différentes protéines cellulaires impliquées dans le cycle cellulaire et l'apoptose (Peng *et al.*, 2001), Hsp70 antagonise l'activité du facteur apoptotique AIF (Ravagnan *et al.*, 2001).

L'apoptose caspase-indépendante forme un lien principal entre le stress oxydatif et la mort cellulaire programmée. Les ROS sont générés par le métabolisme des cellules transformées, la réaction immunitaire contre la tumeur en développement, le rayonnement ultraviolet, la production de mélanine et un système antioxydant altéré. Il a été démontré qu'une perte d'expression de p53, due à la régulation négative de SESN1, SESN2 et GPX1 sans agir sur les gènes prooxydants BAX, NQO1 et PUMA, conduit à une augmentation de la génération des ROS et à des dommages de l'ADN. Par contre une activation de l'expression de p53 conduit à une inhibition des niveaux des ROS en augmentant l'expression des enzymes antioxydantes (Sablina *et al.*, 2005). De même, le contrôle de la libération du facteur AIF à travers la production des espèces réactives d'oxygènes (ROS) constitue une alternative thérapeutique pour sensibiliser les cellules tumorales à la chimiothérapie (Delavallée *et al.*, 2011).

La résistance à la mort cellulaire indépendante des caspases peut être médiée par l'inactivation du gène 7 codant pour la protéine (mda-7) associée à la différenciation des mélanomes. Cette protéine est exprimée dans les lésions normales et précoces du mélanome, mais elle est altérée dans le mélanome avancé (Ellerhorst *et al.*, 2002).

1.1.3.8. Invasion et métastases des mélanomes

En diagnostiquant un cancer de la peau, il est très important de déterminer si le cancer est localisé dans la peau ou s'il s'est déjà propagé vers les ganglions lymphatiques régionaux ou

vers les organes éloignés. La formation de métastases est variable dans les différents types de cancer de la peau. Les carcinomes basocellulaires forment rarement des métastases mais les carcinomes spino cellulaires métastasent avec de faibles fréquences. Les mélanomes cutanés métastasent plus fréquemment que les autres types de cancer et présentent une des néoplasies les plus agressives. Chez un grand nombre de patients atteints de mélanome, les métastases étaient déjà présentes au moment du diagnostic.

Le processus de formation de métastases est un processus dynamique et complexe comprenant une série d'étapes indiquées à la **Figure 1.18**. Pour qu'une lésion ait lieu, il faudrait que toutes les étapes de ce processus se réunissent.

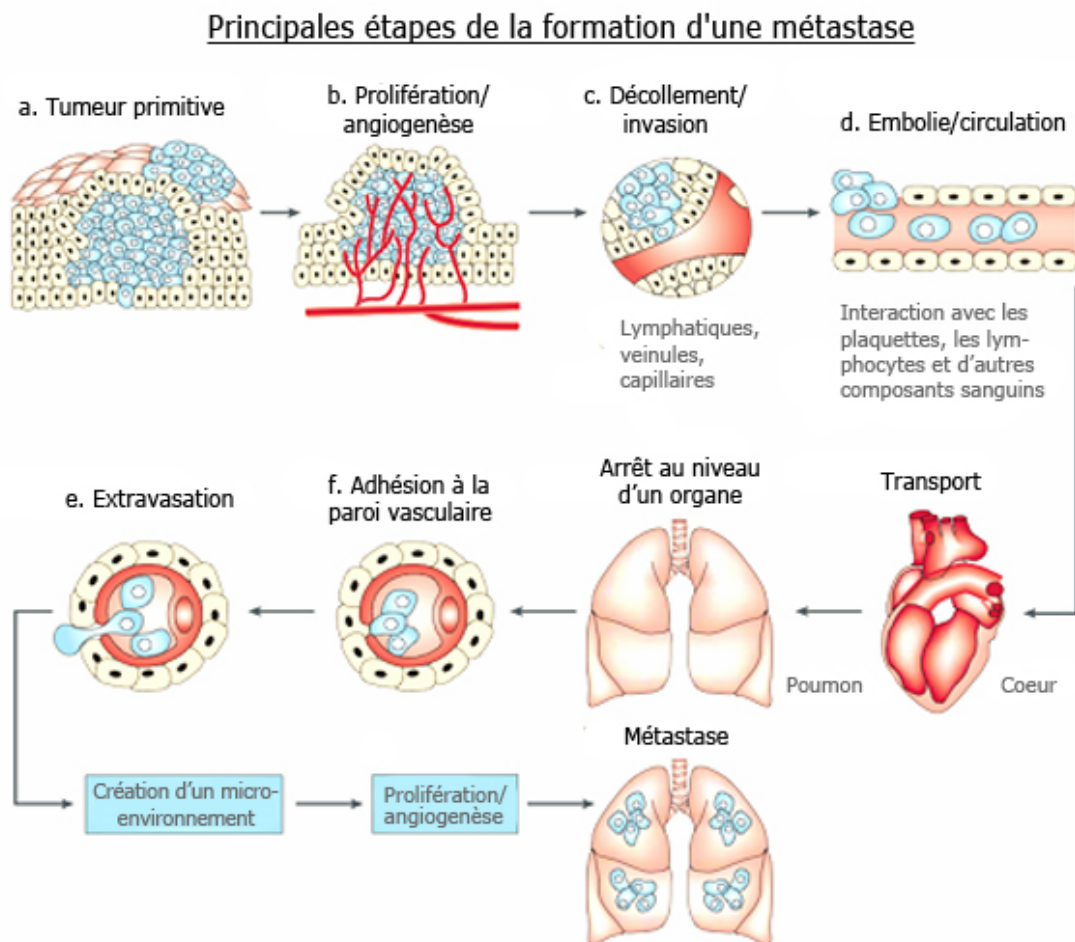


Figure 1.18. Etapes du processus de formation de métastases dans le mélanome.

Les principales étapes de la formation de métastases sont les suivantes :

- ❖ Après une transformation initiale, la croissance unicellulaire et multicellulaire doit être progressive et les nutriments sont transportés par simple diffusion à la masse cellulaire.
- ❖ Lorsque la masse tumorale est supérieure à 1-2 mm de taille, une vascularisation massive se produit. Ce qui implique la synthèse et la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques.
- ❖ Une invasion locale du stroma de l'hôte par certaines cellules tumorales.
- ❖ Des veinules à parois fines, comme les canaux lymphatiques, transmettant de la résistance à la pénétration des cellules tumorales de sorte qu'ils présentent la voie la plus commune d'entrée dans la circulation sanguine.
- ❖ L'étape suivante est la séparation et l'embolisation des agrégats tumoraux de petites tailles, tandis que la grande majorité des cellules tumorales circulantes sont détruites rapidement.
- ❖ Une fois que les cellules tumorales ont survécu en circulation, elles doivent adhérer aux cellules endothéliales ou à la membrane basale sous-endothéliale.
- ❖ Ensuite, l'extravasation se produit par les mêmes mécanismes par lesquels l'invasion initiale a eu lieu.
- ❖ Le processus de formation de métastases est complété par la prolifération dans le parenchyme de l'organe.

La formation et la progression de métastases dépendent des interactions multiples et complexes entre les cellules métastatiques et des mécanismes homéostatiques de l'hôte (Fidler, 1999 ; Liotta et Kohn, 2001). D'après des études sur des animaux et exactement sur la distribution et l'évolution des cellules de mélanome marquées et diffusées par le sang, il a été démontré que bien que les cellules atteignent la microvascularisation de nombreux organes, la croissance du parenchyme ne se produit que dans des organes spécifiques (Fidler, 1970 ; Fidler et Talmadge, 1986).

Les mélanomes sont des tumeurs cutanées hautement métastatiques. Ils résultent de la transformation maligne des mélanocytes. L'invasion des mélanomes se fait suite à une combinaison de différents mécanismes : la perte de l'adhésion cellule-cellule, la perte de l'adhésion cellule-matrice, la dégradation de la matrice, la chimioattraction/répulsion, la migration et la transition pseudo épithélio-mésenchymateuse (Domingues *et al.*, 2013).

1.1.3.8.1. Interaction cellule-cellule / cellule-matrice extracellulaire (ECM)

Les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire (ECM) coordonnent les voies de signalisation qui contrôlent divers aspects du comportement cellulaire. La prolifération cellulaire et les métastases nécessitent une interaction continue avec les composants de l'ECM et la modulation de la signalisation cellulaire. La nature de ces interactions avec l'ECM et la signalisation en aval sont différentes dans les cellules cancéreuses en comparaison avec des cellules non-tumorales. La matrice extracellulaire est une structure tridimensionnelle constituée principalement d'un réseau complexe de macromolécules comme les **polysaccharides** (glycosaminoglycane et protéoglycane) et des **protéines fibreuses** de structure (collagène et élastine) ou d'adhérence (fibronectine et laminine) (Ganguly *et al.*, 2013) (**Figure 1.19**).

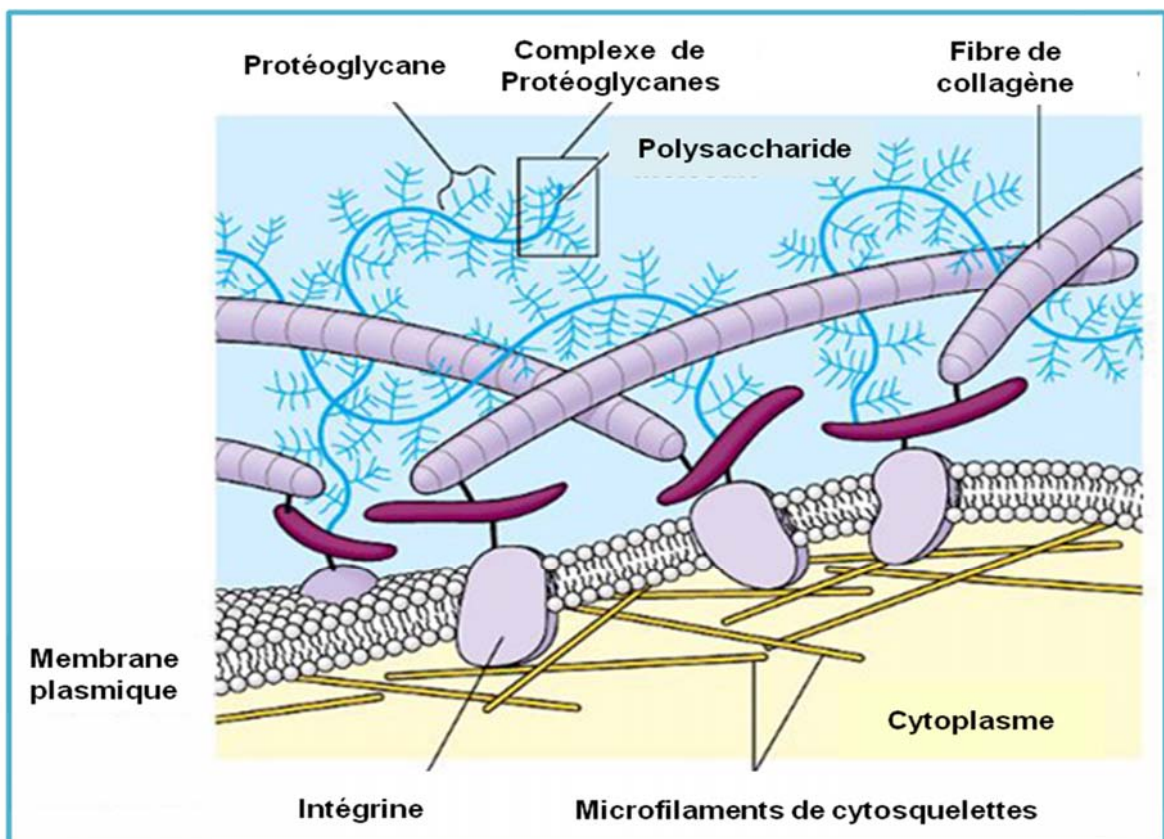


Figure 1.19. Les constituants de la matrice extracellulaire.

Les éléments de la MEC sont multiples et comportent des macromolécules formant un gel hydraté (acide hyaluronique, protéoglycane), des protéines fibrillaires (collagène) et des protéines structurales (laminine, fibronectine, etc.), capables d'interagir directement avec les cellules et de moduler de nombreuses fonctions biologiques. Ces protéines expriment des motifs tri-peptides RGD (principalement dans la fibronectine) qui sont des substrats ubiquitaires des récepteurs d'adhérence exprimés par les cellules.

1.1.3.8.2. Les molécules d'adhésion cellulaire : rôle des intégrines et cadhérines

Les molécules d'adhérence sont des protéines transmembranaires, qui assurent les jonctions cellule-matrice et cellule-cellule. Elles sont regroupées en superfamilles multigéniques codant pour des glycoprotéines transmembranaires classées selon leurs caractéristiques biochimiques et structurales en cinq grandes familles : les intégrines, les molécules d'adhérence de la superfamille des immunoglobulines (IgCAM), les cadhérines, les sélectines et les mucines.

Pour des raisons de concision, nous n'allons décrire que la famille des intégrines et des cadhérines.

1.1.3.8.2.1. Les intégrines

Les intégrines sont les récepteurs de surface cellulaire de diverses protéines de la matrice extracellulaire (telles que laminine, fibronectine, collagène et vitronectine) les plus prédominants et les mieux caractérisés (Ganguly *et al.*, 2013).

Sur le plan structural, les intégrines sont des hétérodimères composés de deux sous-unités, α et β , liées de manière non-covalente. Chaque sous-unité peut être subdivisée en trois domaines : un domaine extracellulaire, un transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Il existe au moins 18 sous-unités α et 8 sous-unités β . La combinaison spécifique des différentes sous-unités α et β donne la spécificité de l'intégrine pour son substrat. À ce jour, 24 α - β hétérodimères d'intégrines ont été identifiées (Alexander et Bendas, 2011) (**Figure 1.20**). Les intégrines sont classées en 4 groupes en fonction du type de ligand qu'elles reconnaissent. **Le 1^{er}** regroupe les récepteurs de type RGD (Arg-Gly-Asp), qui comprennent les intégrines possédant les sous-unités α IIb et α V ainsi que α 5 β 1 et α 8 β 1. **Le 2^{ème}** regroupe les récepteurs de collagène comprenant les intégrines possédant les sous-unités α 1, α 2, α 10 et α 11. **Le 3^{ème}** **groupe** classifie les récepteurs de laminine représentés par les sous-unités α 3, α 6 et α 7 et **le 4^{ème}** **groupe** qui contient les récepteurs leucocytaires, comptant les intégrines possédant la sous-unité β 2 (α L β 2, α M β 2, α X β 2, α D β 2), ainsi que les intégrines α E β 7, α 4 β 7, α 4 β 1 et α 9 β 1 (**Figure 1.20**).

Dans le mélanome, l'expression des intégrines α v β 3, α 5 β 1 et α v β 6 a été associée à la progression de la maladie et l'acquisition d'un caractère métastatique (Weis et Cheresh, 2011; Sutherland *et al.*, 2012).

Plusieurs études corrélant les niveaux d'expression des intégrines avec l'apparition de métastases et la survie des patients ont permis de mettre en évidence le rôle des intégrines $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha\beta6$, $\alpha5\beta1$, $\alpha6\beta4$, $\alpha6\beta1$ et $\alpha4\beta1$ dans la progression tumorale, l'angiogenèse et l'invasion dans différents cancers. Ainsi, ces intégrines constituent des cibles dans les thérapies anti-invasives et anti-angiogéniques (Desgrosellier et Cheresh., 2010 ; Weis et Cheresh, 2011).

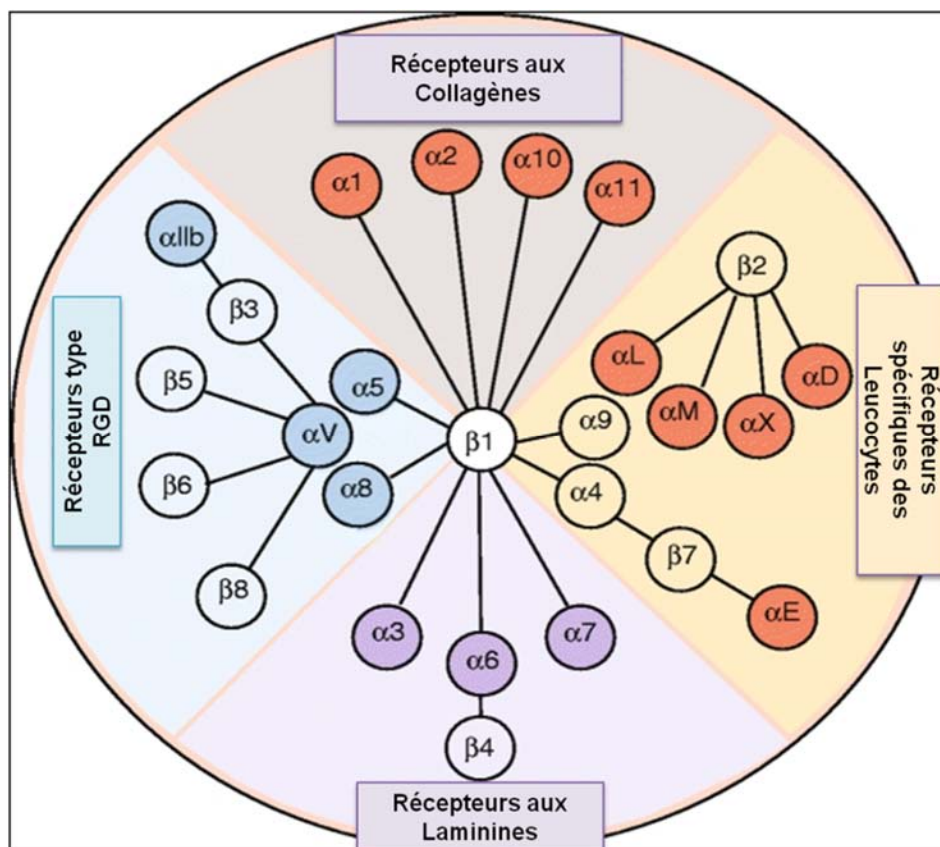


Figure 1.20. Représentation de la famille des intégrines (Barczyk et al., 2010).

La famille des intégrines est divisée en quatre sous-familles selon leur spécificité de reconnaissance : les récepteurs aux collagènes, les récepteurs spécifiques des leucocytes, les récepteurs aux laminines et les récepteurs type RGD.

1.1.3.8.2.2. Intégrines et signalisation cellulaire

Les intégrines jouent un rôle primordial dans de nombreux processus biologiques comme la régulation de la survie, la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'adhésion, la migration et l'invasion (Shishido et al., 2014) (**Figure 1.21**). Elles détectent les propriétés physiques de la matrice extracellulaire et organisent le cytosquelette en conséquence. Une fois activées, les intégrines

deviennent fonctionnelles et déclenchent des voies de signalisation directes et indirectes. La **signalisation intracellulaire indirecte** implique les intégrines formant des complexes avec les récepteurs à tyrosine kinase (RTK), qui interfèrent avec l'activation des RTK par leur ligand habituel (Streuli et Akhtar, 2009).

La **signalisation intracellulaire directe** implique l'activation des protéines kinases (comme FAK, SFK et ILK) par les intégrines. Ces protéines forment donc des complexes multi-protéiques avec plusieurs composants clés impliqués dans la dynamique du cytosquelette et les cascades de signalisation intracellulaires. Il s'ensuit alors l'activation de nombreuses voies (ERK (extracellular signal-regulated kinase), MAPK (Mitogen activated protein kinase), JNK et la voie NF- κ B)) en aval de ces complexes (Alexander et Bendas, 2011; Shishido *et al.*, 2014). Un exemple d'activation de la voie ERK / MAPK consiste à recruter directement le facteur de croissance lié au récepteur 2 (GRB2) et le complexe (SOS). Certaines intégrines, notamment $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ sont couplées à des SFK (kinases de la famille Src) par l'intermédiaire de leurs sous-unités α . Les SFKs phosphorylent plusieurs résidus tyrosine dans le domaine cytoplasmique $\beta 4$, ce qui provoque le recrutement de domaine SHC et l'activation des voies Ras-ERK / MAPK et PI3K. Les voies que les intégrines peuvent activer à travers les SFK sont suffisantes pour l'induction de la migration cellulaire, l'invasion et la prolifération ou pour conférer une certaine protection contre l'apoptose (Alexander et Bendas, 2011).

Il est bien établi qu'il existe une connexion entre les intégrines, les kinases de la famille Src et les GTPases de la famille Rho (Huveneers et Danen, 2009). Une interaction directe sélective entre le domaine SH3 de Src et le domaine cytoplasmique de l'intégrine- $\beta 3$ peut réguler la propagation cellulaire (Arias-Salgado *et al.*, 2005). L'engagement de l'intégrine $\alpha 11\beta 3$ ou de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ favorise la libération de Src tyrosine kinase (Csk) à partir du résidu inhibiteur tyrosine 530 de Src qui pourrait être déclenchée par le recrutement de la protéine tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B). Ceci est suivi par la phosphorylation du résidu tyrosine 419 dans la boucle d'activation du domaine Src kinase en raison d'une hyperphosphorylation qui est déclenchée par le regroupement d'intégrines (Arias-Salgado *et al.*, 2003). La régulation des Rho-GTPases par les intégrines se fait suite à la formation d'un complexe actif FAK-Src et le recrutement (direct) de Src sur la queue cytoplasmique de la $\beta 3$ -intégrine (Huveneers et Danen, 2009).

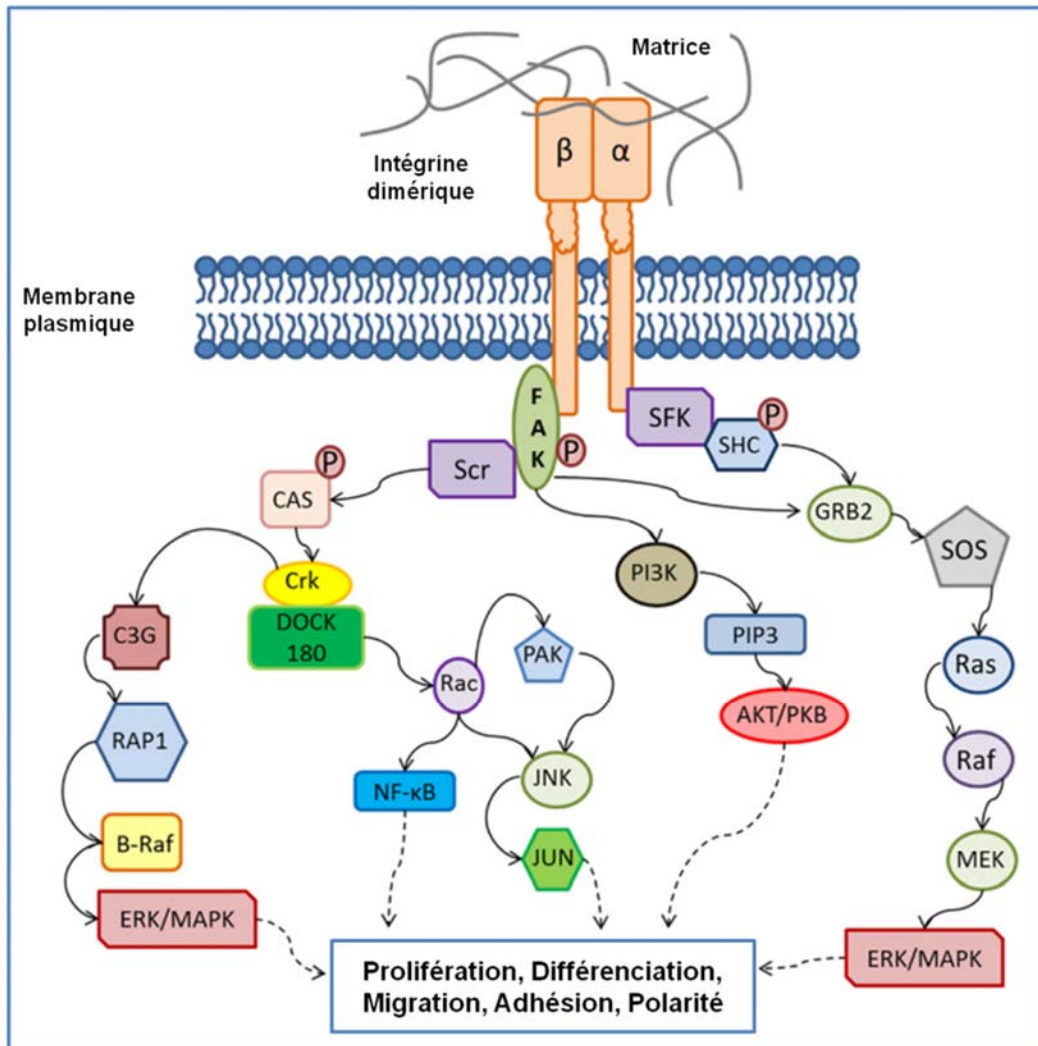


Figure 1.21. Intégrines et voies de signalisation intracellulaires (Shishido et al., 2014).

Le recrutement et l'activation des kinases de la famille Src (SFK) vont permettre de recruter FAK à travers la sous-unité bêta. Après son activation, FAK phosphorylée libère plusieurs sites de fixation pour des protéines contenant des domaines SH2. Ces sites vont permettre le recrutement successif de protéines du complexe. Dans un second temps, les différentes protéines vont subir à leur tour une activation impliquant des voies régulatrices intracellulaires importantes comme ERK/MAPK, PI3-kinase, JNK, NFκB et des réarrangements du cytosquelette.

Dans le mélanome, plusieurs protéines telles que Rho A, membre de la famille des Rho GTPases, et la kinase Src ont été associées à un phénotype plus invasif et métastatique (Sun et al., 2015 ; Espinha et al., 2016). L'intégrine $\alpha\beta_3$ est un puissant activateur de Src (Arias-Salgado et al., 2003 ; Putnam et al., 2009) qui à son tour joue un rôle essentiel dans la migration du mélanome (Qi et al., 2005) et active Rho indépendamment du mouvement des cellules de

mélanome (Ahn *et al.*, 2012). De même, l'intégrine $\alpha\beta3$ peut favoriser l'EMT par la dégradation de la E-cadhérine et l'activation des cascades de signalisation intracellulaires (Avizienyte *et al.*, 2002).

1.1.3.8.2.3. Les Cadhérines

Les cadhérines sont une famille de protéines transmembranaires impliquées dans l'interaction homotypique cellule – cellule. Elles sont présentes sous une trentaine de formes exprimées de manière variable suivant les tissus. Dans cette super-famille, on distingue plusieurs sous-groupes: les cadhérines classiques de type I; la E-cadhérine pour les cellules épithéliales, la N-cadhérine principalement dans les cellules nerveuses, la P-cadhérine placentaire et la VE-cadhérine dans l'endothélium vasculaire, les cadhérines desmosomales (desmoglérine et desmocolline), les proto-cadhérines et des cadhérines atypiques (notamment la T-cadhérine dans cellules nerveuses et musculaires) (Hulpiau et van Roy, 2009).

En présence du calcium, la partie extracellulaire d'une cadhérine interagit avec la partie extracellulaire d'une autre cadhérine sur la cellule voisine. La partie cytoplasmique permet de lier le cytosquelette d'actine par l'intermédiaire des caténines.

Dans de nombreux cancers agressifs (Berx et van Roy, 2009), l'expression ou la fonction de la E-Cadhérine est dérégulée à cause de mutations, des altérations des partenaires intra-cytoplasmiques (caténines ou microtubules) et ou la méthylation du promoteur. Ainsi, le rôle des cadhérines et leur impact sur plusieurs étapes de la progression tumorale tels que la migration, l'invasion et la transition épithélio-mésenchymateuse sont largement connus (Ratnayke *et al.*, 2017).

1.1.3.8.2.4. La transition épithélio-mésenchymateuse

La transition d'un phénotype épithélial vers un phénotype mésenchymateux (EMT) est un processus caractérisé par une perte d'adhésion des cellules, un remodelage du cytosquelette et une augmentation de la motilité cellulaire. Elle est considérée comme la première étape nécessaire pour l'invasion tumorale et la métastase (Kreizenbeck *et al.*, 2008). L'EMT peut être induite *in vitro* avec TGF- β , TNF- α , ou d'autres cytokines dans des cellules de carcinome (Mani *et al.*, 2008). Cette transition est associée à une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine et à une diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux tels que les intégrines et l'E-cadhérine (Gaggioli et Sahai, 2007 ; Ratnayake *et al.*, 2017).

L'E-cadhérine est une glycoprotéine transmembranaire localisée dans les jonctions d'adhérence assurant les interactions cellule-cellule à travers un homotypique dépendant du calcium (Ruiten et Muijen, 1998). L'E-cadhérine est une protéine qui joue un rôle primordial dans les interactions entre les mélanocytes et kératinocytes. Dans des conditions normales, l'E-cadhérine est exprimée sur la surface cellulaire des kératinocytes et mélanocytes. En plus de son rôle dans l'interaction cellule-cellule, l'E-cadhérine supprime également l'invasivité des tumeurs épithéliales et les métastases (Bracke *et al.*, 1996). La perte des marqueurs de cellules épithéliales tels que la E-cadhérine a été associée à un potentiel métastatique et à un mauvais pronostic de plusieurs carcinomes (Lee *et al.*, 2008). Ainsi, la perte de son expression peut également réguler négativement les gènes impliqués dans la croissance et les métastases en affectant les voies de signalisation β -caténine / wnt (McGary *et al.*, 2002).

1.1.3.9. Angiogenèse

Lors des processus physiologiques normaux, l'angiogenèse, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des préexistantes, est finement régulée par une balance de signaux pro-angiogéniques et anti-angiogéniques (Ravaud, 2007). Ces signaux, orchestrés par une variété de molécules activatrices et inhibitrices maintenues en équilibre, permettent la maturation et la stabilisation rapide de nouveaux vaisseaux sanguins. La rupture de cet équilibre ou « switch angiogénique » est reconnue pour causer des désordres pathologiques. Une balance en faveur d'une angiogenèse soutenue entraîne la vascularisation de la tumeur (Wong *et al.*, 2009). Dans un premier stade, ces vaisseaux fournissent l'oxygène et les nutriments nécessaires à la croissance et la progression tumorale. En fait, la cellule tumorale ne peut pas se développer si elle n'est pas vascularisée. À un stade ultérieur, l'angiogenèse constitue une étape importante vers la métastase. Les cellules cancéreuses qui se détachent de leur site principal utilisent les nouveaux vaisseaux pour atteindre et coloniser de nouveaux sites (Wang *et al.*, 2015). L'angiogenèse tumorale est contrôlée par une variété de facteurs angiogéniques. Le facteur de croissance dominant contrôlant l'angiogenèse est le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (Neufeld *et al.*, 1994). Le VEGF produit par divers types de cellules comprend six protéines différentes : le facteur de croissance placentaire, le VEGF-A, le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D et le VEGF (VEGF-E) (Rajabi *et al.*, 2012). Le mélanome malin a été bien documenté comme une tumeur angiogénique, démontrant clairement la formation de nouveaux vaisseaux comme une étape importante dans la progression de la maladie des mélanocytes atypiques, par la phase de la croissance radiale vers la phase de croissance verticale agressive (Hanahan et Folkman, 1996). Une étude

réalisée par Rajabi *et al.*, 2012, a démontré que l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est en corrélation avec la progression tumorale du mélanome (Rajabi *et al.*, 2012).

1.1.3.10. Diagnostic du mélanome

La détection d'un mélanome dans les premiers stades de l'évolution biologique et son ablation chirurgicale rapide sont essentiels à la survie des patients.

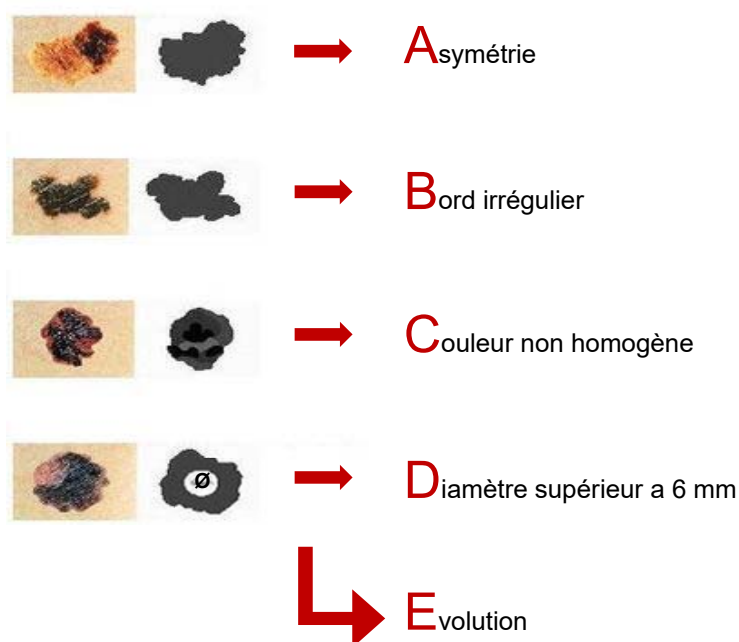


Figure 1.22. Règle ABCDE pour le diagnostic du mélanome malin cutané.

Il existe deux façons de réduire la morbidité et la mortalité du mélanome : la première est d'identifier et d'éliminer les facteurs de risque multiples (génétiques, environnementaux, immunologiques, viraux, d'autres agents cancérogènes, etc). Malgré les efforts, pour limiter l'exposition au rayonnement UV dans la recherche fondamentale et clinique, peu de progrès ont été réalisés dans le domaine pratique. La plupart des mélanomes précoces peuvent être identifiés en utilisant la règle ABCDE (Friedman *et al.*, 1985) (**Figure 1.22**) en se basant sur la marge du diamètre de la lésion actuelle et son changement en fonction du temps. Cette règle a joué un rôle clé dans le diagnostic. Ainsi, les mélanomes précoces sont asymétriques, avec des contours irréguliers et une variabilité de couleurs. Le diamètre est généralement ≥ 6 mm et son évolution varie avec le temps. Il est important de se rappeler que l'origine de tous les mélanomes est microscopique. De ce fait, il existe une phase d'évolution initiale du mélanome

dans laquelle un ou plusieurs critères d'ABCDE peuvent être absents (D est la phase la plus absente). Alors que la plupart des lésions plus avancées peuvent être diagnostiquées en utilisant la règle ABCDE, il existe des exceptions pour les mélanomes dits nodulaires (croissance verticale), les mélanomes amélanotiques et pour d'autres mélanomes plus petits.

Actuellement de nouvelles techniques de diagnostic de mélanome sont utilisées comme :

- 1- La Dermoscopie, la microscopie de la superficie cutanée et la microscopie épiluminescence** : Technique *in vivo* non invasive qui permet une extension de la peau en rendant visible la couleur et la structure de l'épiderme, la jonction dermo-épidermique et le derme papillaire. Il a été démontré que cette technique permet d'améliorer de manière significative le diagnostic clinique des lésions bénignes et malignes cutanées mélanocytaires et donc du mélanome.
- 2- Le Diagnostic Assisté par ordinateur** : avec des logiciels qui évaluent de façon objective les lésions cutanées pigmentées.
- 3- La Microscopie confocale** : offre des avantages importants par rapport à l'étude histologique traditionnelle parce que c'est une technique indolore et le tissu est non altéré au cours du traitement. Les données sont recueillies directement de sorte que se soit plus rapide et la même zone de la peau peut être examinée de façon répétée afin d'évaluer les changements dynamiques comme la réponse au traitement.

1.1.3.11. Le traitement du mélanome

Le traitement du cancer comprend actuellement plusieurs stratégies thérapeutiques telles que la chirurgie, la radiothérapie, la thérapie biologique et la chimiothérapie. La chirurgie, combinée à la radiothérapie ou à la chimiothérapie, peut être curative avec un pourcentage élevé quand les patients sont dans les premiers stades de la maladie. Cependant, dans les stades avancés, lorsque les métastases se sont développées, les chances de survie sont faibles et la chimiothérapie est le seul traitement adéquat. L'augmentation de l'incidence du mélanome et son mauvais pronostic dans les stades avancés a poussé les recherches vers de nouvelles voies de traitement telles que la thérapie biologique et l'immuno-chimiothérapie, qui combine la chimiothérapie avec l'utilisation des agents ciblant le système immunitaire.

a. La chirurgie

L'ablation de la tumeur est le traitement utilisé pour tous les stades de mélanome. Le traitement du mélanome par des méthodes chirurgicales implique souvent un diagnostic histologique pour

diriger l'action thérapeutique et l'éradication complète de la tumeur. En général, le diagnostic histologique doit être effectué avant le traitement chirurgical définitif de la lésion. Afin de confirmer le diagnostic, les biopsies peuvent être effectuées par exérèse ou incision. En outre, l'étude histopathologique permet d'évaluer la profondeur de la lésion et d'autres facteurs pertinents qui sont essentiels pour le traitement ultérieur du patient. Enfin, l'exérèse a l'avantage d'éliminer complètement la tumeur primaire. Dans certains cas, la taille ou la localisation anatomique d'une lésion peut rendre son élimination complète, difficile, voire impossible. Dans ces cas, il est préférable de réaliser une biopsie par incision dans laquelle une partie de la lésion est éliminée. Dans le cas de lésions mélanocytaires, il faut veiller à ce que l'échantillon comprend la partie de la lésion la plus susceptible de fournir un diagnostic précis (la zone la plus sombre ou saillie).

b. La radiothérapie

La radiothérapie est un traitement du cancer qui utilise des rayons X à haute énergie ou d'autres types de rayonnement pour tuer les cellules cancéreuses ou les empêcher de croître. Il existe deux types de radiothérapie : la radiothérapie externe se fait à l'aide d'une machine externe pour envoyer un rayonnement vers la zone où existe la tumeur et la radiothérapie interne nécessite une substance radioactive. La façon dont la radiothérapie est réalisée dépend du type et du stade de cancer à traiter. Aujourd'hui, la radiothérapie est utilisée beaucoup moins pour le traitement des cancers de la peau par rapport aux années précédentes. Il y a une différence de la manière dont certains mélanomes répondent à la radiothérapie par rapport à d'autres types de tumeurs malignes. Contrairement à beaucoup d'autres tumeurs de la peau, le mélanome malin est peu sensible aux radiations.

c. La thérapie biologique

La thérapie biologique est un traitement qui stimule la capacité du système immunitaire à lutter contre le cancer afin de renforcer, diriger ou restaurer les défenses naturelles de l'organisme contre la maladie. Certains vaccins sont utilisés dans le traitement du mélanome. Il s'agit d'une option attrayante, car ils permettent une destruction sélective et sûre des cellules de mélanome et c'est la raison pour laquelle, aujourd'hui, le développement de ces vaccins se concentre en grande partie sur l'effort consenti par la communauté scientifique et l'industrie pharmaceutique. Il existe plusieurs arguments en faveur d'une progression du mélanome conditionnée par des facteurs immunologiques (Bystryń., 1995). Lorsque ces facteurs sont stimulés par des vaccins, ceci peut augmenter la résistance à ce type de cancer. Ces mécanismes de défense sont

spontanés et très sélectifs car ils détruisent les cellules de mélanome sans affecter les mélanocytes normaux adjacents. La sélectivité de ce procédé conduit à un processus immunologique, où seulement le système immunitaire est capable de reconnaître la différence entre les cellules normales et malignes. Une autre observation a été constatée à partir des études réalisées sur des souris où des cellules murines de mélanome B16-F10 ont été injectées. La majorité des souris pré-immunisées avec des vaccins ont survécu à l'injection d'une dose létale de cellules de mélanome alors que les animaux non vaccinés sont décédés (Oratz et *al.*, 1989). Dans ce cas, la protection est spécifique pour le mélanome, puisque les souris vaccinées contre le mélanome n'étaient pas protégées contre d'autres tumeurs indiquant que les mécanismes de protection étaient de nature immunologique. Les réponses immunitaires induites par les antigènes tumoraux sont faibles et souvent de courte durée. De ce fait, les traitements adjuvants sont un élément essentiel pour ces vaccins afin d'augmenter leur capacité à générer de fortes réponses immunitaires.

d. La chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement du cancer qui utilise des médicaments afin d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses, soit en les éliminant, ou en évitant leurs multiplications. Lorsque la chimiothérapie est administrée par voie orale ou par injection dans une veine ou un muscle, les médicaments entrent dans la circulation sanguine et affectent les cellules cancéreuses dans tout le corps (chimiothérapie systémique).

Lorsque la chimiothérapie est utilisée directement sur une partie spécifique du corps, les médicaments affectent principalement les cellules cancéreuses dans ces zones (chimiothérapie régionale). La façon dont la chimiothérapie est administrée dépend du type et de l'étendue de la tumeur qui est traitée. Malheureusement, la chimiothérapie n'a pas prouvé son efficacité dans le traitement du mélanome et elle est habituellement utilisée comme adjuvant après la chirurgie afin d'éliminer toutes les cellules cancéreuses résiduelles ou comme traitement chez les patients présentant des métastases généralisées où le pronostic est sombre. Les agents utilisés en mono-chimiothérapie ou en combinaison pour le traitement du mélanome sont:

- **Dacarbazine** ou **DETICENE** : un antinéoplasique cytostatique, analogue structural de l' amino-5 imidazole-4 carboxamide. Son effet est dû à une inhibition de la croissance cellulaire indépendante du cycle cellulaire et à une inhibition de la synthèse de l'ADN ..). De plus, il est le seul médicament approuvé pour le traitement de la phase IV du

mélanome métastatique. Bien qu'il soit le meilleur traitement disponible et standard, il ne produit qu'environ 20% de réponse chez des patients en augmentant la survie globale, de six mois. Il est utilisé seul ou en combinaison avec d'autres médicaments.

- **Témzolomide** ou **TEMODAL** : est un dérivé triazène, qui subit une conversion chimique rapide à pH physiologique en monométhyl triazénoïmidazole carboxamide (MTIC) actif. La cytotoxicité du MTIC est vraisemblablement due principalement à une alkylation de la guanine en position O6, et à une alkylation supplémentaire en position N7. Les lésions cytotoxiques qui sont développées par la suite sont supposées entraîner une réparation aberrante de l'ADN (acide désoxyribonucléique) méthylé. C'est un médicament utilisé pour le traitement du cancer du cerveau et le mélanome générant des métastases dans le cerveau ou le système nerveux. Il a le même effet que la dacarbazine mais son administration se fait par voie orale, ce qui facilite le traitement.
- **Carmustine** : est un autre agent alkylant qui tue les cellules qui se divisent rapidement. Il est utilisé pour traiter divers cancers provoquant des métastases cérébrales, y compris le mélanome.
- **Fotémustine** ou **MUPHORAN** : empêche la croissance des cellules cancéreuses. C'est un autre agent alkylant qui a été testé chez des patients atteints d'un mélanome malin disséminé ou une tumeur maligne cérébrale primitive. Les effets secondaires de la Fotémustine étaient plus fréquents qu'avec la Dacarbazine.
- **Vindésine** : C'est un alcaloïde dérivé de la pervenche (*Catharanthus roseus*). Ce médicament tue les cellules qui se divisent en détruisant les microtubules pendant la division cellulaire. Bien que, ce fut une découverte prometteuse, un essai clinique en 2008 a montré qu'il a généré des effets secondaires graves chez des patients.
- **Vincristine** : est un autre alcaloïde, dérivé de la pervenche, qui inhibe la division cellulaire. Il est fréquemment utilisé en combinaison avec d'autres médicaments, tels que les CVD (cisplatine, vincristine et dacarbazine).
- **Bléomycine** : est un mélange d'antibiotiques utilisés en combinaison avec d'autres médicaments car il possède des propriétés antibiotiques et anti-tumorales.
- **Paclitaxel** : c'est un dérivé naturel de l'arbre (*Taxus brevifolia*) qui inhibe la prolifération cellulaire en agissant sur les microtubules. Ce médicament est utilisé en combinaison avec d'autres composés.
- **Cisplatine** : est un antinéoplasique cytostatique. Son mécanisme d'action est similaire à celui des alkylants. Il cible les cellules se divisant rapidement. Le cisplatine se lie avec

l'ADN (acide désoxyribonucléique) dont il inhibe la synthèse des ponts inter et intracaténaux. L'inhibition des synthèses de l'ARN (acide ribonucléique) et des protéines cellulaires n'intervient que secondairement.

Il est l'un des médicaments les plus couramment utilisés dans le traitement du cancer. Cependant, ce médicament n'est cliniquement bénéfique pour les patients atteints d'un mélanome que lorsqu'il est utilisé en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques (CVD) ou après une thérapie ciblée (Hsan *et al.*, 2010 ; Flaherty *et al.*, 2014 ; Megahed *et al.*, 2014).

Les agents chimiothérapeutiques ne parviennent généralement pas à éliminer efficacement les cellules de mélanome. Des réponses cliniques sont obtenues dans 15% des cas avec une augmentation de l'espérance de vie entre 6 et 8 mois (Barrio, 2009). Ces limites de l'efficacité des traitements administrés sont dues à un manque de réponse primaire à la drogue ou le développement d'une résistance acquise par la tumeur aux médicaments. L'identification des gènes spécifiques impliqués dans le processus indique qu'il existe trois principaux mécanismes de résistance aux traitements :

- ❖ Une diminution de l'absorption des médicaments tels que le cisplatine, des analogues de nucléosides et des antagonistes du métabolisme du folate en raison de modifications au niveau des transporteurs.
- ❖ Des altérations dans les mécanismes moléculaires et cellulaires provoquent l'incapacité du médicament à tuer la cellule tumorale, comme par exemple des défauts dans les voies apoptotiques.
- ❖ Une augmentation du débit actif des médicaments hydrophobes qui pénètrent dans la cellule par diffusion passive (La Porta, 2007).

e. La chimioprévention

En plus de la chimiothérapie pour le traitement du cancer, il peut y avoir aussi recours à la chimioprévention qui consiste à administrer certains produits chimiques, naturels ou synthétiques préventifs. Il y a trois façons de chimioprévention contre le mélanome : 1/ chimioprévention primaire, ce qui empêche l'apparition du mélanome chez les individus en bonne santé. 2/ chimioprévention secondaire, ce qui empêche la conversion des précurseurs pré-malins dans le mélanome malin et enfin 3/ la chimioprévention tertiaire pour le traitement

des mélanomes chez les personnes sans signes de maladie. Idéalement, le médicament n'est pas très cher, facile à administrer et induit des effets secondaires minimales.

Différents groupes d'agents chimiopréventifs sont utilisés pour la prévention et le traitement du mélanome :

- **Les écrans solaires** : Bien que de nombreuses études ont montré un risque réduit de mélanome chez les utilisateurs d'écrans solaires (Bakos *et al.*, 2002 ; Espinosa *et al.*, 1999 ; Moloney *et al.*, 2002), d'autres n'ont pas validé de lien direct et au contraire ils ont montré que l'utilisation de ces crèmes peut augmenter le risque de développer un mélanome (Dennis *et al.*, 2003 ; Westerdahl *et al.*, 1995). Ces écarts peuvent être expliqués par les difficultés méthodologiques liées au contrôle de la sensibilité à l'exposition au soleil, le type et l'utilisation appropriée de la crème solaire. La plupart des écrans solaires protègent contre les longueurs d'ondes UVA et UVB, de sorte que les études ne sont pas capables de faire la distinction entre les deux radiations. Des études ont démontré que l'application des crèmes solaires de forme régulière empêche la formation de dimères de thymine dans l'ADN et ceci ne se produit pas dans le cas de l'application irrégulière des crèmes solaires (Al Mahroos *et al.*, 2002). Une autre hypothèse a suggéré que la vitamine D synthétisée en réponse à l'exposition aux UV peut provoquer le cancer. L'utilisation appropriée des crèmes solaires de protection bloque les rayons UV mutagènes et prévient les brûlures. Ces deux facteurs sont très importants et peuvent être associés au risque de développer un mélanome (Gandini *et al.*, 2005 ; Gilchrest *et al.*, 1999).
- **Antilipidémique**: Les cellules cancéreuses et non-tumorales métabolisent différemment le cholestérol (Versluis *et al.*, 1996). Ainsi, la modification du métabolisme du cholestérol peut inhiber la carcinogenèse ou inhiber sélectivement la croissance des cellules tumorales (Lenz *et al.*, 1997 ; Kuzu *et al.*, 2016) Les inhibiteurs de 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase ou les statines ont été proposés comme étant des composés qui diminuent l'incidence du mélanome et renforcent l'efficacité de ce traitement. Il a été démontré que les statines inhibent la prolifération et l'invasion cellulaire et bloquent la modification des protéines isoprénoïdes nécessaires pour la signalisation cellulaire (Collisson *et al.*, 2002) et induisent l'apoptose des cellules de mélanome par un mécanisme spécifique (Jani *et al.*, 1993) associé à une inhibition de

l'activation des protéines importantes pour la régulation du cycle cellulaire (Demierre *et al.*, 2005).

- **Nutriments** : De nombreux nutriments ont été proposés et étudiés pour la chimioprévention du mélanome, y compris le (-) -épigallocatechine-3-gallate (EGCG), les vitamines E et D, la β -carotène, le lycopène, les flavonoïdes, le resveratrol, le sélénium ou le ginseng. Beaucoup d'entre eux fonctionnent comme des antioxydants de radicaux libres qui peuvent endommager l'ADN et causer le cancer. De nombreux antioxydants peuvent avoir des propriétés photoprotectrices. Le thé est l'un des antioxydants les mieux étudiés en tant qu'un chimiothérapeutique contre le cancer de la peau. Le thé contient l'EGCG, ce qui minimise les dommages causés par le rayonnement UV à travers des effets anti-inflammatoires et anti-prolifératifs (Hsu, 2005). En outre, ce composé du thé a provoqué un arrêt du cycle *cellulaire* et a induit l'apoptose des cellules de mélanome via la modulation des cyclines et la famille des protéines Bcl-2 (Nihal *et al.*, 2005). Des études *in vivo* ont démontré que l'administration orale de l'EGCG à des souris injectées par des cellules murines B16-F10 a diminué à la fois la progression du mélanome et les métastases résultantes (Taniguchi *et al.*, 1992). Son faible coût, l'absence de toxicité et l'administration facile de l'EGCG ont fait qu'il a été considéré comme un potentiel agent thérapeutique contre le mélanome.
- **Médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)** : La majorité de ces médicaments inhibent les enzymes cyclooxygénases (COX), ce qui empêche la synthèse de prostaglandines et d'autres molécules pro-inflammatoires qui stimulent la croissance et jouent un rôle dans la promotion du cancer de la peau (Fischer *et al.*, 1999). La voie COX pourrait être impliquée spécifiquement dans la progression tumorale du mélanome donnant un rôle important aux AINS dans la chimioprévention *du mélanome* (Denkert *et al.*, 2001 ; Harris *et al.*, 2005). Plusieurs études ont associé une faible incidence du mélanome chez des femmes utilisant ces médicaments (Harris *et al.*, 2001) *et* des patients consommant des inhibiteurs de la COX (Ramirez *et al.*, 2001). Malgré que ces composés semblent prometteurs pour le mélanome, aujourd'hui il n'y a pas de preuves suffisantes pour les inclure dans le traitement même si beaucoup d'efforts ont été déployés dans ce sens en raison de leur relative faible toxicité et leur utilisation possible en synergie avec d'autres médicaments (Wilgus *et al.*, 2003).

Malgré le développement de plusieurs applications thérapeutiques pour le mélanome, ces traitements ont des limites et présentent deux problèmes majeurs : le développement d'une résistance tumorale à la thérapie et la toxicité non spécifique vers les tissus normaux (Zhang et al., 2008). Pour cette raison, le recours à d'autres stratégies thérapeutiques moins toxiques pour pallier à cette résistance et pour augmenter l'efficacité des traitements conventionnels représente une priorité et un enjeu de taille en cancérologie.

La nature et plus spécifiquement la faune est une source riche en principes actifs à effets bénéfiques pour plusieurs types de cancer (Zhou et al., 2016). Une grande partie de cette faune demeure peu exploitée que ce soit d'un point de vue chimique ou biologique.

Les animaux venimeux sont parmi les organismes à produire des composés pharmacologiquement intéressants.

1.2. LES SERPENTS ET LEURS VENINS COMME SOURCE DE BIOMOLECULES THERAPEUTIQUES

Les serpents appartenant au groupe des ophidiens sont des reptiles au corps très allongé, le plus souvent cylindrique et dépourvu de membres apparents. Les morsures de serpents, constituent un problème majeur de santé publique dans les pays en voie de développement, comme l'Afrique et sont à l'origine d'une très forte mortalité (Shimi et al., 2011). En Tunisie, des espèces telles que *Cerastes Cerastes*, *Cerastes Vipera* et *Macrovipera Lebetina* sont considérées comme les plus dangereuses et les plus venimeuses. Elles sont réparties géographiquement en grande partie dans les zones sub-humides et semi-arides de la région du nord de la Tunisie et les régions arides et sahariennes dans le sud de la Tunisie (Bazaa et al., 2005). ***Macrovipera lebetina*** (Figure 1.23) est parmi les vipères les plus répandues et les plus venimeuses de la Tunisie.



Figure 1.23. *Macrovipera lebetina*

1.2.1. LES CONSTITUANTS DES VENINS DE SERPENTS

Les venins de serpents sont constitués de mélanges complexes de molécules biologiques telles que les enzymes et les toxines qui sont des protéines de petites tailles dont la principale fonction est de participer à l'immobilisation et/ou à la digestion de la proie. De plus, les venins de serpents peuvent provoquer, après une morsure chez les victimes, une coagulation ou une anti-coagulation, des œdèmes, de la nécrose. Une salivation intense peut provoquer un étouffement, une baisse de la tension du cœur, des altérations des cellules et une paralysie respiratoire ou paralysie du membre mordu.

Certaines toxines du venin de serpents ont la capacité de provoquer une toxicité due à leur forte spécificité et affinité pour les cellules et les tissus. En dépit de leurs effets toxicologiques, plusieurs peptides et protéines isolés à partir des venins de serpents sont utilisés en tant qu'agents pharmaceutiques (Waheed *et al.*, 2017). En effet, de nombreuses protéines isolées des venins de serpents ont été validées dans des applications thérapeutiques et dans le traitement de nombreuses maladies telles que la thrombose, l'hypertension, et/ou le cancer. Plusieurs de ces molécules ont été caractérisées par leur pouvoir anti-angiogénique et leur activité en tant qu'anti-agrégant plaquettaire et anti-métastatique (Doley *et* Kini, 2009; Vyas *et al.*, 2013). En Tunisie, différentes protéines purifiées à partir des venins de serpents Tunisiens, ont été caractérisées par leurs applications thérapeutiques et leurs activités pharmacologiques bénéfiques dans plusieurs pathologies. Ces protéines appartiennent à différentes familles telles que : les L- amino acide oxydases (Abdelkafi-Koubaa *et al.*, 2014), des phospholipases A2 (Bazaa *et al.*, 2010 ; Kessentini-Zouari *et al.*, 2010), des protéases à sérine (Morjen *et al.*, 2014), des désintégrines (Ben-Mabrouk *et al.*, 2016 ; Limam *et al.*, 2010 ; Olfa *et al.*, 2005) et des lectines de type C (Sarray *et al.*, 2003, 2004, 2007 ; Pilorget *et al.*, 2007 ; Jebali *et al.*, 2014 ; Montassar *et al.*, 2017).

La majorité des protéines originaires de ces familles ont été validées pour leur effet inhibiteur de la prolifération, l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaires via certaines molécules d'adhésion, les intégrines (Sarray *et al.*, 2003, 2004, 2007 ; Olfa *et al.*, 2005 ; Bazaa *et al.*, 2005, 2010 ; Pilorget *et al.*, 2007 ; Kessentini-Zouari *et al.*, 2010 ; Jebali *et al.*, 2014 ; Morjen *et al.*, 2014 ; Abdelkafi-Koubaa *et al.*, 2014 ; Zakraoui *et al.*, 2016).

Nous n'aborderons dans cette synthèse bibliographique que la famille des désintégrines et des lectines de type C comme source de molécules bioactives d'intérêt pharmacologique.

1.2.1.1. Les désintégrines

Les désintégrines sont des polypeptides de faible poids moléculaire (5-10 kDa) identifiés à partir des venins des Vipéridés, des Elapidés, des Atractaspididés et des Colubridés et (Calvete, 2005 ; Calvete *et al.*, 2005 ; McLane *et al.*, 2004). Ces polypeptides, non toxiques et non enzymatiques, contiennent une séquence RGD (Arg-Gly-Asp), KGD (Lys-Gly-Asp) ou autres leur permettant de se lier spécifiquement à leurs cibles (intégrines ou autres). Selon leur structure et leur fonction, les désintégrines peuvent être classées en différentes sous familles (Marcinkiewicz, 2005). Au niveau structural, les désintégrines peuvent être subdivisés en monomères et dimères de formes homodimériques et hétérodimériques. Les désintégrines monomériques sont classées en fonction de la longueur de leur chaîne polypeptidique et le nombre de cystéines, courtes avec 8 cystéines, moyennes avec 12 cystéines et longues contenant 14 cystéines. Pour les désintégrines dimériques, chaque sous-unité contient 10 cystéines (Ifigeneia *et al.*, 2015).

1.2.1.1.1 Classification et diversité des désintégrines

La classification fonctionnelle des désintégrines dérivant des venins de vipères a été basée sur la présence d'un motif tripeptidique localisé dans le site actif. Plusieurs groupes fonctionnels des désintégrines exprimant des séquences RGD, WGD, KGD, MLD ou KTS, RTS... peuvent être distingués (Marcinkiewicz, 2013). D'autres caractéristiques structurales sont aussi importantes dans l'affinité et la sélectivité de cette famille de molécules telles que la région C-terminale (Marcinkiewicz *et al.*, 1997). La majorité de ces désintégrines renferment la séquence Arg-Gly-Asp (RGD) à la position conservée mais celle-ci peut être altérée ce qui modifie l'affinité et la spécificité de ces molécules antagonistes des intégrines. Cette inhibition est régie par l'appariement approprié des cystéines déterminant la conformation de la boucle inhibitrice des désintégrines.

Sur le plan phylogénétique, la diversité des désintégrines serait due à une évolution accélérée des résidus exposés à la surface à partir d'un motif de reconnaissance ancestral, le RGD. D'autres désintégrines se caractérisaient par des substitutions d'une seule base pour générer d'autres motifs de liaison tels que KGD, MGD, WGD et VGD... etc. Les désintégrines renfermant le motif RGD se caractérisent par une différence d'affinité et de sélectivité avec les intégrines reconnaissant cette séquence RGD au niveau de leurs ligands telles que, l'intégrine $\alpha\beta 3$ (récepteur de la vitronectine), l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (récepteur de la fibronectine), et l'intégrine $\alpha 11\beta 3$ (récepteur du fibrinogène). Les désintégrines contenant la séquence MLD sont

hétérodimériques et se lient aux intégrines $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ et $\alpha 9\beta 1$. La présence d'un autre motif (comme RGD) dans la seconde sous-unité détermine leur activité par rapport aux autres intégrines. Les désintégrines renfermant le motif KTS, sur le plan structural, sont de courtes molécules monomériques agissant de manière spécifique à travers l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ comme récepteur spécifique du collagène de type IV (Kallech-Ziri *et al.*, 2007). La **Figure 1.24** ci-dessous illustre un diagramme de la famille des intégrines et les différents motifs des tripeptides identifiés dans les désintégrines bloquant les interactions spécifiques intégrine-ligand (Arruda *et al.*, 2015).

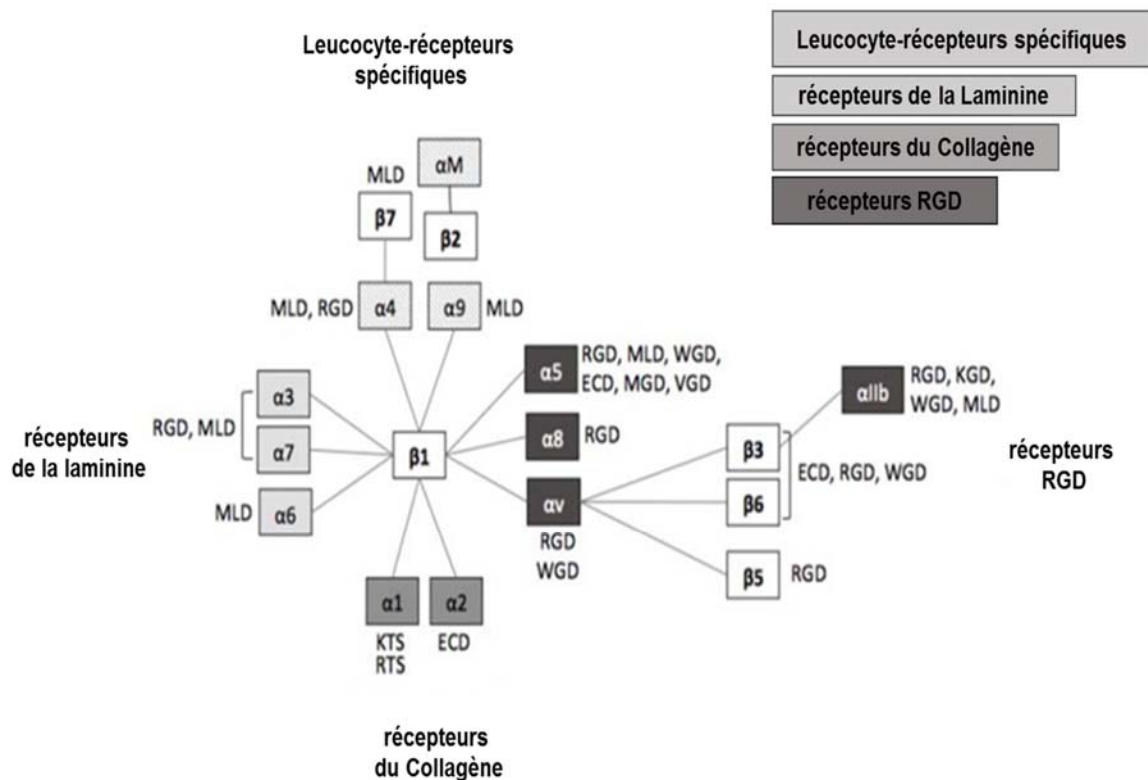


Figure 1.24. Diagramme de la famille des intégrines et les différents motifs inhibiteurs correspondants identifiés dans les désintégrines (Arruda *et al.*, 2015). Ce schéma montrant les motifs présents sur les désintégrines, qui une fois reconnus par les intégrines, ils bloquent spécifiquement la liaison à leurs ligands. (R : arginine ; G : glycine ; D : acide aspartique ; V : valine ; M : méthionine ; L : leucine ; W : tryptophane ; K : lysine ; T : thréonine ; S : sérine).

1.2.1.1.2 Implication thérapeutique des désintégrines dans le cancer

Plusieurs désintégrines via leurs interactions avec différentes intégrines ont été validées pour leurs activités anti-tumorales sur des étapes clés de la progression tumorale (Marcinkiewicz, 2013, Arruda *et al.*, 2015). Le blocage des intégrines dans plusieurs lignées cellulaires

tumorales contribue à l'inhibition de leur adhérence à la matrice extracellulaire et à la réduction considérable de leur mobilité conduisant ainsi à l'inhibition des métastases (Kim *et al.*, 2004 ; Sheu *et al.*, 1994 ; Zhou *et al.*, 2000). L'intégrine $\alpha\beta 3$ est une des intégrines considérées comme cible potentielle pour le traitement du cancer (Raab-Westphal *et al.*, 2017). Plusieurs travaux ont montré que des désintégrines purifiées à partir des venins de serpents ciblent spécifiquement cette intégrine (Marcinkiewicz, 2013). Des études antérieures ont montré que la l'interaction d'une désintégrine à motif RGD avec l'intégrine $\alpha\beta 3$ entraîne l'apparition d'un signal apoptotique avant le détachement des cellules $\alpha\beta 3$ -293 (transfectées avec cette intégrine) de leur matrice extracellulaire (Brassard *et al.*, 1999).

La contortostatine (CN), une désintégrine de type RGD et purifiée du crotale nord-américain *Agkistrodon contortrix*, a été validée pour son rôle modulateur de l'angiogenèse et impliquant l'intégrine $\alpha\beta 3$ des cellules endothéliales (Selistre-de-Araujo *et al.*, 2010). Cette protéine était capable de bloquer l'adhésion de nombreuses cellules cancéreuses aux protéines de structure en les empêchant de traverser les membranes basales et en bloquant leur dissémination dans l'organisme. L'activité anti-tumorale, anti-angiogénique et anti-métastatique de la CN a été associée à l'implication d'autres intégrines telles que $\alpha 11\beta 3$; $\alpha 5\beta 1$; $\alpha 5\beta 3$; $\alpha 5\beta 5$ (Calderon *et al.*, 2014). D'autres travaux ont révélé que cette protéine inhibe le développement tumoral et réduit le nombre de métastases pulmonaires (Markland *et al.*, 2001). Une autre désintégrine, l'Obtustatin, purifiée à partir du venin de *Vipera lebetina obtusa*, a été capable d'inhiber le développement des cellules du carcinome du poumon *in vivo* en réduisant leur vascularisation via l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ (Marcinkiewicz *et al.*, 2003). D'autres désintégrines ont été également caractérisées grâce à leurs activités anti-prolifératives, anti-adhésives, anti-angiogéniques et anti-métastatiques sur des lignées tumorales, telles que la salmosin, la Rhodostomin, l'albolabrin, issues respectivement des venins de *Agkistrodon halys brevicaudus*, *Calloselasma rhodostoma* et *Trimeresurus albolabris* (Arruda *et al.*, 2015). Plusieurs désintégrines isolées à partir des venins de deux vipères Tunisiennes, *Cerastes Cersastes* et *Macrovipera lebetina* ont été validées pour leurs activités anti-tumorales (Zakraoui *et al.*, 2016 ; Ben-Mabrouk *et al.*, 2016 ; Limam *et al.*, 2010 ; Olfa *et al.*, 2005).

La lebestatine, une désintégrine purifiée à partir du venin de *Macrovipera lebetina* en interagissant spécifiquement avec l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ a induit un blocage de l'adhésion et la migration cellulaire qui s'est traduit par une inhibition de l'angiogenèse *ex vivo* (Olfa *et al.*, 2005). Une autre désintégrine like, purifiée à partir du même venin, la leberagin C a bloqué l'adhésion des cellules tumorales originaires d'un mélanome en interférant avec l'intégrine

$\alpha\beta3$ (Limam et al., 2010). Ben-Mabrouk et al., 2016 ont démontré que CC5 et CC8, deux désintégrines purifiées du venin de *Cerastes cerastes* ont bloqué l'angiogenèse des cellules endothéliales *in vitro* et *ex vivo* via les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha5\beta1$.

Désintégrines	Structure	Motif adhésif	Intégrine préférée	Espèce	Activité inhibitrice
Rodostomine	Monomérique courte	RGD	$\alpha\beta3$	<i>Calleselasma rhodostoma</i>	tumeur angiogenèse
Albolabrine	Monomérique moyenne	RGD		<i>Trimeresurus albolabris</i>	mélanome métastases
Triflavine	Monomérique courte	RGD	$\alpha\beta3$	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	Angiogenèse
Trigramine	Monomérique moyenne	RGD	$\alpha\beta3$	<i>Trimeresurus gramineus</i>	métastases
Eristostatine	Monomérique moyenne	RGD	$\alpha_{ii}\beta3$	<i>Eristicophis macmahoni</i>	mélanome métastases
Echsitatine	Monomérique moyenne	RGD	$\alpha\beta3$	<i>Echis carinatus</i>	ostéoclastes migration
Contortrostatine	Monomérique moyenne	RGD	$\alpha\beta5$, $\alpha\beta3$	<i>Agistrodon contotrix</i>	tumeur angiogenèse
Obtustatine	Monomérique courte	KTS	$\alpha1\beta1$	<i>Vipera lebetina obtusa</i>	cellules endothéliales prolifération
Viperistatine	Monomérique courte	KTS	$\alpha1\beta1$	<i>Vipera plaestonae</i>	cellules de mélanome Transmigration
Lebestatine	Monomérique courte	KTS	$\alpha1\beta1$	<i>Macrovipera lebetina</i>	Angiogenèse
VLO5	Hétérodimérique	VGD, MLD	$\alpha9\beta1$	<i>Vipera lebetina optusa</i>	glioblastome Croissance
Lebein	Hétérodimérique	RGD	$\alpha5\beta1$	<i>Macrovipera lebetina</i>	Cellules colorectales angiogenèse prolifération
CC5 CC8	Homodimérique Hétédimérique	RGD	$\alpha5\beta1$ $\alpha\beta3$	<i>Cerastes cerastes</i>	Angiogenèse
Leberagin-C	Monomérique	SECD	$\alpha\beta3$	<i>Macrovipera lebetina Transmediterranea</i>	Adhésion cellulaire

Tableau 1.1. Les effets de différentes désintégrines, purifiées de venins de serpents, sur plusieurs lignées tumorales (Limam et al., 2010 ; Ifigenia et al., 2015 ; Ben-Mabrouk et al., 2016 ; Zakraoui et al., 2016).

Des études antérieures ont montré que la Lebein, une désintégrine hétérodimérique purifiée à partir du venin de *Macrovipera lebetina*, se liait fortement à la laminine via les intégrines $\beta 1$ ($\alpha 7\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$) et ne reconnaissait pas les intégrines de liaison au collagène ($\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$) (Eble *et al.*, 2003). Cette protéine était capable de réduire les métastases *in vivo* dans le foie en bloquant les interactions directes des cellules tumorales avec des composants spécifiques de la matrice extracellulaire, la laminine et le collagène (Rosenow *et al.*, 2008). Kusuma *et al.*, (Kusuma *et al.*, 2012) a montré que cette désintégrine inhibait l'invasion des cellules tumorales du sein et bloquait les métastases (Kusuma *et al.*, 2012) en ciblant la réponse dépendante de l'intégrine vis-à-vis de la protéine de la membrane basale, la laminine (LM) -511. Récemment, notre groupe a montré que la Lebein, caractérisée auparavant comme un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire (Gasmi *et al.*, 2001), a inhibé la prolifération de cellules tumorales colorectales *in vitro* via un blocage du cycle cellulaire et une induction d'une apoptose impliquant plusieurs effecteurs cellulaires (Zakraoui *et al.*, 2016). De même, cette protéine était capable de bloquer la progression tumorale *in vivo* via une inhibition de l'angiogenèse qui dépendait en partie d'un blocage de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, d'une diminution de l'expression du VEGF, facteur clé de l'angiogenèse pathologique et de son co-récepteur Neuropilin 1 (NRP1) (Zakraoui *et al.*, 2016).

1.2.1.2. Les lectines de type C

Les lectines de type C (CLEC) désignent un groupe de protéines qui ont un domaine protéique liant les hydrates de carbone connu sous le nom de lectine (Zelensky et Gready., 2005). Cette famille de molécules a été identifiée dans les plantes comme dans certains animaux. La désignation de type C est dû au fait que cette famille de molécules requiert le calcium pour la liaison des hydrates de carbone. Les lectines de type C exercent plusieurs fonctions dans la réponse immunitaire aux agents pathogènes, dans l'adhésion cellule-cellule et dans la mort programmée (Drickamer, 1999 ; Cambi et Figdor, 2009).

1.2.1.2.1. Classification et diversité des Lectines de type C

Les lectines de type C issues des venins de serpents peuvent être divisées en deux classes :

- Les lectines classiques, dépendantes de Ca^{2+} et contenant un domaine CRD 8, liant de façon non covalente et réversible des sucres spécifiques. Ces lectines possèdent une structure homodimérique avec des ponts disulfures inter-chaînes qui en s'associant forment de grands multimères.

- Les snaclecs, dépourvues de Ca²⁺ et de la boucle de fixation du sucre 5, possédant une structure hétérodimérique $\alpha\beta$ (unité structurale à partir de laquelle les différentes lectines se forment par oligomérisation) (Toyama *et al.*, 2001). Elles sont les plus représentées au niveau des venins de serpents.

Pour des raisons de concision nous n'évoquerons que la classe des snaclecs ou CLPs.

- La classe des snaclecs ou CLPs

Le terme de « Snaclecs » a été attribué aux lectines de type-C (CLPs) purifiées à partir des venins de serpents (Clemetson *et al.*, 2009). Cette nomenclature a été désignée par Clemetson *et al.*, 2009 afin d'éviter la confusion avec les lectines classiques de type C. La plupart des Snaclecs sont des hétérodimères ayant deux sous-unités alpha (14-15 kDa) et bêta (13-14 kDa), presque toujours liées de façon covalente via une liaison disulfure (Lu *et al.*, 2005 et Ogawa *et al.*, 2005). Les hétérodimères sont souvent multimériques soit de manière non covalente ou covalente par l'intermédiaire de liaisons disulfures supplémentaires pour former des structures plus grandes. Les snaclecs sont connues par leurs structures hétérodimériques $\alpha\beta$ de base. Elles sont impliquées dans l'hémostase et se lient à une large gamme de facteurs de coagulation et de récepteurs membranaires se trouvant sur les plaquettes (Clemetson *et al.*, 2010). Cependant, beaucoup ont plus d'un site de liaison et / ou peuvent interagir avec plus d'un ensemble de protéines / récepteurs.

1.2.1.2.2. Implication thérapeutique des lectines de type C

Les CLPs étaient principalement décrites en tant que modulateurs de l'agrégation plaquettaire, en ciblant le facteur de von Willebrand (vWF) (Arlinghaus et Eble, 2012), GPIb-IX-V, GPVI et éventuellement d'autres récepteurs plaquettaires (Clemetson *et al.*, 2005).

Les CLP dérivant des venins de serpents sont connues pour interférer avec l'activité de certaines intégrines et agissent en inhibant le récepteur du collagène, l'intégrine $\alpha2\beta1$ (Jakubowski *et al.*, 2013). Marcinkiewicz et ses collaborateurs, 2000 ont rapporté une activité anti-intégrine $\alpha2\beta1$ de l'EMS16, une lectine de type C dérivant du venin d'*Echis multisquamatus*. D'autres CLPs, comme la bilinexin dérivant du venin d'*Agkistrodon bilineatus* (Du *et al.*, 2001) et l'aggretrin de *Calloselasma rhodostoma* (Suzuki-Inoue *et al.*, 2001) impliquaient l'intégrine $\alpha2\beta1$ dans leurs activités pharmacologiques.

La lebecetine et la lebecetine, purifiées à partir du venin de *Macrovipera Lebetina*, sont les premières snaclecs validées pour leurs effets anti-tumoraux en plus de leurs activités

plaquettaires anti-agrégantes (Sarray *et al.*, 2007). En effet, ces protéines étaient capables d'inhiber l'adhésion de diverses lignées cellulaires cancéreuses du mélanome (IGR39), d'adénocarcinome (HT29-D4), du fibrosarcome (HT1080) et des cellules leucémiques (K562) à différentes protéines de la matrice extracellulaire (ECM). De plus, il a été montré que la lebecine a inhibé la prolifération, la migration et l'invasion des cellules HT1080 (Sarray *et al.*, 2004, 2007) et elle a été également dotée d'une activité anti-angiogénique (Pilorget *et al.*, 2007). Ces effets ont été associés à l'inhibition des intégrines αv et $\alpha 5\beta 1$ (Sarray *et al.*, 2007, Pilorget *et al.*, 2007).

La BJcuL, une protéine purifiée à partir du venin de serpent *Bothrops jararacussu* a été décrite pour son effet anti-angiogénique et anti-tumoral (De Carvalho *et al.*, 2001). Cette protéine homodimérique a inhibé la prolifération de plusieurs lignées cellulaires tumorales originaires de cancers des reins, du pancréas, de la prostate et du mélanome, mais, sans aucun effet sur les cellules cancéreuses du côlon et du sein (Pereira-Bittencourt *et al.*, 1999). De même, la Rhodocetine et la Vixapatine, deux lectines de type C dérivant de *Calloselasma rhodostoma* et de *Vipera xantina palestinae* respectivement, ont exercé des effets anti-tumoraux via l'intégrine $\alpha 2\beta 1$. La rhodocetine était capable d'inhiber la croissance tumorale et les métastases hépatiques (Rosenow *et al.*, 2008) et la Vixapatine (VP12) a bloqué l'adhésion et la migration des lignées cellulaires humaines de mélanome *in vitro* (Staniszewka *et al.*, 2009). De même, la VP12 a été capable de bloquer la prolifération des cellules endothéliales humaines du derme et d'inhiber l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* (Momic *et al.*, 2011).

Egalement, Nunes et ses collaborateurs (2012) ont rapporté une activité cytotoxique associée à une induction de l'apoptose des cellules tumorales K562 par BIL, une lectine c-liant un galactoside isolée à partir du venin de *Bothrops jararacussu*. L'activité antitumorale de cette protéine a été vérifiée par une analyse d'externalisation de la phosphatidylsérine et la détermination du potentiel de la membrane mitochondriale (Nunes *et al.*, 2012). De même, BJcuL, une lectine purifiée à partir du même venin (*Bothrops jararacussu*) a induit une mort programmée des cellules originaires d'un carcinome gastrique en bloquant l'adhésion cellulaire et en induisant une perturbation dans l'assemblage des filaments d'actine au niveau du cytosquelette (Nolte *et al.*, 2012).

En 2014, une autre étude a mis en évidence l'activité antitumorale de la lebecin, une lectine de type C isolée à partir du venin de *Macrovipera Lebetina*, sur les cellules MDA-MB-231 du cancer du sein (Jebali *et al.*, 2014). Récemment, Montassar *et al.*, 2017 ont montré que la

lebecétine, une lectine de type C, purifiée à partir du même venin était capable d'inhiber la néovascularisation choroïdienne et rétinienne *in vivo* (Montassar *et al.*, 2017).

CTL	Espèce	Cible	Séquence	Fonction
Mucétine	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	GPIb	+	Agoniste de plaquettes
Mucrocétine	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	GPIb	+	Agglutinant
Flavocétine-A	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	GPIb	+	Antagoniste de plaquettes
Mamushigine	<i>Agkistrodon blays blomboffii</i>	GPIb	+	Agoniste de plaquettes
Albogrégrine-B	<i>Trimeresurus albolabris</i>	GPIb	-	Agoniste de plaquettes
Albogrégrine-C	<i>Trimeresurus albolabris</i>	GPIb	-	
Agglucétine	<i>Agkistrodon acutus</i>	GPIb	-	Pro-agglutinant
GPIb-BP	<i>Bothrops jararaca</i>	GPIb	+	
Agkicétine	<i>Agkistrodon acutus</i>	GPIb	+	Anti-agglutinant
CHH-A et B	<i>Crotalus borridus borridus</i>	GPIb	+	Antagoniste de plaquettes
Echicétine	<i>Echis carinatus</i>	GPIb/IgMk	+	Antagoniste de plaquettes
Lebécétine	<i>Macrovipera lebetina</i>	GPIb	+	Antagoniste de plaquettes
TSV-GPIB-BP	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	GPIb	+	Antagoniste de plaquettes y anti-agglutinant
Tokaracétine	<i>Trimeresurus tokarensis</i>	GPIb	-	Antagoniste de plaquettes
Dabocétine	<i>Daboia russellii siamensis</i>	GPIb	+	anti-agglutinant
Purpuréotinae	<i>Trimeresurus purpureomaculatus</i>	GPIb	+	Agoniste de plaquettes anti-agglutinant y antagoniste de plaquettes
	<i>Agkistrodon acutus</i>	GPIb	+	
Agkistine				
Convulxine	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	GPIb, GPVI	+	Agoniste de plaquettes
Albogrégrine-A	<i>Trimeresurus albolabris</i>	GPIb, GPVI	+	Agoniste de plaquettes
Stejnulxine	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	GPVI	+	Agoniste de plaquettes
Ophioluxine	<i>Ophiophagus bannab</i>	GPVI	-	Agoniste de plaquettes
Alboluxine	<i>Trimeresurus albolabris</i>	GPIb, GPVI	-	Agoniste de plaquettes
Botrocétine	<i>Bothrops jararaca</i>	fvW / GPIb	+	Pro-agglutinant
Bitiscétine	<i>Bitis arietans</i>	fvW / GPIb	+	Agoniste de plaquettes
EMS16	<i>Echis multiquamatus</i>	GPa/IIa	+	Antagoniste de plaquettes
Aggretine	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	GPIb, GPa/IIa	+	Agoniste de plaquettes
Rhodocétine	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	GPa/IIa	+	Antagoniste de plaquettes
Bilinxina	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	GPIb, GPa/IIa	+	Agglutinant
Ba25	<i>Bitis arietans</i>	GPIb, GPa/IIa	+	Pro-agglutinant
Agkisacutacine	<i>Agkistrodon acutus</i>	GPIb, IX/X	+	Anticoagulant y anti-agglutinant
Agkaggregine	<i>Agkistrodon acutus</i>	Desconocido	-	Agoniste de plaquettes
Crotacétine	<i>Crotalus durissus cascavella</i>	Desconocido	+	Agoniste de plaquettes
BML1 et BML2	<i>Bungarus multicinctus</i>	Desconocido	+	Pro-agglutinant
Rhodaggretine	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	Desconocido	-	Agoniste de plaquettes
CRL	<i>Crotalus atrox</i>	Galactosa	+	-
TSL	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	Galactosa	+	-
LsL	<i>Lachesis muta stenophrys</i>	Galactosa	+	Pro-agglutinant
RSL	<i>Crotalus atrox</i>	Galactosa	+	Pro-agglutinant
CAL	<i>Crotalus atrox</i>	Galactosa	+	-
APL	<i>Agkistrodon piscivorus</i>	Galactosa		Pro-agglutinant
BAL	<i>Bitis arietans</i>	Galactosa	+	
BjcuL	<i>Bothrops jararacussu</i>	Galactosa	+	Pro-agglutinant

Tableau 1.2. Les effets de différentes lectines de type C purifiées à partir des venins de serpents sur l'agrégation plaquettaire.

De même, Pathan et ses collaborateurs ont identifié une lectine de type C dans le venin de la vipère Russell's, la Daboialectin qui a induit un dommage du cytosquelette et l'apoptose des cellules cancéreuses du poumon *in vitro* (Pathan *et al.*, 2017).

*Plusieurs biomolécules actives originaires du venin de la vipère *Macrovipera lebetina* ont constitué des cibles thérapeutiques pour plusieurs types de cancers. A l'heure actuelle, le mélanome est parmi les cancers épithéliaux dont l'incidence continue à augmenter malgré plusieurs initiatives thérapeutiques. Pour les patients atteints et qui sont au stade métastatique, peu de thérapies appliquées sont utilisées et toutes les combinaisons standards indiquées dans les traitements de métastases ont une faible efficacité et un faible taux de réponse d'où l'intérêt de développer d'autres stratégies thérapeutiques pour pallier à ces problématiques.*

*Dans ce contexte, l'identification et la valorisation d'autres biomolécules actives issues de venin de la vipère *Macrovipera lebetina* et la validation de leur activité anti-tumorale et les mécanismes cellulaires régissant leur activité est un objectif ultime. L'identification de nouveaux effecteurs cellulaires susceptibles de ciblage de médicaments dans les cancers épithéliaux pourrait aider à développer de nouvelles thérapies et des combinaisons de médicaments afin d'améliorer l'efficacité et la réponse au traitement.*

CAPÍTULO 2



OBJETIVOS

*Tienes que saber lo que
vas a conseguir.*

Gertrude Stein

2. OBJETIVOS

El cáncer continúa desafiando el progreso de la medicina moderna y sigue siendo, después de años de intensa investigación, una enfermedad enigmática responsable de la muerte de millones de personas cada año.

El melanoma es la forma más agresiva de cáncer de piel. Su pronóstico desfavorable está relacionado con su carácter altamente invasivo y su resistencia a la quimioterapia. Para este tipo de cáncer, el tratamiento de las células cancerosas implica la cirugía, la radioterapia, la inmunoterapia y la quimioterapia. La cirugía, combinada con la radioterapia o la quimioterapia, puede ser curativa con un alto porcentaje cuando los pacientes se encuentran en las primeras etapas de la enfermedad. Sin embargo, en etapas avanzadas, cuando se desarrollan metástasis, las posibilidades de supervivencia son bajas y la quimioterapia se vuelve necesaria. La quimioterapia es bien tolerada, pero se asocia con tasas de respuesta de solo 5% a 20%. La quimioterapia combinada y la bioquimioterapia pueden mejorar las tasas de respuesta objetiva, pero no prolongan la supervivencia y se asocian a una mayor toxicidad. El fármaco cisplatino es clínicamente beneficioso para pacientes con melanoma cuando se usa en combinación con otros agentes quimioterapéuticos como vincristina o dacarbazina o después de una terapia dirigida (Hsan *et al.*, 2010; Flaherty *et al.*, 2014, Megahed *et al.*, 2014).

Otro cáncer epitelial, asociado a alteraciones moleculares, alta incidencia y alta tasa supervivencia, el cáncer de mama, es una enfermedad muy grave con falta de respuesta completa a la terapia a causa de la resistencia desarrollada en este tipo de tumores. A pesar de recientes investigaciones prometedoras, existe una necesidad urgente de nuevos enfoques terapéuticos para superar los mecanismos de resistencia desarrollados por las células cancerosas y para aumentar la eficacia de los tratamientos convencionales. El desarrollo de nuevos fármacos se ha convertido en una prioridad y un gran desafío en la oncología. A lo largo de la historia, los productos naturales han proporcionado una rica fuente de compuestos que han contribuido a muchas aplicaciones en muchas áreas de la medicina. El descubrimiento de nuevas moléculas y dianas terapéuticas para prevenir la progresión y aumentar la expectativa y la calidad de vida de los pacientes con cáncer es un objetivo final de la oncología. El uso de biomoléculas naturales, no tóxicas, en combinación con fármacos quimioterapéuticos que afectan principalmente a las células tumorales y a las respuestas celulares generadas es una perspectiva interesante.

Mi trabajo de tesis, se ha desarrollado en el marco de objetivos y temas de investigación del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de A Murcia, en España y del laboratorio d'Epidémiologie moléculaire et Pathologie Expérimentale Appliquée aux maladies infectieuses (LR11IPT04) en el Instituto Pasteur de Túnez. En este contexto, nuestro **Objetivo General** se orientó, principalmente, hacia la identificación de nuevas biomoléculas activas, efectores celulares, y en el diseño de estrategias terapéuticas combinadas para lograr evadir la resistencia tumoral. Todo esto podría ayudar a desarrollar nuevos tratamientos y combinaciones de fármacos para mejorar la eficiencia y la respuesta al tratamiento en los cánceres epiteliales de melanoma y cáncer de mama.

Por lo tanto, nuestro trabajo de tesis se engloba en el desarrollo de dos proyectos:

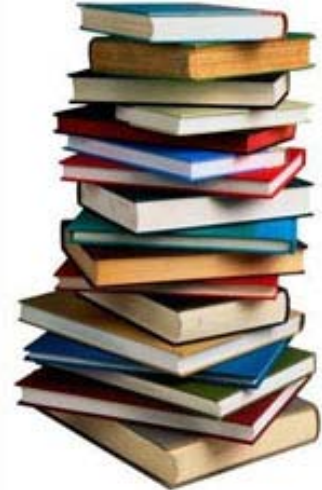
1/ Desarrollar terapias combinadas diseñadas para bloquear, simultáneamente, el ciclo del ácido fólico y otras rutas metabólicas (síntesis de ADN, ciclo de la metionina y biosíntesis de purinas) o rutas de señalización mediada por hormonas o por receptores de tirosina quinasa.

Estudios preliminares en nuestro laboratorio han demostrado que la TMECG inhibía con una alta potencia y especificidad a la dihidrofolato reductasa (DHFR) humana y, por lo tanto, podría actuar como un antifolato, bloqueando el metabolismo del ácido fólico en estas células tumorales. Así, el objetivo principal de este proyecto será desarrollar terapias combinando el TMECG con otros fármacos con el fin de aumentar la eficacia y selectividad de éstos contra el cáncer de mama.

2/ Desarrollar terapias a partir de compuestos de origen natural contra el melanoma.

Inicialmente, nos hemos centrado en el desarrollo y la caracterización de la Lebeina, una proteína purificada a partir del veneno de *Macrovipera lebetina* (Gasmi *et al.*, 2001) por sus propiedades anti-proliferativa y antitumorales en dos líneas de un melanoma, SK-MEL-28 y LU-1205. En segundo lugar, nos propusimos caracterizar la potencia antitumoral y mecanismo de acción de la macrovipecetina, una lectina de tipo C purificada a partir del mismo veneno de *Macrovipera lebetina*, bien sola o en combinación con fármacos quimioterapéuticos, como el cisplatino, en cultivos celulares de melanoma.

CHAPITRE 2



DELIMITATION DE SUJET

*Vous devez savoir ce que
vous allez obtenir.*

Gertrude Stein

2. DELIMITATION DE SUJET

Le cancer continue à défier les progrès de la médecine moderne et demeure, après plusieurs années de recherche intensive, une maladie énigmatique responsable chaque année de la mort de millions de personnes.

Le mélanome représente la forme la plus agressive des cancers de la peau. Son mauvais pronostic est lié à son caractère très invasif et à une chimio-résistance. Pour ce type de cancer, le traitement des cellules cancéreuses fait intervenir la chirurgie, la radiothérapie, l'immunothérapie, et la chimiothérapie. La chirurgie, combinée à la radiothérapie ou à la chimiothérapie, peut être curative avec un pourcentage élevé quand les patients sont dans les premiers stades de la maladie. Cependant, dans les stades avancés, lorsque les métastases sont développées, les chances de survie sont faibles et la chimiothérapie devient nécessaire. La chimiothérapie est bien tolérée mais elle est associée à des taux de réponse de seulement 5% à 20%. La chimiothérapie et la biochimiothérapie combinées peuvent améliorer les taux de réponse objective, mais ne prolongent pas la survie et sont associées à une plus grande toxicité. La drogue cisplatine est cliniquement bénéfique pour les patients atteints d'un mélanome quand elle est utilisée en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques tels que la vincristine ou la dacarbazine ou après une thérapie ciblée (Hsan *et al.*, 2010 ; Flaherty *et al.*, 2014 ; Megahed *et al.*, 2014).

En dépit de récentes recherches prometteuses, il y a un besoin urgent de nouvelles approches thérapeutiques afin de pallier aux mécanismes de résistance développés par les cellules cancéreuses et augmenter l'efficacité des traitements conventionnels qui représentent une priorité et un enjeu de taille en oncologie.

Tout au long de l'histoire, les produits naturels ont offert une riche source de composés qui ont contribué à de nombreuses applications dans plusieurs domaines. La découverte de nouvelles molécules et de cibles thérapeutiques pour prévenir la progression et augmenter l'espérance et la qualité de vie de patients atteints d'un cancer est un objectif ultime en oncologie. L'utilisation de biomolécules naturelles non toxiques en combinaison avec des médicaments chimiothérapeutiques qui affectent principalement les cellules tumorales et les réponses cellulaires engendrées est une perspective intéressante.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre des objectifs et thématiques du Laboratoire d'Epidémiologie moléculaire et Pathologie Expérimentale Appliquée aux maladies infectieuses (LR11IPT04) à l'Institut Pasteur de Tunis et du département de Biochimie et Biologie Moléculaire A de l'Université de Murcie en Espagne. Dans ce contexte, notre objectif général a été essentiellement orienté vers l'identification de biomolécules actives et de nouveaux effecteurs cellulaires susceptibles de ciblage de médicaments dans le but, à long terme, de développer de nouvelles thérapies et des combinaisons de médicaments capables d'améliorer l'efficacité et la réponse au traitement dans le mélanome.

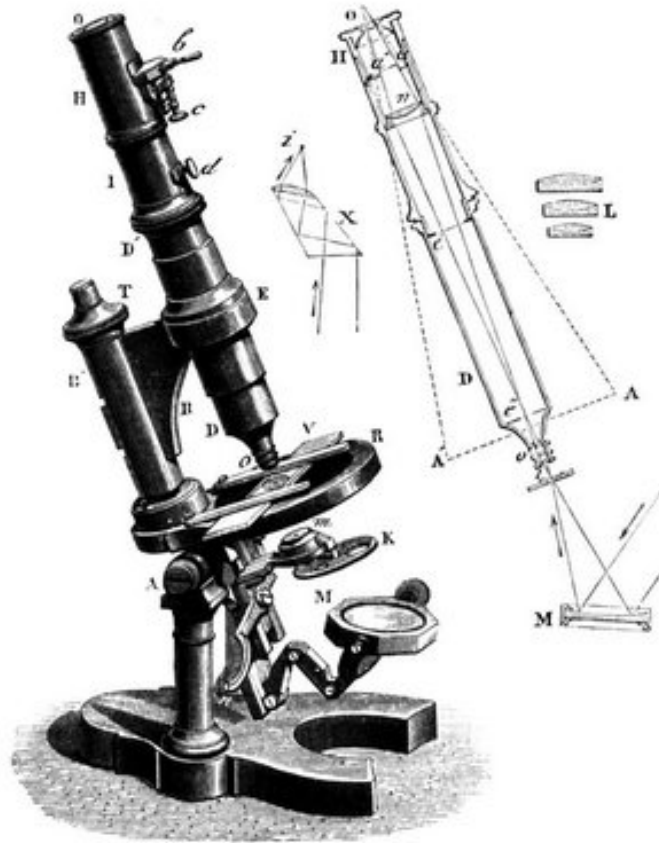
Ce travail a été axé sur deux objectifs spécifiques :

- Déterminer l'effet de certaines substances naturelles comme potentiels candidats anti-tumoraux dans le but de les proposer en combinaison avec les drogues chimiothérapeutiques utilisées comme alternatives afin d'éliminer l'effet résistant des cellules de mélanome à certains médicaments.
- Mettre en évidence le rôle de certaines protéines ou cibles dans l'absence de réponse au traitement et de cibler ces effecteurs cellulaires par des molécules naturelles afin de reverser cette résistance.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la valorisation et la caractérisation de la Lebein, une protéine purifiée à partir du venin de la vipère *Macrovipera lebetina* (Gasmi *et al.*, 2001) pour son effet anti-prolifératif et anti-tumoral sur deux lignées issues d'un mélanome: les cellules SK-MEL-28 et les cellules LU-1205.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes proposés de caractériser le pouvoir anti-tumoral et le mécanisme d'action d'une lectine de type C purifiée à partir du venin de *Macrovipera lebetina*, la macrovipecetine seule et/ou en combinaison avec la drogue chimiothérapeutique cisplatine dans des modèles cellulaires originaire d'un mélanome.

CAPÍTULO 3



TÉCNICAS E INSTRUMENTACIÓN

*El genio se hace con 1 % de
talento y 99 % de trabajo.*

Albert Einstein

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 con bajo número de pases. El mantenimiento y los experimentos con cultivos celulares se llevaron a cabo en las instalaciones del Instituto Pasteur, Universidad de Túnez El Manar y en 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 un incubador de CO₂ en unas condiciones de temperatura y humedad controladas (incubador Steri-Cult 3310 de Thermo Scientific para el 5% de CO₂). 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) para la conservación a largo plazo. 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 flujo laminar, incubador de CO₂ y depósito de nitrógeno líquido. Cabina Cytostar de flujo laminar vertical de seguridad biológica y química de clase II de Telstar (panel izquierdo). Incubadores de CO₂ 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 las líneas celulares establecidas 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: fase lag, fase log o exponencial y fase estacionaria o de *plateau*. Para asegurar la viabilidad, la estabilidad genética y fenotípica de las líneas celulares, las curvas de crecimiento deben mantenerse en fase exponencial por ello, las células deben de ser subcultivadas de forma regular antes de que la monocapa alcance el 100% de confluencia. Además, en todos los casos, para garantizar la preservación de las características de la línea celular original, se emplearon células con menos de 15 subcultivos desde su descongelación.

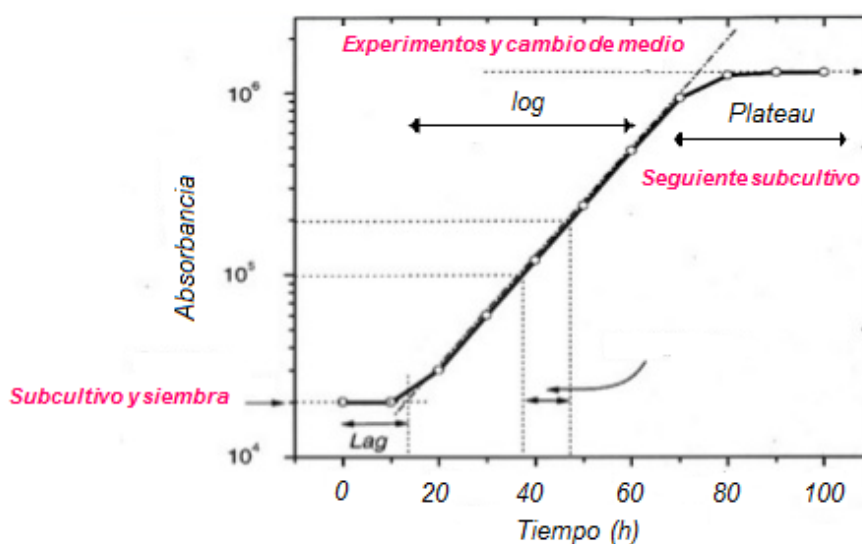


Figura 3.2. La curva de crecimiento indicando las distintas fases.

Diferentes líneas de células se utilizaron como modelos celulares para evaluar el efecto antitumoral de las biomoléculas de interés.

- Cuatro líneas celulares de melanoma: la línea SK-MEL-28 que tiene el gen p53 mutado (p53mut) y las líneas A375, IGR-39 y LU-1205 con el gen p53 salvaje (p53wt).
- Dos líneas celulares de cáncer de mama: MDA-MD-231 carente del receptor de estrógeno (ER-negativo) y MCF-7 que expresa el receptor de estrógeno (ER-positivo).
- Una línea celular de queratinocitos humanos (HACAT).

Estas células se cultivaron en un medio de cultivo EMEM (medio mínimo esencial de Eagle) o DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) (Invitrogen) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FCS) (Dutscher, Francia) previamente descomplementado (30 min a 56 °C) y suplementado con otros elementos dependiendo de la línea celular. En general, las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda que contiene 5% de CO₂, aunque estas condiciones variaron dependiendo de la línea celular. En el caso de las líneas celulares de cáncer de mama, algunos experimentos se realizaron en ausencia de hormonas. En este caso, las células se mantuvieron durante tres días en DMEM con rojo de fenol más 2.5% FCS tratado con dextrano y carbón activo (Life Technologies, Barcelona, España). Para más detalle, las características de las líneas celulares utilizadas, así como el protocolo de subcultivo se encuentra descrito en las fichas técnicas que se encuentran a continuación.

3.1.2. DESCONGELACIÓN Y CULTIVO DE LAS CÉLULAS

Las células, previamente congeladas y almacenadas en nitrógeno líquido o a - 80°C, se descongelaron rápidamente en un baño maría a 37°C. Después, se transfirieron a un tubo que contenía 10 mL de medio DMEM o EMEM y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 min. Después de la eliminación del sobrenadante, las células se cultivaron en una placa de Petri o en un frasco de cultivo con 10 mL de medio completo y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

Las células se cultivaron en monocapas y se observaron regularmente con un microscopio invertido con contraste de fase. Cuando las células alcanzaron un estado sub-confluyente de crecimiento se aspiró el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS (1X) o con una disolución de tripsina 0.25% (p/v)-EDTA 0.53 mM. Las células adherentes fueron despegadas usando 1 mL de tripsina/EDTA (Invitrogen) durante varios minutos a 37°C y se recogieron en 2 mL de medio de cultivo fresco. Las células, después, se contaron usando una cámara Kova (KOVA, GLASSTIC, Slide10, Hycor) o Neubauer, o mediante la utilización de un contador automático. La viabilidad celular se evaluó por el método de exclusión con azul de tripán.

3.1.3. CRIO CONSERVACIÓN CELULAR

Las células, en fase de crecimiento exponencial, se despegaron de la placa mediante el tratamiento con tripsina/EDTA. Tras lavar con PBS, las células se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 min y el precipitado se resuspendió en un medio que contenía EMEM o DMEM frío,

suplementado con 10% de FCS y 5% DMSO estéril. Las células se distribuyen en criotubos de 1 mL. A continuación, estas se congelaron inmediatamente a - 80°C. Después de 24 horas, los tubos se almacenaron en nitrógeno líquido.

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.

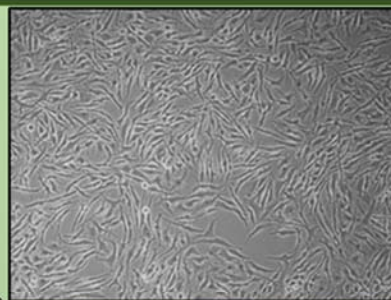
MEDIO DE CULTIVO: : Medio Mínimo Esencial de Eagle (EMEM) + Glutamina 2 mM + 1% aminoácidos no esenciales + Piruvato 1 Mm + Insulina 0.01 mg/mL+ 10% SBF.

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

CRIOCONSERVACIÓN: Almacenamiento en 50% de medio de cultivo completo + 40% adicional de SBF + 10% DMSO (v/v) en depósito de nitrógeno líquido en fase de vapor.

PROTOCOLO DE SUBCULTIVO:

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 0.53 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 al 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 $1-2 \cdot 10^4 \text{ Cm}^2$.
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 a 90% de confluencia.



LU-1205

ORGANISMO: *Homo sapiens* (Humano).

ORÍGEN: Metástasis pulmonares de las células WM793, piel.

EDAD: 62 años. **SEXO:** Masculino.

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

TIEMPO DE DUPLICACIÓN: 40 horas.

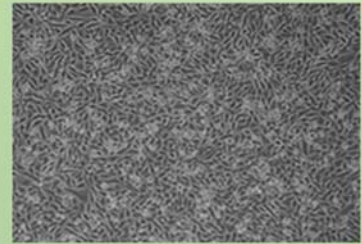
MEDIO DE CULTIVO: : Medio Mínimo Esencial de Eagle (EMEM) + Glutamina 2 mM + 1% aminoácidos no esenciales + Piruvato 1 Mm + Insulina 0.01 mg/mL+ 10% SBF.

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

CRIOCONSERVACIÓN: Almacenamiento en 50% de medio de cultivo completo + 40% adicional de SBF + 10% DMSO (v/v) en depósito de nitrógeno líquido en fase de vapor.

PROTOCOLO DE SUBCULTIVO:

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 0.53 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 al 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 $1-2 \cdot 10^4 \text{ Cm}^2$.
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 a 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.

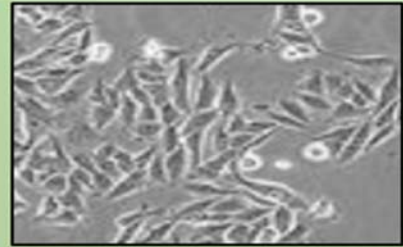
MEDIO DE CULTIVO: Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Glucosa 4.5 g/L) + Glutamina 2 mM + 10 % SBF.

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

CRIOCONSERVACIÓN: Almacenamiento en 50% medio de cultivo completo + 40% 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 inóculo recomendado es $1-3 \times 10^4 \text{ cm}^2$.
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.



IGR-39

ORGANISMO: *Homo sapiens* (Humano).

ORÍGEN: Piel; melanoma maligno.

EDAD: 26 años. **SEXO:** Masculino.

MORFOLOGÍA: Epitelial.

TIPO DE CRECIMIENTO: Adherente.

TIEMPO DE DUPLICACIÓN: 30 horas.

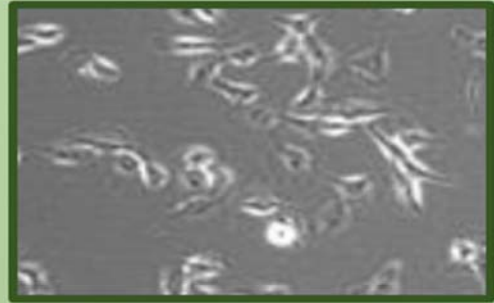
MEDIO DE CULTIVO: Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Glucosa 4.5 g/L) + Glutamina 2 mM + 15% SBF.

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

CRIOCONSERVACIÓN: Almacenamiento en 50 % de medio de cultivo completo + 40% adicional de SBF + 10% DMSO (v/v) en depósito de nitrógeno líquido en fase de vapor.

PROTOCOLO DE SUBCULTIVO:

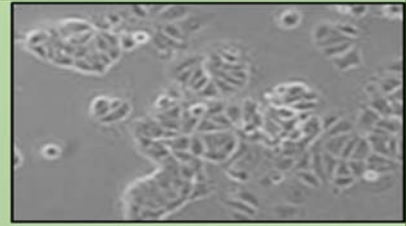
1. Retirar y descartar el medio de cultivo.
2. Lavar la capa de células con una disolución de Tripsina 0.25% (p/v)-EDTA 0.53 mM para eliminar los restos de suero que contiene inhibidor de tripsina.
3. Añadir 2.0 mL de la disolución de Tripsina-EDTA. Incubar a 37°C para facilitar su dispersión (3-5 minutos) 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 inóculo recomendado es $2-3 \times 10^4 \text{ Cm}^2$.
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.



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:

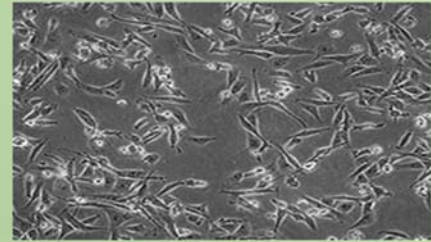
Al inicio puede haber células en suspensión. Se recomienda transferirlas durante los dos primeros subcultivos como se describe a continuación, pero no es necesario transferirlas en los siguientes subcultivos.

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 $2-4 \times 10^4 \text{ Cm}^2$.
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.

MDA-MB-231

ORGANISMO: *Homo sapiens* (Humano).

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



EDAD: 51 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 + 10 % SBF.

ATMÓSFERA: sin 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 0.53 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 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 $2-4 \times 10^4 \text{ Cm}^2$.
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.

HACAT

ORGANISMO: *Homo sapiens* (Humano).

ORÍGEN: Queratinocitos.

EDAD: 62 años. **SEXO:** Masculino.

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

TIEMPO DE DUPLICACIÓN: 52 horas.

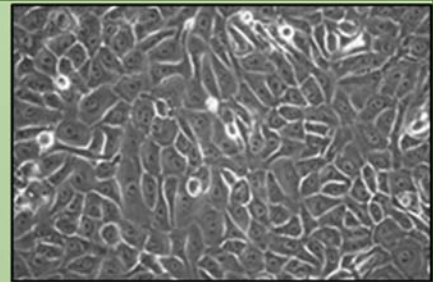
MEDIO DE CULTIVO: : Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Glucose 4.5 g/L) + Glutamina 2 mM + 10 % SBF.

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

CRIOCONSERVACIÓN: Almacenamiento en 50% de medio de cultivo completo + 40% adicional de SBF + 10% DMSO (v/v) en depósito de nitrógeno líquido en fase de vapor.

PROTOCOLO DE SUBCULTIVO:

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.
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 $1 \cdot 10^4 \text{ Cm}^2$.
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% de confluencia.



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. Por lo tanto, el azul tripán es capaz de atravesar la membrana de las células muertas mientras que este colorante no penetra en las células viables con la membrana intacta. De esta manera podemos diferenciar con el microscopio, entre las células muertas que se tiñen con un distintivo color azul y las células vivas que aparezcan refringentes y sin colorear.

Este método calorimétrico, se denomina también método de tinción por exclusión, nos permiten de distinguir las células vivas de las células muertas, pero no nos permiten de diferenciar entre células muertas por necrosis o por apoptosis. 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. La suspensión celular se homogeniza y puede ser sometida a recuento una vez teñida con azul tripán. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, los recuentos se realizaron utilizando un hemocitómetro o cámara de Neubauer, cámara de Kova, o bien, utilizando el contador de células automático TC10 de Bio-Rad Laboratories.

- Cámara de Kova

La cámara de KOVA es un portaobjetos especializado. Su dimensión exterior es de 3 mm x 3 mm. Cada cámara comprende 10 cámaras de Kova. Cada una comprende 9 grandes cuadros. Cada uno comprende una cuadrícula de nueve pequeños cuadrados de 0.33 mm. 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 contar las células vivas (sin colorear y refringentes) y muertas (teñidas de azul) en cada uno de los nueve cuadrados de 0.33 mm se observó la cámara bajo el microscopio óptico y se realizó un promedio entre los nueve 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:

N de células viables / mL = Promedio de células viables por cuadro x10.000 x Factor de dilución.

N de células muertas / mL = Promedio de células muertas por cuadro x10.000 x Factor de dilución.

N de células totales / mL = Promedio de células totales por cuadro x10.000 x Factor de dilución.

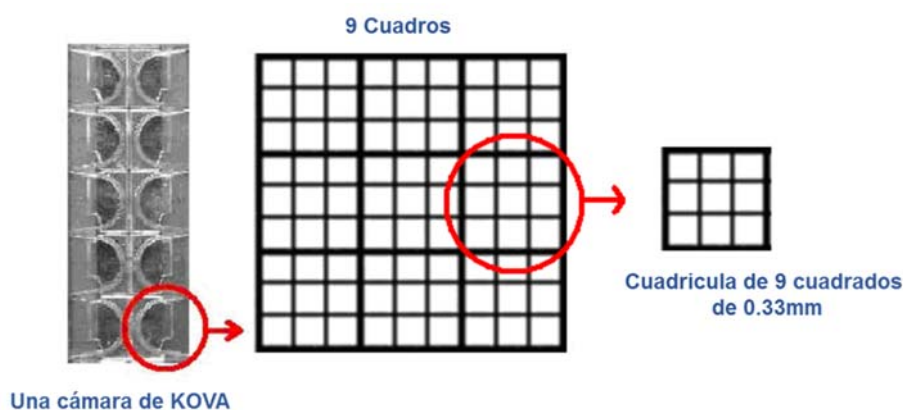


Figura 3.3. Imagen y esquema de la cámara de KOVA (utilizada para realizar los recuentos celulares, mostrando los distintos cuadrantes de los que consta).

- Hemocitómetro o Cámara de Neubauer

El hemocitómetro es un portaobjetos especializado en cuya parte central presenta una ligera depresión grabada con una retícula cuadrangular. 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 realizar un recuento de las células vivas (sin colorear y refringentes) y muertas (teñidas de azul) en cada uno de los cuatro cuadrados de 1 mm^2 en las esquinas de la cámara, se observó la cámara bajo el microscopio óptico y se realizó un promedio entre los cuatro cuadros.

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

N de células viables / mL = Promedio de células viables por cuadro x10.000 x Factor de dilución.

N de células muertas /mL = Promedio de células muertas por cuadro x10.000 x Factor de dilución.

N de células totales / mL = Promedio de células totales por cuadro x10.000 x Factor de dilución.

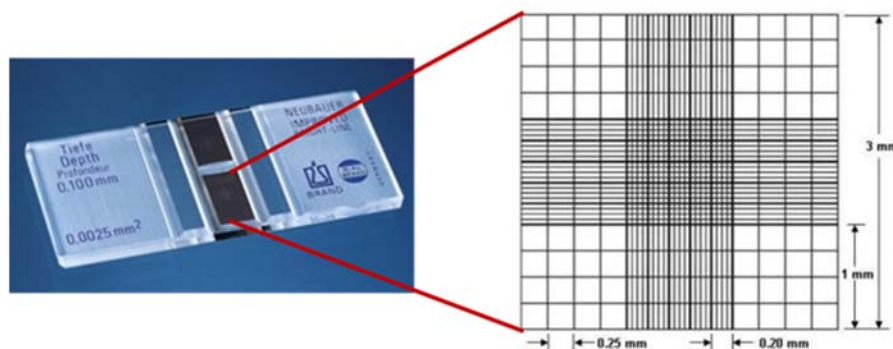


Figura 3.4. Imagen y esquema de la cámara de Neubauer (utilizada para realizar los recuentos celulares, mostrando los distintos cuadrantes de los que consta).

- Contador de células automático TC10 de Bio-Rad

El contador de células automático TC10 se ha utilizado para realizar ensayos de viabilidad celular introduciendo $10 \mu\text{L}$ 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 automático 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. Esto 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.

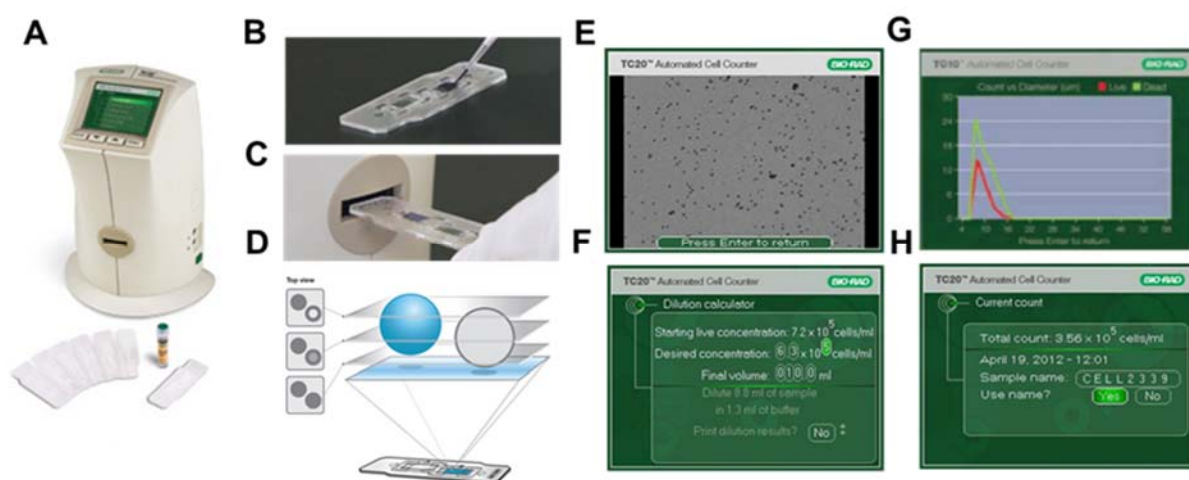


Figura 3.5. Diferentes componentes de un contador de células automático.

(A) Contador de células automático TC10 junto al reactivo azul tripán y un portaobjetos especializado de recuento. (B) Imagen de la cámara en plástico con 10 μL de la mezcla de suspensión celular y azul tripán (C) Imagen de la inserción de la cámara en el contador. (D) Esquema del análisis de múltiples planos focales realizado por el contador TC10 durante el recuento. (E) Captura de pantalla de la imagen de las células en la cámara proporcionada por el contador. (F) Captura de la pantalla de los diferentes parámetros: concentración del inicio, concentración deseada y el volumen final de la muestra. (G) 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 (H) Captura de pantalla de un recuento celular con azul tripán indicando el número total de las células.

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 transformación de un sustrato denominado bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-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 mediante la enzima

mitocondrial succinato deshidrogenasa. Este producto forma cristales insolubles en agua que no pueden atravesar la membrana plasmática y quedan retenidos en el interior de las células. Se utilizó disolventes orgánicos (DMSO, isopropanol-HCl o etanol) para solubilizar las células antes de realizar la colorimetría. Para liberar este producto, 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 3.6**).

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.

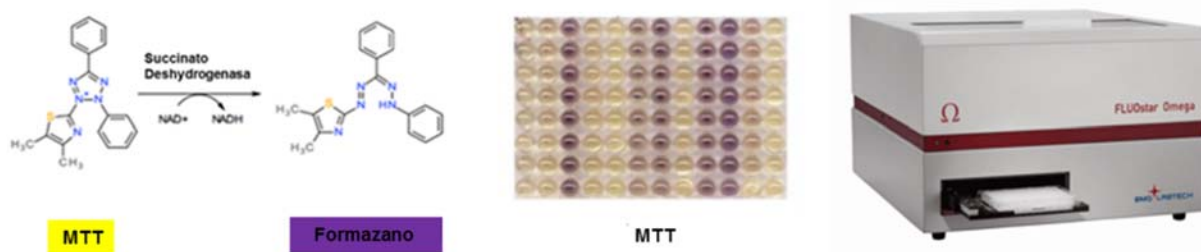


Figura 3.6. Esquema de los ensayos de viabilidad con MTT, junto al lector de placas FLUOstar Omega.

Metodología

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 esterilizar y para eliminar los residuos insolubles. Esta disolución filtrada, protegida de la luz, se puede guardar a 4°C 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 conversión del 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 es soluble en agua mediante la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. 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**).

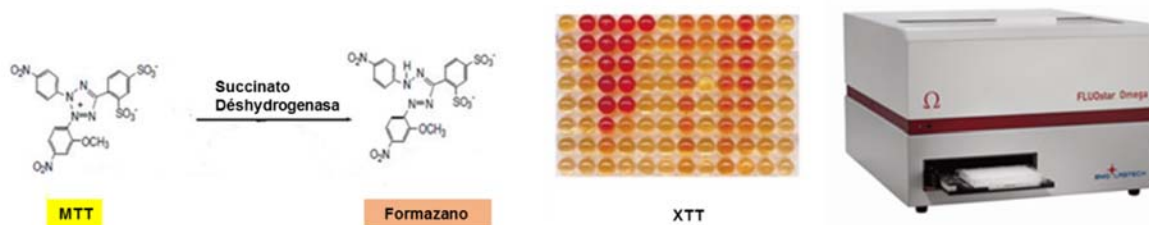


Figura 3.7. Esquema de los ensayos de viabilidad con XTT, junto al lector de placas FLUOstar Omega.

Metodología

Los ensayos con XTT se realizaron en placas de 96 pocillos. Una disolución madre de XTT (1 mg/mL) de 5 mL se preparó en medio de cultivo sin rojo fenol y sin suplementos y una disolución de menadiona (10 mM) en acetona. Se añadieron 10 μ L de esta disolución de menadiona por cada mL de disolución de XTT para preparar la disolución de trabajo. Por cada placa de 96 pocillos se prepararon 5 mL de disolución de XTT/Menadiona. En cada pocillo de

la placa de 96 pocillos, conteniendo previamente 200 μL de medio, se añadieron 50 μL de la disolución de XTT/Menadiona. La placa se agitó orbitalmente, se protegió de la luz con papel de aluminio y se incubó a 37°C. Después de 4 horas 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 XTT se realizó utilizando un lector de placas FLUOstar Omega (BMG Labtech).

3.2.2. ENSAYOS DE APOPTOSIS

3.2.2.1. Análisis de apoptosis mediante ensayo con Anexina V/7-Aminoactinomicina D

La apoptosis se puede definir como el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que concluyen con su muerte de una forma ordenada y silenciosa. La célula apoptótica sufre una serie de cambios morfológicos característicos, como la alteración de la membrana plasmática y la visualización de protuberancias irregulares, la reducción considerable del volumen celular y la condensación del citoplasma, la reducción del núcleo y la densidad de la cromatina, dividiéndose al final en varias esferas. Finalmente, la célula apoptótica es fagocitada por macrófagos o por células vecinas, evitando así la respuesta inflamatoria local ocasionada en la necrosis cuando la célula, al romperse, libera su contenido al medio.

Una de las maneras más inconfundibles de detectar la apoptosis en estadios tempranos es comprobar la localización de la fosfatidilserina en la membrana plasmática. La fosfatidilserina es un tipo de fosfolípido que en células viables se mantiene en la monocapa interior de la membrana celular. Cuando se empieza a desencadenar el proceso de la apoptosis, la fosfatidilserina migra a la capa externa de dicha membrana. Esta localización puede ser detectada fácilmente ya que la Anexina V se une específicamente a la fosfatidilserina en una reacción dependiente de calcio. 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. PE Annexin-V apoptosis detection kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 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 poder detectar apoptosis mediante diversas técnicas.

Como referencia se utiliza un colorante rojo fluorescente, el 7-aminoactinomicina D (7-ADD) que es un compuesto químico derivado de la actinomicina D y que muestra una fuerte afinidad por el ADN. En concreto, el 7-AAD se utiliza para el análisis de las células necróticas. Este colorante puede atravesar la membrana de células necróticas y de células en apoptosis tardía e intercalarse entre los pares de base C-G de su ADN. El 7-AAD se une a los ácidos nucleicos con una relación de una molécula de colorante por cada 4 ó 5 pares de bases y, una vez unido a los ácidos nucleicos, aumenta su fluorescencia entre 20-30 veces. Con esta doble tinción se pueden distinguir las poblaciones de células vivas (PE Anexina V-/7-AAD-) de las células en apoptosis temprana (PE Anexina V+/7-AAD-) y las necróticas o en apoptosis tardía (PE Anexina V+/7-AAD+) cuando se hacen pasar las células a través de un citómetro de flujo con el láser adecuado (**Figura 3.8**).

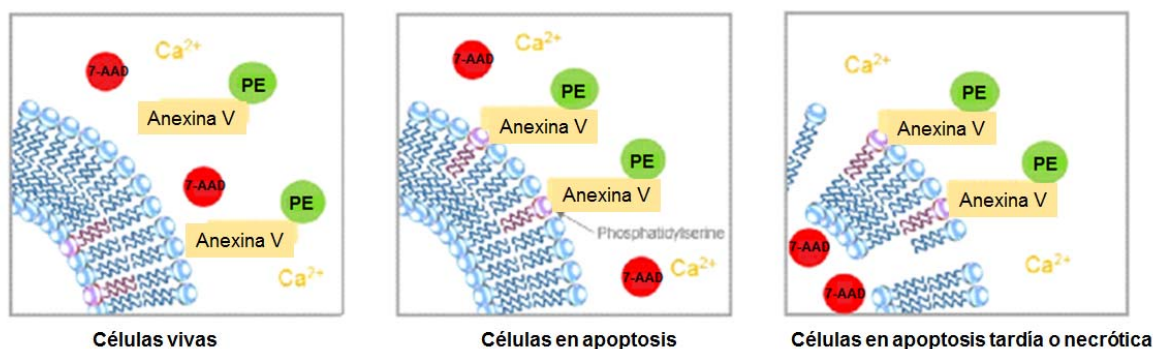


Figura 3.8. Esquema del funcionamiento del kit de detección de apoptosis PE Annexin-V.

Metodología

En general, se preparó una suspensión celular de 1×10^6 células. Después las células se lavaron con PBS (1X) y se despegaron con tripsina. Tras una centrifugación a 1.000 rpm durante 5 min, las células se lavaron y se centrifugaron otra vez. El precipitado, conteniendo las células, se resuspendió en 100 μ L de tampón de incubación (1X). Las células se transfirieron a tubos especiales donde se añadió una disolución de tinte (4 μ L de annexina acoplada a la ficoeritrina (PE) y 4 μ L de 7-AAD). Después las células se incubaron en oscuridad, a temperatura ambiente, durante 15 min. Posteriormente, se adicionaron 400 μ L del tampón de incubación a cada muestra y se hicieron pasar las células a través del citómetro de flujo (Becton Dickinson FACScanto II flow cytometer). Los datos se analizaron con el programa BD FACSDiva 6 (Becton Dickinson).

3.2.2.2. 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 (como se describió en el apartado anterior). Uno de los cambios más importantes es la fragmentación del ADN, que se produce por la activación de una endonucleasa nuclear dependiente de Ca^{+2} y Mg^{+2} y 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 acompañados 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.

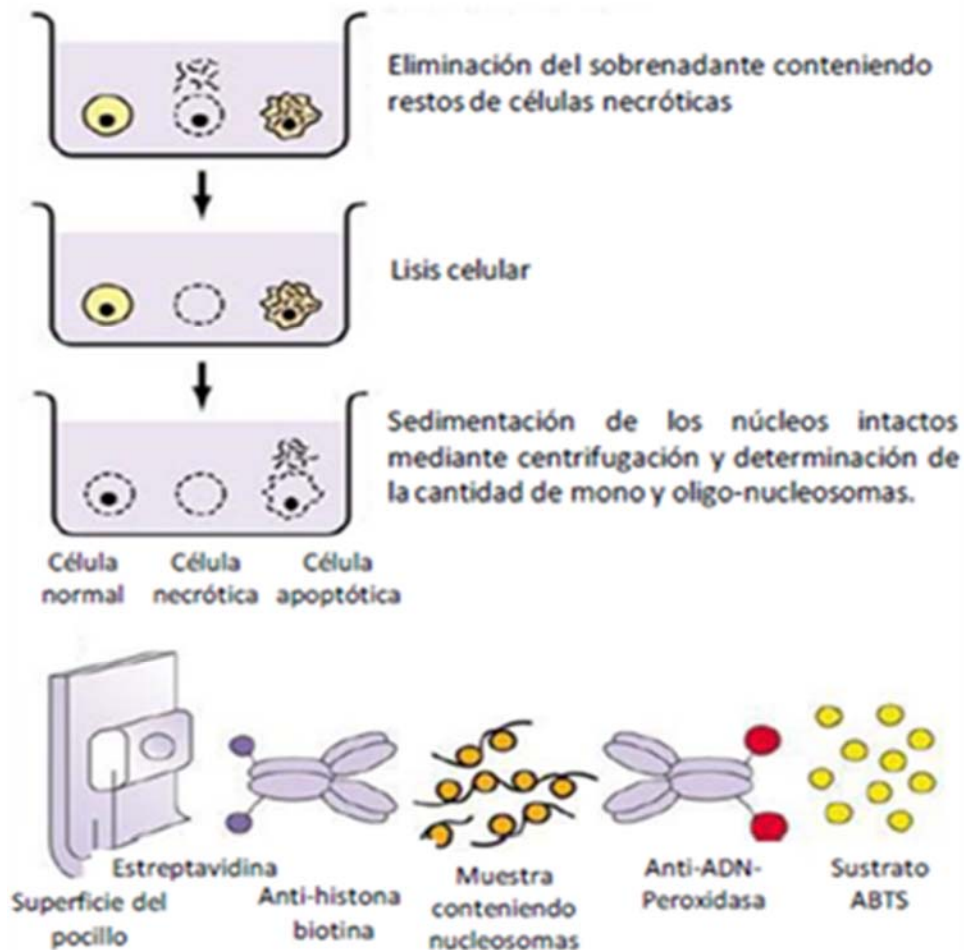


Figura 3.9. Esquema del funcionamiento del kit de detección de apoptosis mediante ELISA de Roche.

Metodología

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 ser analizado 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 μ L del sobrenadante de cada uno de los pocillos a evaluar a los pocillos de la placa de ELISA. Se añadió a cada pocillo 80 μ L 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 μ L 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 μ L 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 (**Figura 3.9**). 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 habían sido sometidos al mismo tratamiento que los pocillos que se tomaron para la lisis).

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.

Metodología

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se sometieron a las condiciones requeridas por el experimento. 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 hizo una incubación de 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. Tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, 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 para detectar las células apoptóticas con una cromatina más brillante.

3.2.3. DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE ROS INTRACELULAR

Los niveles intracelulares de las especies reactivas del oxígeno (ROS) se midieron usando una sonda fluorogénica, CMH2DCF-DA, diluida en 100 µL de DMSO (Tecnologías de la Vida, Oregon, USA). Esta sonda difunde de forma pasiva a través de la membrana citoplasmática. A continuación, los grupos de acetato se hidrolizan por esterasas intracelulares y el grupo clorometilo reacciona con grupos de tiol intracelulares, tales como glutatión. Las oxidaciones sucesivas en presencia de ROS llevan a la formación de un producto fluorescente.

Metodología

Se sembraron las células en placas de 96 pocillos a una densidad de 2.000 células por pocillo. Tras tratar las células con la molécula de interés, las células se lavaron con PBS (1X), se resuspendieron en HBSS (solución salina equilibrada) (GIBCO) y se incubaron con 10 µM de la sonda CMH2DCF-DA durante 30 minutos a 37°C en la oscuridad. La fluorescencia se detectó usando longitudes de onda de excitación y emisión de 492 y 517 nm, respectivamente.

3.2.4. 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, integradas en los tumores malignos, son capaces de degradar localmente esta barrera física. Esto les permite invadir el tejido circundante y alcanzar el sistema 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.

3.2.4.1. Ensayo de quimiotaxis (cámara de Boyden)

Las cámaras aisladas por filtros son herramientas adecuadas para determinar con exactitud el comportamiento de quimiotaxis. Esta quimiotaxis se crea entre el compartimiento inferior cubierto de medio con FCS y las células sembradas en medio sin suero sobre la matrigel. El primer prototipo de este tipo de cámaras fue construido por Boyden (Boyden, 1962). Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se midió la invasión celular en cámaras Boyden.

Metodología

Ponemos en la cámara de Boyden 170 μL de medio (DMEM) con FCS. Las células SK-MEL-28 tratadas (durante 24 y 72 h) se sembraron en medio sin suero a una densidad de 5×10^4 células por pocillo sobre el filtro cubierto con 2 mg/mL de matrigel. La cámara de Boyden se introdujo durante 24 h en un incubador. Tras este tiempo, las células se fijaron con glutaraldehído al 1% y se tiñeron con 0.1% de violeta de cristal. La invasión celular se cuantificó midiendo la absorbancia a 600 nm después de la solubilización de células teñidas con SDS al 1%. La inhibición de la capacidad de invasión de las células se presentó como un porcentaje de invasión celular.

3.2.4.2. Ensayo de migración

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se utilizó el ensayo de “cierre de herida” (el acrónimo en inglés de wound healing o también llamado streak assay) que es el método más habitual para estudiar la migración celular *in vitro*. Es un ensayo fácil, barato y ampliamente utilizado, que mimetiza la migración celular durante la cicatrización de heridas *in vivo*.

Se basa en la observación del comportamiento de una monocapa confluyente de las células a la que previamente se ha realizado una herida. Las células en el borde se moverán hacia la abertura hasta establecer nuevos contactos célula–célula, cerrando así la “herida”.

Los pasos básicos implican la creación de la herida a área libre de células en la monocapa celular, la captura de imágenes de manera periódica durante el experimento y comparación de todas las imágenes para determinar la velocidad de migración de las células. Este ensayo permite analizar tanto la migración de la monocapa como el movimiento de las células individuales.

Metodología

Se cultivan las células hasta un 90% de confluencia. El número concreto de células para crear una monocapa confluyente depende del tipo celular y se debe ajustar para cada caso. Si se usan diferentes tratamientos se debe adaptar la densidad del cultivo con el fin de que todos los cultivos estén confluentes al comienzo del experimento. Se sembraron las células (en el orden de 2.000 células por pocillo) en placas de 6 pocillos. Se hizo una herida vertical en el centro del pocillo, para ello se utilizaron puntas amarillas estériles de 200 µL y se lavaron dos veces con PBS (1X). Después, el medio se cambió por otro conteniendo los diferentes tratamientos utilizados y otro con PBS (se considera como el experimento control).

Se adquirieron fotos de las heridas a tiempo cero (T₀). Después de 24 y 72 h de incubación, las células se lavaron con PBS (1X), se fijaron con etanol frío y se tiñeron con Giemsa, y se adquirieron las fotos representativas. Los datos se presentan como el porcentaje de la migración celular. El porcentaje de la migración celular se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{La migración celular (\%)} = \frac{[T_0 - T_t - T_{\text{control}}]}{[T_0 - T_{\text{control}}]} \times 100$$

T₀: es el área de la herida medida en el tiempo cero.

T_{control}: es el área de la herida tratada con PBS.

T_t: es el área de la herida en los pocillos tratados con los diferentes tratamientos.

3.2.4.3. Ensayo de adhesión

El ensayo de adhesión nos permitió estudiar el potencial invasivo de las células a estudio. Con este método se pudo determinar la capacidad de adhesión de las células normales y las células sometidas a un tratamiento a las proteínas de la matriz extracelular (ECM). Para este ensayo, las células se trataron con 0.1 µM de macrovipecetina o cisplatino (3.75 µM) o una combinación de ambos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras sembrar las células se añadió el anticuerpo monoclonal anti-αβ₃ LM609 (10 µg/mL, Millipore). El ensayo de adhesión se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en la metodología.

Metodología

Preparación de matrices

Una solución (50 μ L) de cada proteína de la matriz extracelular (ECM) (5 μ g/mL de pol-L-lisina 5 μ g/mL de vitronectina, 5 μ g/mL de colágeno a 5 μ g/mL de laminina, μ g/mL de la fibronectina y 10 μ g/mL de fibrinógeno) se depositaron en placas de 96 pocillos. La placa se incubó durante la noche a una temperatura de 4°C. Tras este tiempo de incubación, los pocillos se incubaron con 50 μ L de PBS/BSA (1%) durante 1 h a temperatura ambiente para bloquear los sitios no específicos.

Preparación de la suspensión celular

Durante la fase de saturación, las células se lavaron con una disolución de PBS/EDTA, se centrifugaron y se lavaron 2 veces con tampón de adhesión (DMEM o EMEM con 0.2% de BSA). Las células se resuspendieron luego en el tampón de adhesión.

Fijación de las células y medida

Las células se despegaron con tripsina, se trataron, se pusieron en tubos y se incubaron durante 1 o 24 h con agitación. Tras la incubación, las células tratadas y no tratadas se pusieron en una placa de 96 pocillos que se incubaron a 37°C durante 1-2 horas. Después, las células se lavaron dos veces con DMEM o EMEM/0.2% de BSA para eliminar las células no adherentes. Las células adherentes se fijaron con glutaraldehído 1% durante 10 minutos, se lavaron dos veces con agua destilada y se tiñeron durante 30 minutos con 50 μ L de 0.1% de cristal violeta. Tras eliminar el colorante de los pocillos, las células se solubilizaron con 50 μ L de 1% de SDS. La absorbancia se midió a 600 nm con un lector de placas FLUOstar Omega (BMG Labtech).

3.2.5. MICROSCOPIA

3.2.5.1. 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 μm , 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 provoca unas variaciones de luminosidad en los elementos estudiados, permitiendo diferenciarlos del resto de la muestra y observar con mayor detalle su estructura interna.

Se utilizaron varios microscopios de contraste de fases durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral (**Figura 3.10**). Se utilizó el microscopio invertido TMS de Nikon, de forma regular, durante el seguimiento de los experimentos con cultivos celulares. Este microscopio nos permitió la visualización de las muestras en diversos recipientes con espesores y características ópticas variables (frascos de cultivo, placa de Petri, 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. Se utilizó un microscopio invertido ECLIPSE TE200-U de Nikon, equipado con una cámara fotográfica Nikon modelo DS Camera Head D-5M para la toma de fotografías de los cultivos celulares sometidos. Mientras que microscopio LABOPHOT-2 de Nikon se utilizó para el recuento de células viables en la Cámara de Neubauer o Cámara de KOVA mediante el ensayo con azul tripán.



Figura 3.10. Diferentes tipos de microscopios invertidos.

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

Microscopía de fluorescencia

El microscopio de fluorescencia es una variación del microscopio de luz ultravioleta en el que 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 las moléculas que han absorbido la excitación primaria y reemitido una luz con mayor longitud de onda. Para dejar pasar sólo la emisión secundaria deseada se deben colocar filtros apropiados debajo del condensador y encima del objetivo. Se usa para detectar sustancias con autofluorescencia (vitamina A) o sustancias marcadas con fluorocromos.

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

Microscopía confocal

El microscopio confocal es un microscopio que emplea una técnica óptica de imagen para incrementar el contraste y/o reconstruir imágenes tridimensionales utilizando un "pinhole" espacial (colimador de orificio delimitante) para eliminar la luz desenfocada o destellos de la lente en especímenes que son más gruesos que el plano focal. El pinhole es una apertura localizada delante del fotomultiplicador que evita el pasaje de fluorescencia de las regiones de la muestra que no están en foco, la luz que proviene de regiones localizadas por encima o por debajo del plano focal no converge en el pinhole y no es detectada por el fotomultiplicador de semiconductores.

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. La denominamos 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.

El espectro de excitación y espectro de emisión son dos características importantes de los fluorocromos. El espectro de excitación presenta el rango de longitudes de onda en las que un fluorocromo absorbe luz. El espectro de emisión presenta 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. Por esta razón, los microscopios confocales están equipados con láseres que emiten luz a longitudes de ondas concretas coincidiendo con los máximos de excitación de los distintos fluorocromos. Normalmente un microscopio confocal contiene varios láseres que tienen una o varias líneas de emisión: Argón (458, 476, 488, 496 y 514 nm), Helio-Neón (543 nm), Helio-Neón (633 nm), Diodo azul (405 nm), etc. Durante la realización de esta Tesis Doctoral, los fluorocromos más utilizados 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).



Figura 3.11. Microscopio confocal Leica TCS-SP2.

Se utilizó esta técnica para el análisis de la incorporación y el transporte celular de compuestos unidos a fluorocromos en células in vivo, también para el análisis de la localización y la abundancia de proteínas (control y tras someter a las células a tratamientos con distintos compuestos, silenciamiento génico, etc). Las células fueron fijadas y procesadas previamente a la observación.

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 3.11**).

Metodología para células fijadas (Immunofluorescencia indirecta)

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 y se introdujeron en un cubreobjetos esterilizado con etanol 70° a la llama. Las células se sometieron a las condiciones deseadas

como silenciamiento génico, tratamiento con compuestos, etc. y, previamente a la visualización, se realizó una inmunofluorescencia indirecta. Esta consiste en primer lugar, en la eliminación del medio de cultivo. Tras un lavado de las células dos veces con PBS, las células se fijaron con acetona fría durante 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación, 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 este tiempo, 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 en cuestión (la 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, se pusieron 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. Finalmente, las células se lavaron 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 (este compuesto tiñe los núcleos de azul a la vez que preserva la muestra y evita que se apague la fluorescencia).

3.3. TÉCNICAS DE BIOQUÍMICA

3.3.1. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El veneno de *Macrovipera lebetina* se recogió en hielo en el serpentario del Instituto Pasteur. El veneno se liofilizó (apartado 3.3.2) y se almacenó a 4°C.

Purificación de la Lebeina

La Lebeina se purificó por cromatografía líquida FPLC (cromatografía líquida rápida de proteínas) utilizando filtración en gel en una columna Superose 12 (HR 16/50) seguida por dos etapas de purificación en cromatografía de intercambio iónico, columnas Mono Q HR 5/5 y Mono S HR 5/5. A continuación, la Lebeina se purificó por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en una columna C8 de fase inversa (5 µm, 4.6 x 250 mm) (Beckman, USA). La proteína se eluyó a un flujo de 0.8 mL/min usando un gradiente de acetonitrilo del 10 al 25%. La pureza y el peso molecular aparente de la proteína purificada se evaluó por

electroforesis en gel dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE) con y sin reducción (5% β -mercaptoetanol) de acuerdo con el método de Laemmli y se confirmó por espectrometría de masas.

Purificación de la macrovipecetina

La macrovipecetina se purificó por cromatografía líquida FPLC utilizando filtración en gel en una columna Superose 12 (HR 16/50) seguido por cromatografía en columna de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5. Después, la proteína se purificó por HPLC en una columna C8 de fase inversa (5 μ m, 4.6 x 250 mm) (Beckman, USA) equilibrada en 0.1% ácido trifluoroacético (TFA) y en 10% de acetonitrilo. Finalmente, las proteínas se eluyeron a un flujo de 1 mL/min utilizando un gradiente lineal de acetonitrilo (10-80%). La pureza y el peso molecular aparente de la proteína purificada se evaluó por electroforesis en dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida al 15% en gel (SDS-PAGE) con y sin reducción (5% β -mercaptoetanol) de acuerdo con el método de Laemmli y se confirmó por espectrometría de masas.

3.3.1.1. Separación de subunidades de la proteína

La proteína macrovipecetina se redujo en 6 M de guanidina-HCl, 0.5 M Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1.4 μ M DTT, pH 7.5 durante 1 h a 37°C. Las subunidades se alquilaron con 4-vinilpiridina a una concentración final de 4 μ M durante 5 min. La reacción se detuvo con DTT (1.4 μ M de concentración final). La mezcla de reacción se desaló y las subunidades de Macrovipecetina se purificaron por cromatografía de fase inversa en una columna (C8 5 μ m, 4.6 x 250 mm) (Beckman, USA). Los disolventes A y B eran ácido trifluoroacético al 0.1% (TFA) (v/v) y TFA al 0.1% (v/v) en acetonitrilo al 100% (v/v), respectivamente. Las subunidades se eluyeron con un gradiente lineal de 10-80% B durante 65 min y 80-100% durante 10 min a un flujo de 1 mL/min, monitorizado a 214 nm.

3.3.1.2. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteína se determinó por el método BCA (Bicinchoninic acid protein) (Ensayo Kit, Sigma) utilizando diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) como estándar (tal y como se detalla en el apartado 3.3.3.1).

3.3.1.3. Digestión enzimática y química de las subunidades de la proteína

La subunidad α fue reducida y alquilada y, posteriormente, digerida con proteasas Asp-N o Lys-C (Roche Diagnostics, Basle, Suiza). Se añadió urea (concentración final 3 M) a la mezcla para asegurar la solubilidad. También la subunidad α , se escindió químicamente en sus enlaces Asn-Gly con LiOH 4.5 M en guanidina-HCL 6 M, hidroxilamina-HCL 2 M, pH 9.0. Los péptidos provenientes de las escisiones se separaron mediante cromatografía de fase inversa en una columna C8 eluída con un gradiente lineal de 10-70% B en 60 min a 1 mL/min. La subunidad β reducida y alquilada se digirió con proteasas Lys-C o Asp-N como se describió anteriormente. La escisión química después de la metionina se realizó añadiendo una solución de bromuro de cianógeno (70 mg/mL) (CNBr, Sigma, St. Louis, MO) en ácido fórmico al 70% a la subunidad β (1 mL/1 μ g de proteína) en oscuridad durante 24 h y a temperatura ambiente. La mezcla de escisión se diluyó con 10 volúmenes de agua y se concentró en un SpeedVac™. Los péptidos se purificaron como se describió anteriormente.

3.3.1.4. Secuenciación de péptidos y espectrometría de masas

Las secuencias N-terminales de las subunidades y péptidos, a partir de digestiones enzimáticas y químicas, se obtuvieron por degradación de Edman con un secuenciador Applied Biosystem 476 A equipado con HPLC con feniltiohidantoína usando una columna RP 18.

3.3.2. ANÁLISIS DE LA MASA PROTEICA POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas es una técnica analítica esencial para estudios proteómicos debido a su alta capacidad analítica, sensibilidad y precisión en la determinación de las masas moleculares de las proteínas. Las masas moleculares de las subunidades se determinaron mediante un método de electroespray de espectrometría de masas utilizando un instrumento Trio2/3000 ESI (VG Biotech). El programa BLAST se usó para alinear las secuencias de la subunidad α y β de la macrovipecetina con otras lectinas de tipo C.

3.3.3. 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. La liofilización es una forma de secar un producto químico a temperaturas muy bajas, 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.

3.3.4. ELECTROFORESIS

La técnica de separación de moléculas denominada electroforesis 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 las proteínas y los ácidos nucleicos, pudiendo utilizarse con fines analíticos y/o preparativos. Aún existen varios tipos de electroforesis, pero la más utilizada es la electroforesis zonal, que se distingue por la disolución en la que se encuentran las moléculas, que está incluida en un soporte sólido formando 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. Se pueden utilizar diferentes medios de soporte para evitar perturbaciones mecánicas y los efectos de las corrientes de convección en la separación. Como medios de soporte se pueden utilizar papel, acetato de celulosa, geles de almidón, geles de agarosa o geles de poliacrilamida. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se utilizaron geles de poliacrilamida para la separación de proteínas, (apartado 3.3.1.1).

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

Uno de los métodos de electroforesis más comúnmente aplicado para la separación de mezclas complejas proteínas es la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). Esta técnica es práctica, rápida y económica a nivel de muestra y conocida como SDS-PAGE. 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'-metilénbis-acrilamida), donde la acrilamida forma largas cadenas lineales y la bis-acrilamida da lugar a puntos de ramificación

que entrecruzan las cadenas de acrilamida. También se añade un tampón (comúnmente Tris-HCL) y un agente iniciador de la polimerización como el persulfato amónico y el TEMED (N, N, N', N'-tetrametil-etilenodiamina). En este sistema, el anión persulfato se descompone formando radicales libres que inician la reacción de polimerización, pero son poco estables.

En SDS-PAGE, la muestra de proteína se trata con un agente reductor 2-mercaptoetanol y dodecilsulfato de sodio (SDS) para romper los enlaces disulfuro e impartir una carga negativa. Esto se logra por desnaturalización por calor (100°C) durante 5 min. Las proteínas que tienen la misma densidad de carga se mueven a la misma velocidad en un campo eléctrico (desde el cátodo al ánodo) y serán separadas en función de sus tamaños (**Figura 3.12**). La muestra de proteína se fraccionó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% que comprende dos modos sucesivos de la migración en un gel de separación (Resolving gel) y un gel de concentración (Stacking gel).

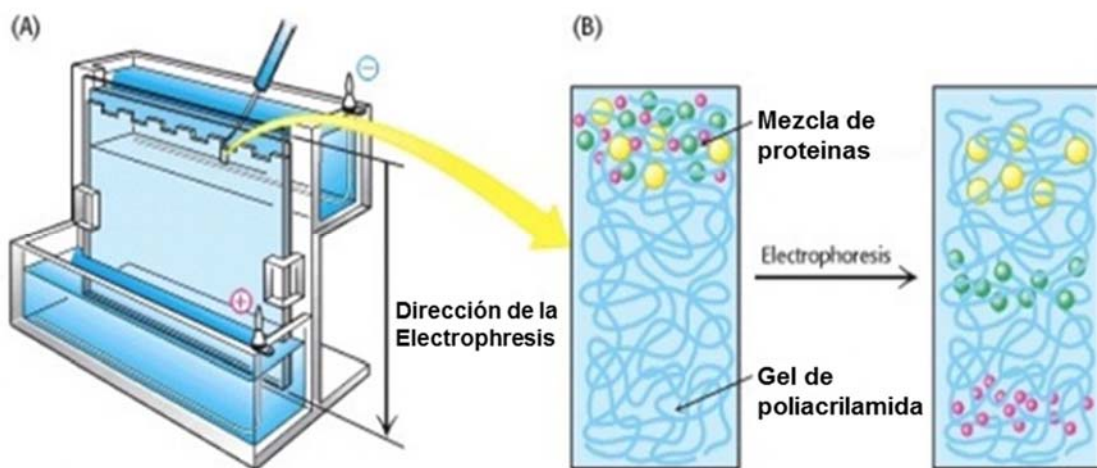


Figura 3.12. El dispositivo de la electroforesis.

(A) Esquema de la dirección de la electroforesis mostrando la fuente de tensión proporcionando el campo eléctrico mediante dos electrodos, uno positivo (ánodo) y uno negativo (cátodo); (B) Separación de las proteínas en función de su tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

Para realizar SDS-PAGE nos hemos basado sobre el método que fue descrito por Laemmli en 1970. Se trata de un tipo de electroforesis desnaturalizante. Para realizar western blot, deberíamos preparar dos geles:

- El gel superior o concentrador (4% de acrilamida) concentra las proteínas de la muestra, las cuales serán separadas por el gel inferior o separador.

- El gel separador, la movilidad está restringida por el tamaño de poro, el cual depende de la concentración de acrilamida y bisacrilamida del gel.

En el caso de los componentes de muy alto peso molecular se utilizan geles al 5%-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. Mientras que 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).

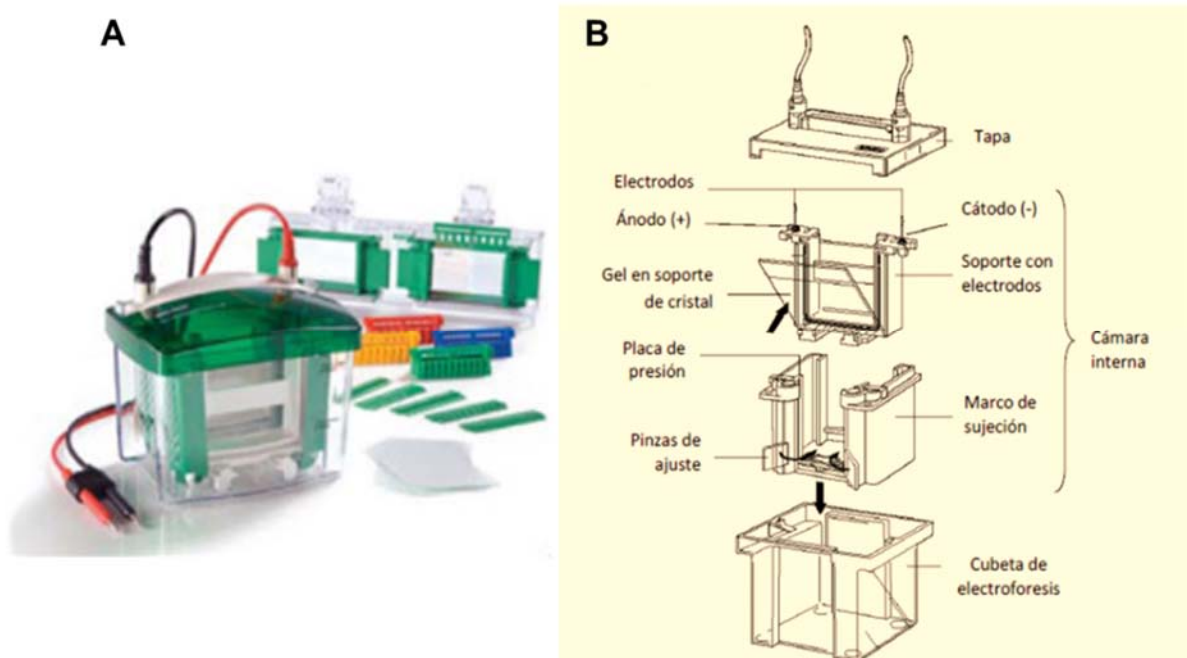


Figura 3.13. Componentes del sistema Mini Protean 3 de Bio-Rad y el Esquema de su montaje. (A) Componentes del sistema Mini Protean 3 de Bio-Rad Laboratories. (B) Esquema del montaje del sistema en la cubeta de electroforesis.

Metodología

Preparación del tampón de la muestra desnaturizante: Tampón de lisis (Laemmli)

- 2.5% SDS
- 10%
- Glicerol

-100 mM Tris pH (6.8)

Preparación de las muestras

Después de tiempo de incubación apropiado en las condiciones deseadas, se aspiró el medio. Los pocillos se lavaron 2 veces con PBS (1X) antes de añadir 100 μ L de tampón de lisis (Laemmli). Los lisados celulares se transfirieron a continuación a tubos Eppendorf y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

La concentración de los lisados obtenidos se determinó por un método colorimétrico BCA (Bicinchoninic Acid Protein Assay kit, Sigma) usando una placa de 96 pocillos. A partir de una disolución madre de BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se prepararon disoluciones de esta proteína que variaban entre 2-32 μg . Se añadió 2 μl de tampón de Laemmli a los pocillos destinados a la calibración para eliminar cualquiera interferencia del reactivo con el tampón de lisis utilizado. Para cuantificar el extracto proteico se utilizó el mismo volumen de muestra. Después de añadir la solución de BCA a todos los pocillos, la placa se incubó a 37°C durante 30 min. Por último, la absorbancia se midió a una longitud onda de 540 nm. La curva obtenida para la variación de BSA nos permitió determinar las concentraciones de proteínas en los extractos. Esto servirá para cargar la misma cantidad de proteínas en los pocillos durante la electroforesis.

A las muestras obtenidas, y una vez cuantificadas, se les añadió 2 μL de una mezcla de (100 mM β -mercaptoetanol y 0.01% de azul de bromofenol) y las muestras fueron calentadas a 95 - 100°C durante 5 minutos en un bloque calefactor para asegurar su desnaturalización. Una vez las muestras estaban preparadas, se depositaron en los pocillos del gel de electroforesis. Para poder calcular el peso molecular de las proteínas se utilizó una mezcla de marcadores preteñidos formado 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 emplearon 5 μL de marcadores por pocillo a los que se les añadió tampón de muestra desnaturalizante.

Preparación de los geles

Primero, 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 10% (p/v) de acrilamida se adicionan los siguientes componentes en las cantidades indicadas.

Gel separador (10%)

Componentes	Cantidades
Bisacrilamida 30%/ Acrilamida	3.3 mL
Tampón del gel separador (Resolving)	2.5 mL
H2O	4.2 mL
Persulfato amónico 10% (p/v)	100µL
TEMED	10µL

El tampón del gel separador (Resolving) se preparó con los siguientes componentes: Tris-Cl+0.4% SDS (4X), 1.5 M, pH = 8.8.

Gel concentrador (4%)

Componentes	Cantidades
Bisacrilamida 30%/ Acrilamida	1.3 mL
Tampón del gel concentrador (Stacking)	2.5 mL
H2O	6.2 MI
Persulfato amónico 10% (p/v)	100µL
TEMED	10µL

El tampón del gel concentrador (Stacking) se preparó con los siguientes componentes: Tris-Cl+0.4% SDS (4X), 0.5 M, pH = 6.8.

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 μL . 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 realiza una muesca debajo de la primera calle para saber en todo momento cual es la orientación de las muestras en el gel.

3.3.5. WESTERN BLOT

Para detectar proteínas de una muestra en la que hay una mezcla compleja de proteínas (un extracto celular o tisular) se utilizó la técnica analítica denominada, Western Blot. Primero, las proteínas son separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y, posteriormente, se transfieren a una membrana (de PVDF o de nitrocelulosa) 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.

Se empleó un método de inmunodetección indirecto, durante la realización de esta Tesis Doctoral. 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 (generalmente fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano).

Mediante esta técnica se puede estudiar la presencia de una proteína en una muestra y comparar sus niveles en distintas condiciones. Es necesario normalizar utilizando una proteína de referencia (indicadora de la cantidad de proteína presente en dichas muestras) para comparar los niveles de una proteína determinada en distintas 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.

Metodología

El procedimiento de Western Blot consta de 5 etapas:

Inmovilización de proteínas sobre la membrana mediante electrotransferencia

Primero, se preparó el tampón de transferencia en el orden de (10X) (30.3 g de Tris base +144 g de Glycine + H₂O). Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF, previamente incubada en etanol, mediante electrotransferencia en un tampón de transferencia (1X) que contiene 20% de etanol (Immobilon-Millipore).

Para realizar la transferencia se prepara el sistema Mini Trans Blot Cell (Bio-Rad Laboratories) (**Figura 3.14**), presentando un casete de plástico en el que se apilan los siguientes elementos sumergidos en el tampón de transferencia: esponja, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro y esponja. Se recomienda pasar un rodillo tras incorporar cada uno de estos elementos al casete para evitar que queden burbujas de aire. La transferencia se lleva a cabo durante la noche a 4°C (sala fría) a un amperaje de 100 mA. La transferencia de las proteínas se verificó mediante la tinción Amidoblack de la membrana que se prepara del siguiente modo (25% de isopropanol, ácido acético al 10%, Amidoblack 1 mg/mL). A continuación, la membrana de PVDF se decoloró con tampón decolorante (30% etanol + 10% ácido acético) y se dejó secar al aire.



Figura 3.14. Componentes del sistema Mini Protean 3 de Bio-Rad Laboratories.

Bloqueo de las uniones no específicas

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 incubó la membrana de 1-2 horas en una disolución de bloqueo a temperatura ambiente y con agitación. Las disoluciones de bloqueo más utilizadas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral fueron en PBS que contiene 5% de leche desnatada en polvo. Tras el bloqueo, la membrana se lava con PBS (1X) tres veces durante 10 min.

Incubación con anticuerpos

Se incubó la membrana con el anticuerpo primario a la concentración adecuada en una disolución de leche desnatada en polvo al 1% durante la noche a 4°C o bien durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Tras la incubación, se retiró el anticuerpo primario se lava la membrana 3 veces en PBS (1X) durante 10 minutos cada lavado. Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 a 2 horas con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa. La membrana se lava de nuevo 3 veces durante 10 minutos en PBS (1X) con agitación y la señal se revela por quimioluminiscencia (reactivo HRP o Millipore Pierce).

Revelado de la actividad peroxidasa

El revelado se hizo de dos maneras:

- En una habitación oscura, la membrana se cubre con 1 mL de la mezcla de detección utilizada para el revelado (Millipore o Pierce). En un casete, el tiempo de exposición de la película fotosensible a la membrana es variable dependiendo de la intensidad de la señal deseada y la eficacia del anticuerpo utilizado. A partir de entonces, la película se sumerge en una solución de revelado, seguida de un lavado con agua y, entonces, la señal se fija por una solución de fijación. La película se seca a continuación al aire libre.

- La membrana se incubó con la mezcla de detección (Millipore o Pierce) 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 retiró 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.

3.3.6. AISLAMIENTO DE LOS FRACCIONES NÚCLEICAS Y CITOSÓLICAS MEDIANTE FRACCIONAMIENTO CELULAR

Durante la realización de esta Tesis Doctoral, se estudió el efecto del tratamiento con Lebeina y Macrovepentina sobre la localización de la proteína AIF en el núcleo y el citoplasma de las células de melanoma. Para ello, en primer lugar, se sembraron las células en placas de 6 pocillos y se sometieron al tratamiento con Lebeina o Macrovepentina a la concentración y tiempo requeridos. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se rascaron en PBS frío. A continuación, las células se centrifugaron y se lavarón con PBS enfriado en hielo. La suspensión celular se volvió a suspender en un tampón que contenía 25 mM HEPES, pH 7.9, KCl 5 mM, MgCl₂ 0,5 mM, DTT 1 mM suplementado con inhibidores de la proteasa (Roche Diagnostics, Barcelona, España). A continuación, se añadió NP40 a una concentración final de 1% (v/v) y los lisados se incubaron durante 15 min en hielo. Los núcleos se sedimentaron por centrifugación a 2.500 rpm durante 1 min a 4°C y el sobrenadante, coresependiendo a la fracción citoplasmática se colectó y fue almacenado a - 20°C hasta su utilización. La fracción nucleica restante se lavó en el tampón 1 conteniendo 1%NP-40. Los pellets nucleicos se lisaron en tampón 2 que contiene 25 mM HEPES pH 7.9, NaCl 350 mM, 10% de sacarosa, 0.05% NP-40, 1 mM DTT e inhibidores de proteasa. La fracción nucleica se centrifugó durante 1 h a 4°C. El sobrenadante que contenía las proteínas solubles del núcleo se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min y se almacenó a - 20°C. Estos extractos fueron utilizados para la detección de proteínas en cada una de las fracciones mediante western blot tal y como se detalla en el apartado 3.3.4 de este capítulo.

3.3.7. 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. Se puede utilizar este proceso para aislar y concentrar una proteína en particular a partir de una muestra que contiene proteínas diferentes.

Para realizar el ensayo de 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. Para unirse a las inmunoglobulinas, la especificidad de estas proteínas 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.

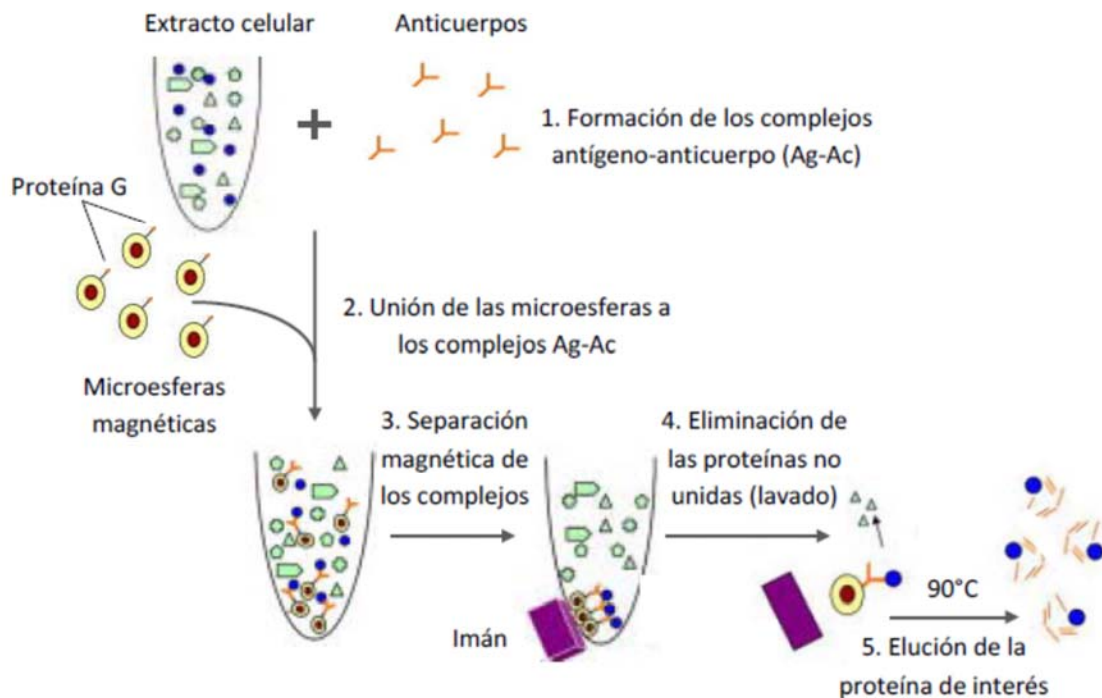


Figura 3.15. Esquema del ensayo de la inmunoprecipitación.

En el método directo, principalmente, 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 incuban 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. Se realizó el ensayo de la inmunoprecipitación durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral mediante el método indirecto para la precipitación de diversas proteínas de interés procedentes de lisados de células de cultivo sometidas a diversos tratamientos (**Figura 3.15**).

Metodología

Se sembraron las células en frascos de cultivo de 75 cm^2 y se sometieron a los tratamientos deseados para los ensayos de inmunoprecipitación. 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 μ L 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 μ L 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.

Paralelamente, se prepararon las microesferas magnéticas. Se tomaron 50 μ L de la suspensión de microesferas por cada muestra y se colocaron en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL. Para sedimentar las microesferas, se colocaron los tubos en una gradilla magnética y se retiró el tampón de almacenamiento. Se añadieron 500 μ L de PBS conteniendo un 0.1% de Tween-20 a cada tubo y se agitó 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. Tras 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. Para que la proteína G que recubre las microesferas capturara los complejos antígeno-anticuerpo, estas se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente con rotación vertical constante. Tras 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. Después, se resuspendieron las microesferas en 60 μ L de tampón de muestra desnaturizante (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 (que contiene la proteína de interés libre en solución) a un nuevo tubo. Se añadió el mismo volumen de tampón de muestra desnaturizante a la fracción no unida separada anteriormente. Las muestras así preparadas fueron utilizadas para electroforesis y western blot.

3.3.8. 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. 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). 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.

Metodología

Se realizó la inmunoprecipitación a partir de lisados celulares control o procedentes de células sometidas a los tratamientos correspondientes. De hecho, la obtención de las proteínas de interés para el análisis se hizo mediante espectrometría de masas. La inmunoprecipitación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento indicado arriba en el apartado 3.3.6 de este capítulo. En primer lugar, los tampones de lisis y dilución contenían tricostatina 2.5 μ M (inhibidor de la desacetilación) y trans-2-fenilciclo-propilamina 20 μ M (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 μ L 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 μ L 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. Por último, 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.

3.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.4.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.4.1.1. Extracción de ADN genómico

Se utilizó el kit DNeasy Tissue (QIAGEN) para la extracción del ADN genómico a partir de muestras celulares.

Metodología

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. Tras el tiempo de incubación, 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 µL 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 eluído y el tubo, y se introdujo la columna en un nuevo tubo de centrifuga de 2 mL. Posteriormente se adicionaron 500 µL 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 eluído como el tubo, y la columna se introdujo en un tubo de 1.5 mL. Se añadieron 200 µL 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.

Metodología

El ARN total se ha extraído 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. Posteriormente, esta mezcla se agitó mediante vórtex y se transfirieron 700 µL 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 µL 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 eluído y el tubo de centrifuga, y se introdujo la columna en un nuevo tubo de centrifuga de 2 mL. Se añadieron 500 µL 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 µL 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

Se utilizó el kit Illustra Quick Prep Micro mRNA Purification de GE Healthcare Life Sciences para la extracción del ARNm. 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.

Metodología

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 de células en cultivo, se resuspendieron los pellets celulares (como máximo 107 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. Tras este tiempo de incubación, 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 una columna situada en un tubo de centrifuga de 2 mL. Se centrifugó a 16.000xg durante 5 segundos y se descartó el volumen eluído. 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.

Metodología

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. Asíque, se desnaturizó 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 desnaturizada, permite desnaturizar 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 ARNasas y ARNasas e, inmediatamente antes de su uso, se preparó por cada tubo, una mezcla con los siguientes reactivos: 4.6 µL de Tampón de reacción (5X), 2.35 µL Ditioneitol (DTT; 0.1 M), 1.65 µL de Oligo-(dT)₂₀ (50 µM), 1.15 µL de dNTPs (10 mM), 0.35 µL Inhibidor de ARNasas (130 U/µL), 0.5 µL de agua libre de ARNasas. Todos estos reactivos fueron obtenidos de Invitrogen. La composición del tampón de reacción (5X) es TRIS-HCl 250 mM, KCl 375 mM y MgCl₂ 15 mM. La mezcla de dNTPs es una solución acuosa (pH 7.5) de las sales sódicas de dATP, dCTP, dGTP y dTTP.

A continuación, se añadieron 10 μ L de esta mezcla a cada tubo que contenía 10 μ L del ARN desnaturalizado y tratado con ADNasas (volumen final 20 μ L). Se agitó suavemente para mezclar los reactivos. La mezcla se calentó a 42°C durante 2 minutos hasta alcanzar la temperatura óptima para que actúe la enzima y para que los cebadores se unan al ARN. Luego se adicionó a cada tubo 1 μ L (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. 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.

3.4.3.1. PCR convencional

Se realizó PCR convencional para comprobar el funcionamiento de los primers y para la optimización de las condiciones experimentales, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral. 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.

Metodología

Todos los reactivos se mantuvieron en hielo y no se mezclaron hasta el último momento para evitar amplificaciones inespecíficas. 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.

3.4.3.2. 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. 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. Además, como fluoróforo se utilizó el agente intercalante SYBR Green I que se une con gran afinidad al surco menor del ADNc, aumentando su fluorescencia unas 1.000 veces.

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:

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

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = \text{n}^{\circ} \text{ de veces que varía la expresión de un gen tras un tratamiento, respecto al control no tratado.}$$

Metodología

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 μ L del ADNc conteniendo 0.4-0.04 μ g, 1 μ L de cada uno de los primers forward y reverse (10 μ M) y 10 μ L de la mezcla de reacción Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) que contiene el fluorocromo SYBR Green I, los cuatro dNTPs, el 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 .

3.4.4. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA

Para determinar la distribución *in vivo* de proteínas asociadas con el ADN cromosómico, se utilizó la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, acrónimo del inglés chromatin immunoprecipitation). Este proceso se aplica sobre proteínas que 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. Los ensayos de ChIP se llevaron a cabo utilizando el kit Magna ChIP™ G (Millipore) que permite la inmunoprecipitación a partir de muestras celulares en un solo día y separarlos de proteínas y otros restos celulares contaminantes.

Metodología

Entrecruzamiento y lisis

En primer lugar, se sembraron las células en frascos de cultivo de 150 cm^2 y se sometieron a las condiciones requeridas del experimento, 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. Tras la incubación, se añadieron 2 mL de glicina 10X y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para inactivar el formaldehído que quedaba sin reaccionar. Pasado este tiempo, 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 $\mu\text{L}/\text{mL}$), 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 µL 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 µL de inhibidores de proteasas.

Fragmentación del ADN

Para la realización de la fragmentación del ADN, se sometieron las muestras 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 µL (equivalentes a la cromatina de 1×10^6 células, suficiente para llevar a cabo una reacción de inmunoprecipitación). Se tomaron 5 µL 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

Primero, 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. Se distribuyó el volumen restante 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. Tras la 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 μ L de ChIP Elution Buffer conteniendo 1 μ L 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

Se utilizaron las columnas de filtración proporcionadas por el kit para la purificación de los fragmentos de ADN. En primer lugar, se adicionaron 0.5 mL de Bind Reagent A a los 100 μ L 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 eluído y se volvieron a colocar las columnas en el mismo tubo colector. Se adicionaron 500 μ L de Wash Reagent B y se volvieron a centrifugar a 10.000xg durante 30 segundos, se descartó el líquido eluído 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 eluído como los tubos colectores y se colocaron las columnas en un nuevo tubo colector. Por último, se añadieron 50 μ L 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. Se analizó este ADN 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 and Er α), así como los primers control frente al promotor del gen GAPDH. En cada pocillo se añadieron 2 μ L de muestra, 1 μ L de mezcla de primers forward y reverse (10 μ M), 12.5 μ L de SYBR Green Master Mix y 9.5 μ L de ddH₂O para completar hasta un volumen final de 25 μ L. 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 (Δ Ct) para determinar el número de copias del gen de interés coimmunoprecipitadas 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.

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen de estudio}) - Ct (\text{GAPDH en el Input})$$

$$2^{-\Delta Ct} = \text{copias del gen de interés co-inmunoprecipitadas/copia de GAPDH en el Input}$$

3.4.5. 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. 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 cáncer de mama. 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 1Control Duplex (Invitrogen) con un contenido en GC bajo, medio o alto en función del porcentaje de GC del ARNi utilizado en cada caso.

Metodología

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 μ L de Lipofectamine 2.000 y 25 μ L de Opti-MEM y, por otra parte, una mezcla de 15 pmoles del ARNi correspondiente y 25 μ L 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 μ L/pocillo de la mezcla de transfección y 100 μ L/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 RTqPCR 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. BIOINFORMÁTICA

3.5.1. MODELIZACIÓN MOLECULAR

El programa Protein Data Bank permite encontrar la mayoría de las estructuras de proteínas (Koh *et al.*, 2006) y una gran cantidad de estructuras de la misma molécula con o sin ligando, lo que permite de obtener una información relevante sobre la molécula de interés mediante la modelización comparativa (Scarborough *et al.*, 1991). El modelo de estructura tridimensional de la proteína macrovipecetina se obtuvo utilizando modelos comparativos mediante el programa MODELLER. El modelo se ha identificado utilizando el programa BLAST para poder buscar el Banco de datos de proteínas (PDB) en el orden de determinar los homólogos de las dos cadenas α y β de la macrovipecetina. La alineación de las secuencias en cuestión con la matriz identificada (template) se establece con el método desarrollado por Needleman y Wunsch que utiliza un algoritmo de programación dinámica implementado en el programa EMBOSS para lograr una alineación global optimizada por inspección visual (para mejor alinear los elementos de la estructura secundaria). La alineación se usa para extraer las restricciones espaciales de la estructura del modelo y para determinar el modelo 3D del macrovipecetina usando el programa MODELLER (versión 9.16). Se generaron alrededor de 20 estructuras de macrovipecetina para cada cadena y los modelos obtenidos se optimizaron mediante una minimización del gradiente conjugado y una dinámica molecular. La calidad global de la energía se evaluó calculando el marcador DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) para cada modelo. La calidad estereoquímica de la estructura y los perfiles de energía del modelo (empaquetamiento de aminoácidos) se calcularon y evaluaron usando el diagrama de Ramachandran y Prosa plots. La selección del modelo se realizó siguiendo el conjunto de marcadores DOPE asociados con una visualización del modelo en Pymol.

3.5.2. ACOPLAMIENTO MOLECULAR

El acoplamiento molecular es una técnica utilizada para simular la interacción entre un "receptor" (una proteína) y su ligando (a menudo una pequeña molécula). Varios programas (Softwares) especializados permiten de realizar este tipo de simulación (DOCK, AUTODOCK et AUTODOCK VINA, GLIDE, GOLD, RosettaDock, ZDOCK (proteína / proteína) HADDOCK (proteína / proteína), CHARMM).

El modelo seleccionado de la macrovipecetina se usó para determinar la interacción de nuestra proteína a la integrina $\alpha\beta3$ (proteína-proteína). Para determinar esta interacción, se utilizó una estructura cristalina de la integrina en complejo con el péptido cíclico RGDF (código PDB:

1L5G) a partir de que hemos eliminado el segmento 440 a 956 de la cadena A y 532 a 690 de la cadena B. La estructura del receptor consistió así en un dominio de hélice β y un dominio híbrido β 1. El servidor ClusPro se utilizó para efectuar el acoplamiento, combinando una transformación rápida de muestreo, que es un paso de reagrupación y refinamiento de la minimización de energía usando el programa CHARMM (Comeau *et al*, 2004; Kozakov *et al.*, 2017). Los complejos obtenidos se analizaron basándose en las condiciones electrostáticas y a van der Waals juntas (vdW + Elec).

3.6. ESTADÍSTICA

Los resultados de los experimentos recogidos en esta Memoria se expresan como media \pm de la desviación estándar (SD) o la Error estándar de la media (SEM) de una serie de medidas comprendidas entre 2 y 6 repeticiones, dependiendo del experimento en concreto.

La diferencia estadística entre distintos grupos experimentales se evaluó con el programa Microsoft Excel utilizando el método paramétrico de la t de Student.

En otros casos, la diferencia estadística entre distintos grupos experimentales se evaluó con el programa Graph Pad Prism 7 utilizando dos métodos:

- El método One Way Anova (Cuando se debe comparar entre diferentes grupos con un solo factor).
- El método Two Way Anova (Cuando se debe comparar entre diferentes grupos con dos factores)

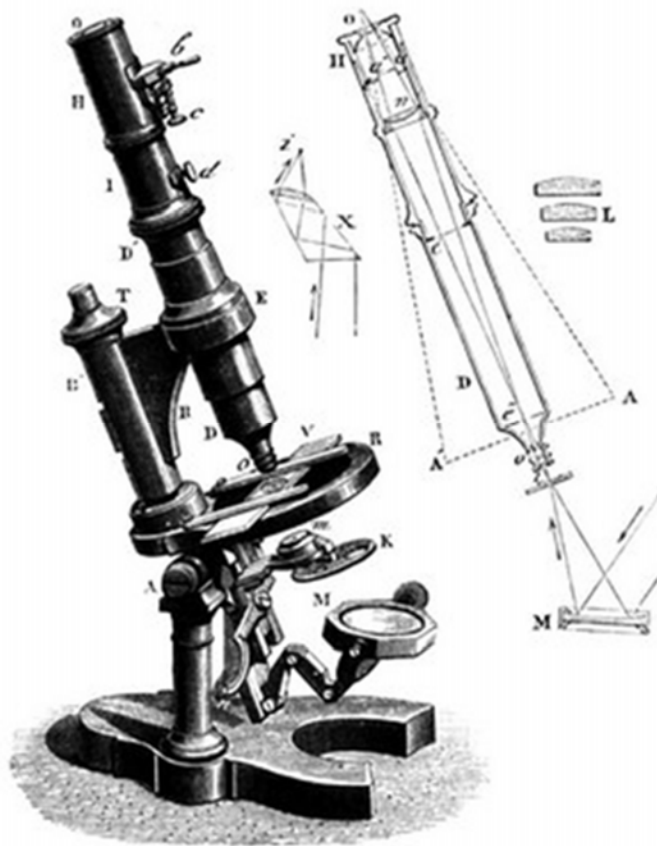
En todos los casos, se consideró la existencia de una diferencia significativa cuando $P < 0.05$.

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 píxeles 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 3.2.2.2 de esta memoria.

CHAPITRE 3



MATERIEL & METHODES

*Le génie se fait avec 1 % de
Talent et 99 % de travail.*

Albert Einstein

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. MODÈLES EXPÉRIMENTAUX

3.1.1. CULTURE CELLULAIRE

Durant la réalisation de cette thèse, plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées. La maintenance et les expériences de culture cellulaire ont été réalisées à l'Institut Pasteur, Université de Tunis El Manar et à la section de la culture tissulaire (SCT) de l'Université de Murcie en utilisant une hôte laminaire verticale de biosécurité biologique et chimique classe II (modèle Cytostar de Telstar) pour assurer à la fois la sécurité de l'étudiant et l'environnement extérieur comme la stérilité de la culture.

Les cellules ont été maintenues un incubateur à CO₂ dans des conditions de température et d'humidité contrôlées (Steri-Cult 3310 Thermo Scientific, 5% de CO₂). Les lignées cellulaires ont été congelés dans les conditions indiquées par le fournisseur et stockés dans des réservoirs d'azote liquide (MVE Cryo système 4000 Cryo Solutions et LS3000 Taylor-Wharton de Système de laboratoire) pour la conservation à long terme. L'hôte à flux laminaire, les incubateurs et un réservoir d'azote liquide sont représentés dans la **Figure 3.1**.



Figure 3.1. Les équipements nécessaires dans une pièce de culture cellulaire.

Hôte Cytostar de flux laminaire verticale de sécurité biologique et chimique classe II Telstar (à la position gauche). Incubateurs à CO₂ Steri-Cult 3310 Thermo Scientific (position centrale). Réservoir d'azote liquide MVE Cryo système 4000 Cryo Solutions LS3000 (à la position droite).

Les courbes de croissance ont été effectuées avant de commencer à travailler avec chacune des lignées cellulaires pour établir la relation entre le nombre de cellulesensemencées par unité de surface et la durée de chacune des phases de prolifération cellulaire. Généralement, ces courbes de croissance se distinguent par trois phases : la phase de latence, la phase logarithmique et exponentielle et la phase stationnaire ou plateau (**Figure 3.2**).

Pour s'assurer de la viabilité, la stabilité génétique et phénotypique des lignées cellulaires, les courbes de croissance doivent être maintenues en phase exponentielle, par conséquent, les cellules doivent être passées régulièrement avant qu'elles atteignent 100% de confluence. En outre, dans tous les cas pour assurer la préservation des caractéristiques de la lignée cellulaire d'origine, les cellules utilisées durant cette thèse n'ont pas dépassé 15 passages après leurs décongélation.

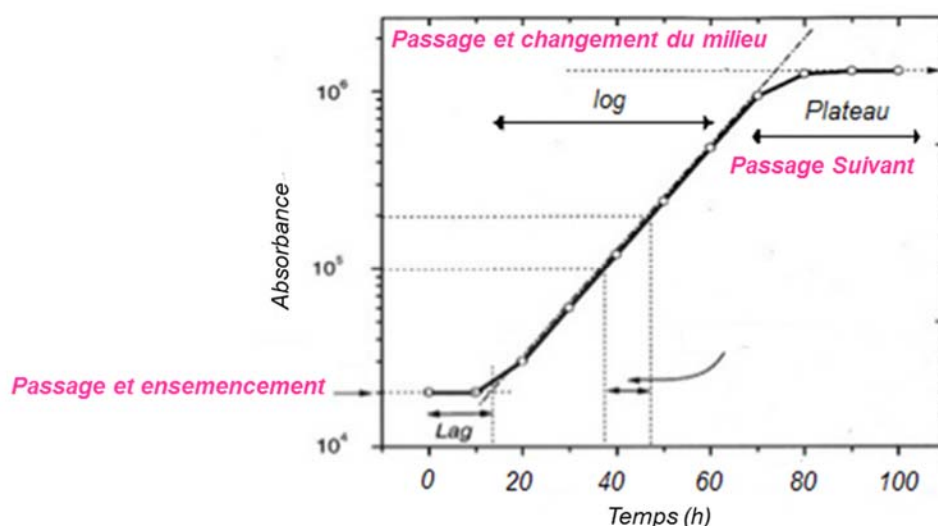


Figure 3.2. Les courbes de croissance indiquant les différentes phases de la prolifération cellulaire.

** Différentes lignées cellulaires tumorales ont été utilisées comme modèles cellulaires pour évaluer l'effet anti tumoral de biomolécules d'intérêt.

- Quatres lignées cellulaires de mélanome :

- ✓ SK-MEL-28 à p53 muté (mut p53).
- ✓ LU-1205 (wt p53) ; A375 (wt p53) et IGR-39 (wt p53) à p53 gène sauvage.

- Deux lignées cellulaires du cancer du sein :

- ✓ MDA-MB-231 n'exprimant pas le récepteur d'œstrogène (ER-négatif).
- ✓ MCF-7 avec exprimant le récepteur d'oestrogène (ER-positif).

- Une lignée cellulaire de kératinocytes humains (HACAT).

Ces cellules ont été cultivées dans un milieu de culture EMEM (milieu essentiel minimum d'Eagle) ou DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) (Invitrogen) additionné de 10% de SVF (FCS) (FCS, Dutscher, France) préalablement décomplémenté (30 min à 56 °C) avec l'ajout d'autres éléments dépendant de la lignée cellulaire. Les lignées cellulaires ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. En ce qui concerne les lignées cellulaires du cancer du sein, pour des expériences en absence d'hormones, les cellules ont été maintenues pendant trois jours dans du DMEM avec du rouge de phénol plus 2,5% de SVF – dextran-charcoal-stripped (Life Technologies, Barcelone, Espagne).

Le protocole de la culture cellulaire pour chaque lignée cellulaire est détaillé ci-dessous.

3.1.2. DECONGELATION ET CULTURE CELLULAIRE

Les cellules, préalablement congelés et placés dans de l'azote liquide ou à -80 °C sont rapidement décongelés dans un bain-marie (37° C). Ensuite, elles sont transférées dans un tube contenant 10 mL de DMEM ou EMEM et centrifugées à 1000 rpm pendant 5 min. Après élimination du surnageant, les cellules sontensemencées dans une boîte de pétri ou dans un flasque avec 10 mL de milieu complet et incubées à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂.

Les cellules sontensemencées en monocouches et régulièrement observées au microscope inversé à contraste de phase. Lorsque les cellules atteignent l'état de confluence, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont lavées deux fois avec du PBS (1X). Les cellules adhérentes ont été détachées en utilisant 1 mL de trypsine/EDTA (Invitrogen) pendant 1-2 minutes à 37 °C et collectées dans 10 mL de milieu de culture. Les cellules ont ensuite été dénombrées à l'aide de cellules Kova (KOVA, GLASSTIC, Slide10, Hycor), ou de cellules Neubauer ou à l'aide d'un compteur automatique. La viabilité cellulaire a été évaluée par la méthode d'exclusion de bleu de trypan.

3.1.3. CONSERVATION DES CELLULES

Les cellules en phase de croissance exponentielle sont détachées par trypsine / EDTA. Les cellules sont lavées avec du PBS (1X) et centrifugées à 1000 rpm pendant 5 min. Le culot est remis en suspension dans 50 % du milieu EMEM contenant du DMEM froid additionné de 40 % de SVF et 10 % de DMSO stérile. Les cellules sont réparties dans des cryotubes de 1 mL. Ensuite, celles-ci sont immédiatement placées à - 80 ° C. Après 24 heures, les cryo-tubes sont stockés dans de l'azote liquide.

Conditions de culture des différentes lignées cellulaires utilisées :

SK-MEL-28

ORGANISME : *Homo Sapiens* (Humain).

ORIGINE : Peau, mélanome malin.

AGE : 51 ans. ; **SEXE :** Masculin.

MORPHOLOGIE : Polygonal ; **TYPE DE CROISSANCE :** Adhérente.

TEMPS DE CROISSANCE : 40 heures.

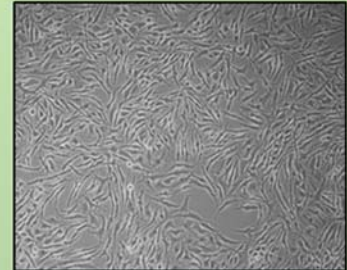
MILIEU DE CULTURE : Milieu Minimum Essentiel de Eagle (EMEM) + Glutamine 2 mM + 1% acides aminés non essentiels + Pyruvate 1 mM + 10% SVF.

ATMOSPHERE: 5% CO₂ ; 95% Humidité. **TEMPERATURE:** 37°C.

CONSERVATION : Stockage dans 50 % de milieu de culture + 40 % de SVF + 10 % DMSO (v/v) dans un réservoir d'azote liquide en phase vapeur.

PROTOCOLE DE CULTURE CELLULAIRE

1. Aspirer le milieu de culture.
2. Laver les cellules avec du PBS (1X) ou avec de la trypsine 0,25% (p/v) -EDTA 0.53 mM pour éliminer les restes du sérum.
3. Ajouter 2 mL de trypsine-EDTA. Incuber à 37°C pour faciliter le détachement des cellules (3-5 minutes) et les observer au microscope.
4. Une fois les cellules se détachent, nous ajoutons 8 mL de milieu de culture pour neutraliser la trypsine, agiter les cellules avec la pipete et passer le contenu dans un tube.
5. Centrifuger a 200xg durant 10 minutes, aspirer le surnageant et resuspendre le culot dans le volume approprié du milieu de culture.
6. Compter les cellules et ajouter la suspension cellulaire (nombre voulu) à nouveau dans un flasque ou une boîte de pétri. Le nombre de cellules recommandé à mettre en culture est à de $1-2 \cdot 10^4 \text{ cm}^2$.
7. Incuber les cellules à 37°C et changer le milieu chaque 2 à 3 jours. Passer les cellules quand elles arrivent approximativement à 80-90% de confluence.



LU-1205

ORGANISME : *Homo Sapiens* (Humain).

ORIGINE : Métastases pulmonaires des cellulase WM793, peau.

AGE : 37 ans. ; **SEXE** : Masculin.

MORPHOLOGIE : Epithéliale ; **TYPE DE CROISSANCE** : Adhérente.

TEMPS DE CROISSANCE : 40 heures.

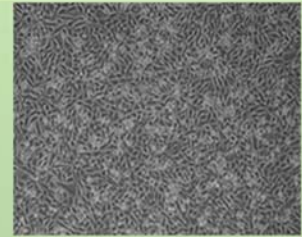
MILIEU DE CULTURE : Milieu Minimum Essentiel de Eagle (EMEM) + Glutamine 2 mM + 1% acides aminés non essentiels + Pyruvate 1 mM + 10% SVF.

ATMOSPHERE: 5% CO₂ ; 95% Humidité. **TEMPERATURE**: 37°C.

CONSERVATION : Stockage dans 50 % de milieu de culture + 40 % de SVF + 10 % DMSO (v/v) dans un réservoir d'azote liquide en phase vapeur.

PROTOCOLE DE CULTURE CELLULAIRE

1. Aspirer le milieu de culture.
2. Laver les cellules avec du PBS (1X) ou avec de la trypsine 0,25% (p/v) -EDTA 0.53 mM pour éliminer les restes du sérum.
3. Ajouter 2 mL de trypsine-EDTA. Incuber à 37°C pour faciliter le détachement des cellules (3-5 minutes) et les observer au microscope.
4. Une fois les cellules se détachent, nous ajoutons 8 mL de milieu de culture pour neutraliser la trypsine, agiter les cellules avec la pipete et passer le contenu dans un tube.
5. Centrifuger a 200xg durant 10 minutes, aspirer le surnageant et resuspendre le culot dans le volume approprié du milieu de culture.
6. Compter les cellules et ajouter la suspension cellulaire (nombre voulu) à nouveau dans un flasque ou une boite de pétri. Le nombre de cellules recommandé à mettre en culture est à de $1-2 \cdot 10^4 \text{ Cm}^2$.
7. Incuber les cellules à 37°C et changer le milieu chaque 2 à 3 jours. Passer les cellules quand elles arrivent approximativement à 80-90% de confluence.



IGR-39

ORGANISME : *Homo sapiens* (Humain).

ORIGINE : Peau ; mélanome malin.

AGE : 26 ans ; **SEXE :** Masculin.

MORPHOLOGIE : Epithéliale ; **TYPE DE CROISSANCE :** Adhérente.

TEMPS DE CROISSANCE 30 heures.

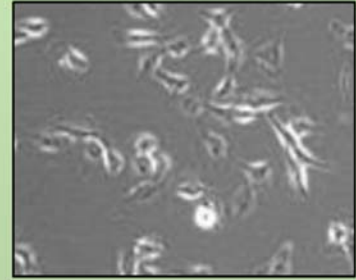
MILIEU DE CULTURE : Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Glucose 4.5 g/L) + Glutamine 2 mM + 10% SVF.

ATMOSPHERE : 5% CO₂, 95% Humidité; **TEMPERATURE :** 37°C.

CONSERVATION : Conservation dans 50 % du milieu de culture complet + 40 % SVF + 10% DMSO (v/v) dans un réservoir d'azote liquide en phase vapeur.

PROTOCOLE DE CULTURE CELLULAIRE

1. Aspirer le milieu de culture.
2. Laver les cellules avec du PBS (1X) ou avec de la trypsine 0,25% (p/v) -EDTA 0.53 mM pour éliminer les restes du sérum.
3. Ajouter 2 mL de trypsine-EDTA. Incuber à 37°C pour faciliter le détachement des cellules (3-5 minutes) et les observer au microscope.
4. Une fois les cellules se détachent, nous ajoutons 8 mL de milieu de culture pour neutraliser la trypsine, agiter les cellules avec la pipete et passer le contenu dans un tube.
5. Centrifuger a 200xg durant 10 minutes, aspirer le surnageant et resuspendre le culot dans le volume approprié du milieu de culture.
6. Compter les cellules et ajouter la suspension cellulaire (nombre voulu) à nouveau dans un flasque ou une boîte de pétri. Le nombre de cellules recommandé à mettre en culture est à de $2-3 \cdot 10^4 \text{ cm}^2$.
7. Incuber les cellules à 37°C et changer le milieu chaque 2 à 3 jours. Passer les cellules quand elles arrivent approximativement à 70-80% de confluence.

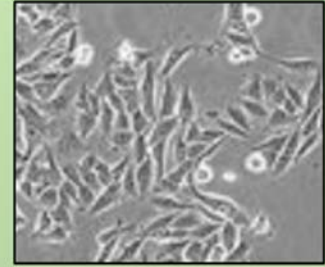


A375

ORGANISME : *Homo Sapiens* (Humain).

ORIGINE : Peau, mélanome malin.

AGE : 54 ans. ; **SEXE :** Féminin.



MORPHOLOGIE : Epithéliale ; **TYPE DE CROISSANCE :** Adhérente.

TEMPS DE CROISSANCE : 30 heures.

MILIEU DE CULTURE : Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Glucose 4.5 g/L) + Glutamine 2 mM + 10% SVF.

ATMOSPHERE: 5% CO₂ ; 95% Humidité. **TEMPERATURE:** 37°C.

CONSERVATION : Stockage dans 50 % de milieu de culture + 40 % de SVF + 10 % DMSO (v/v) dans un réservoir d'azote liquide en phase vapeur.

PROTOCOLE DE CULTURE CELLULAIRE

1. Aspirer le milieu de culture.
2. Laver les cellules avec du PBS (1X) ou avec de la trypsine 0,25% (p/v) -EDTA 0.53 mM pour éliminer les restes du sérum.
3. Ajouter 2 mL de trypsine-EDTA. Incuber à 37°C pour faciliter le détachement des cellules (3-5 minutes) et les observer au microscope.
4. Une fois les cellules se détachent, nous ajoutons 8 mL de milieu de culture pour neutraliser la trypsine, agiter les cellules avec la pipete et passer le contenu dans un tube.
5. Centrifuger a 200xg durant 10 minutes, aspirer le surnageant et resuspendre le culot dans le volume approprié du milieu de culture.
6. Compter les cellules et ajouter la suspension cellulaire (nombre voulu) à nouveau dans un flasque ou une boite de pétri. Le nombre de cellules recommandé à mettre en culture est à de $1-3 \cdot 10^4 \text{ Cm}^2$.
7. Incuber les cellules à 37°C et changer le milieu chaque 2 à 3 jours. Passer les cellules quand elles arrivent approximativement à 80-90% de confluence.

MCF7

ORGANISME : *Homo Sapiens* (Humain).

ORIGINE : Glandes mammaires dérivant des métastases pleurales d'adénocarcinomes de sein.

AGE : 69 ans. ; **SEXE :** Féminin.

MORPHOLOGIE : Epithéliale ; **TYPE DE CROISSANCE :** Adhérente.

TEMPS DE CROISSANCE : 52 heures.

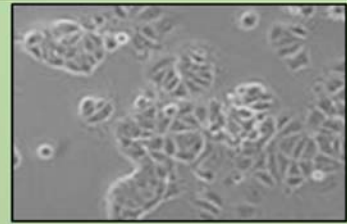
MILIEU DE CULTURE : Milieu Minimum Essentiel de Eagle (EMEM) + Glutamine 2 mM + 1% acides aminés non essentiels + Pyruvate 1 mM + 10% SVF + Insuline 0,01mg/ML.

ATMOSPHERE: 5% CO₂ ; 95% Humidité. **TEMPERATURE:** 37°C.

CONSERVATION : Stockage dans 50 % de milieu de culture + 40 % de SVF + 10 % DMSO (v/v) dans un réservoir d'azote liquide en phase vapeur.

PROTOCOLE DE CULTURE CELLULAIRE

1. Aspirer le milieu de culture.
2. Laver les cellules avec du PBS (1X) ou avec de la trypsine 0,25% (p/v) -EDTA 0,25 mM pour éliminer les restes du sérum.
3. Ajouter 2 mL de trypsine-EDTA. Incuber à 37°C pour faciliter le détachement des cellules (3-5 minutes) et les observer au microscope.
4. Une fois les cellules se détachent, nous ajoutons 8 mL de milieu de culture pour neutraliser la trypsine, agiter les cellules avec la pipete et passer le contenu dans un tube.
5. Centrifuger a 200xg durant 10 minutes, aspirer le surnageant et resuspendre le culot dans le volume approprié du milieu de culture.
6. Compter les cellules et ajouter la suspension cellulaire (nombre voulu) à nouveau dans un flasque ou une boîte de pétri. Le nombre de cellules recommandé à mettre en culture est à de $2-4 \cdot 10^4 \text{ Cm}^2$.
7. Incuber les cellules à 37°C et changer le milieu chaque 2 à 3 jours. Passer les cellules quand elles arrivent approximativement à 80-90% de confluence.



MDA-MB-231

ORGANISME : *Homo Sapiens* (Humain).

ORIGINE : Glandes mammaires dérivant des métastases pleurales d'adénocarcinomes de sein:

AGE : 51 ans. ; **SEXE :** Féminin.

MORPHOLOGIE : Epithéliale ; **TYPE DE CROISSANCE :** Adhérente.

TEMPS DE CROISSANCE : 52 heures.

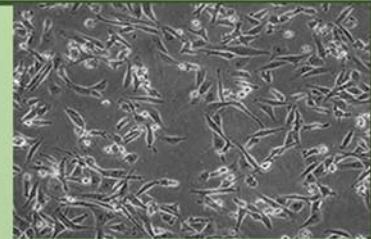
MILIEU DE CULTURE : Milieu Minimum Essentiel de Eagle (EMEM) + Glutamine 2 mM + 1% acides aminés non essentiels + Pyruvate 1 mM + 10% SVF.

ATMOSPHERE: sans CO₂ ; 95% Humidité. **TEMPERATURE:** 37°C.

CONSERVATION : Stockage dans 50 % de milieu de culture + 40 % de SVF + 10 % DMSO (v/v) dans un réservoir d'azote liquide en phase vapeur.

PROTOCOLE DE CULTURE CELLULAIRE

1. Aspirer le milieu de culture.
2. Laver les cellules avec du PBS (1X) ou avec de la trypsine 0,25% (p/v) -EDTA 0.53 mM pour éliminer les restes du sérum.
3. Ajouter 2 mL de trypsine-EDTA. Incuber à 37°C pour faciliter le détachement des cellules (3-5 minutes) et les observer au microscope.
4. Une fois les cellules se détachent, nous ajoutons 8 mL de milieu de culture pour neutraliser la trypsine, agiter les cellules avec la pipete et passer le contenu dans un tube.
5. Centrifuger a 200xg durant 10 minutes, aspirer le surnageant et resuspendre le culot dans le volume approprié du milieu de culture.
6. Compter les cellules et ajouter la suspension cellulaire (nombre voulu) à nouveau dans un flasque. Le nombre de cellules recommandé à mettre en culture est à de $2-4 \cdot 10^4 \text{ Cm}^2$.
7. Incuber les cellules à 37°C et changer le milieu chaque 2 à 3 jours. Passer les cellules quand elles arrivent approximativement à 80-90% de confluence.



HACAT

ORGANISME : *Homo Sapiens* (Humain).

ORIGINE : kératinocytes

AGE : 62 ans. ; **SEXE :** Masculin.

MORPHOLOGIE : Peau ; **TYPE DE CROISSANCE :** Adhérente.

TEMPS DE CROISSANCE : 52 heures.

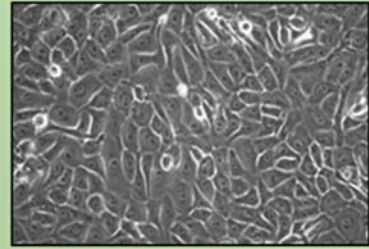
MILIEU DE CULTURE : Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Glucose 4.5 g/L) + Glutamine 2 mM + 10% SVF

ATMOSPHERE: 5% CO₂ ; 95% Humidité. **TEMPERATURE:** 37°C.

CONSERVATION : Stockage dans 50 % de milieu de culture + 40 % de SVF + 10 % DMSO (v/v) dans un réservoir d'azote liquide en phase vapeur.

PROTOCOLE DE CULTURE CELLULAIRE

1. Aspirer le milieu de culture.
2. Laver les cellules avec du PBS (1X) ou avec de la trypsine 0,25% (p/v) -EDTA 0,25 mM pour éliminer les restes du sérum.
3. Ajouter 2 mL de trypsine-EDTA. Incuber à 37°C pour faciliter le détachement des cellules (2-3 minutes) et les observer au microscope.
4. Une fois les cellules se détachent, nous ajoutons 8 mL de milieu de culture pour neutraliser la trypsine, agiter les cellules avec la pipete et passer le contenu dans un tube.
5. Centrifuger a 200xg durant 10 minutes, aspirer le surnageant et resuspendre le culot dans le volume approprié du milieu de culture.
6. Compter les cellules et ajouter la suspension cellulaire (nombre voulu) à nouveau dans un flasque ou une boîte de pétri. Le nombre de cellules recommandé à mettre en culture est à de $1 \cdot 10^4 \text{ Cm}^2$.
7. Incuber les cellules à 37°C et changer le milieu chaque 2 à 3 jours. Passer les cellules quand elles arrivent approximativement à 80% de confluence.



3.2. TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE

3.2.1. TESTS DE VIABILITE CELLULAIRE

3.2.1.1. Test d'exclusion de bleu de trypan

Le bleu de Trypan (bleu de diamine ou bleu de niagra) est un colorant azoïque dérivé de la toluidine utilisé pour la quantification de la viabilité cellulaire, car il est un colorant vital capable de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes. Avec cette coloration, les cellules vivantes ne se colorent pas parce que la membrane cellulaire est sélective aux composés qui peuvent la pénétrer. Par conséquent, le bleu de trypan est capable de traverser la membrane des cellules mortes et non pas celle des cellules viables car leurs membranes sont intactes. De cette façon, on peut distinguer au microscope les cellules mortes, qui sont colorées avec un bleu des cellules vivantes qui apparaissent sans coloration. Cette méthode colorimétrique, est également appelée méthode de coloration d'exclusion permettant de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes, mais ne nous permette pas de distinguer entre les cellules mortes par nécrose ou apoptose. Le processus général pour faire un comptage au bleu de trypan consiste à mélanger des volumes égaux de la suspension cellulaire à compter et une solution de bleu de trypan 0,4%. La suspension cellulaire est homogénéisée et peut être soumise à un comptage. Au cours de cette thèse, le comptage a été effectué en utilisant un hémocytomètre ou la cellule de Neubauer, cellule de *Kova*, ou en utilisant le compteur cellulaire automatique TC10 Bio-Rad Laboratories.

- **Cellule de KOVA**

La cellule de KOVA est une lame spécialisée. Sa dimension extérieure est de 3 mm x 3 mm. Chaque cellule comprend 10 cellules de *Kova*. Chacune comprend neuf grands carreaux. Chaque carreau comprend une grille de neuf petits carreaux de 0,33 mm. Cela permet de calculer le nombre de cellules par unité de volume (concentration) de la suspension cellulaire de départ, en tenant compte du facteur de dilution avec le bleu de trypan. Pour compter les cellules vivantes (non colorées) et mortes (colorées en bleu) dans chacun des neuf carreaux de 0,33 mm, la cellule de *kova* est observée sous microscope optique et une moyenne du nombre des cellules est calculée en divisant le nombre trouvé sur 9 carreaux. Le nombre de cellules viables, mortes et totales par mL de suspension cellulaire de départ a été calculé comme suit :

Nombre de cellules viables / mL = cellules viables moyenne par boîte x10000 x Facteur de dilution.

Nombre de cellules mortes / mL = cellules viables moyenne par boîte x10000 x Facteur de dilution.

Nombre de cellules mortes / mL = cellules total moyen par boîte x10000 x Facteur de dilution.

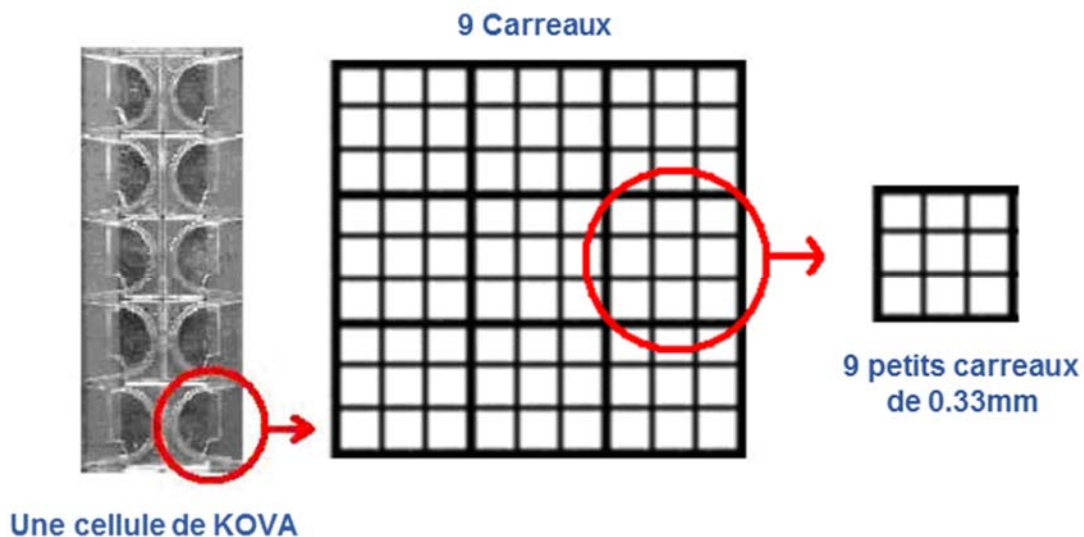


Figure 3.3. Schéma de la cellule de KOVA (utilisée pour les comptages cellulaires montrant ses différents constituants).

- Hémacytomètre ou Cellule de Neubauer

Le hémacytomètre est un dispositif qui présente une légère dépression constitué d'un réseau de carrés. Cette grille a des dimensions de 3 mm x 3 mm et elle est divisée en 9 carreaux de 1 mm^2 chacune. Les quatre carreaux situés au niveau des coins de ce dispositif sont divisés à leur tour en 16 carreaux de 0,0625 mm^2 . Sur la partie centrale de la cellule de Neubauer, une lamelle de 22 mm x 22 mm est placée et un volume de la suspension cellulaire colorée avec du bleu de trypan est introduit entre la lamelle et la cellule de Neubauer (par capillarité et une pipette). L'espace entre le couvre-objet et la lamelle est de 0,1 mm de hauteur, les dimensions des carreaux dans la cellule de Neubauer et les volumes (du liquide contenu entre l'hémocytomètre et la lamelle et de chaque carreau qui compose la grille) sont connus. Cela permet de calculer le nombre de cellules par unité de volume (concentration) de la suspension cellulaire de départ, en tenant compte du facteur de dilution avec le bleu de trypan. Pour compter les cellules vivantes (non colorées) et mortes (colorées en bleu) dans chacun des quatre carrés de 1 mm^2 se situant dans les coins de la cellule, celle-ci est mise sous

microscope optique et le nombre de cellule par mL est calculé en faisant la moyenne des 4 carreaux. Le nombre de cellules viables, mortes et totales par millilitre de la suspension cellulaire a été calculée comme suit :

Nombre de cellules viables / mL = cellules viables moyenne par boîte x10000 x Facteur de dilution.

Nombre de cellules mortes / mL = cellules mortes moyenne par image x10000 x Facteur de dilution.

Nombre de cellules totales / mL = cellules total moyen par boîte x10000 x Facteur de dilution.

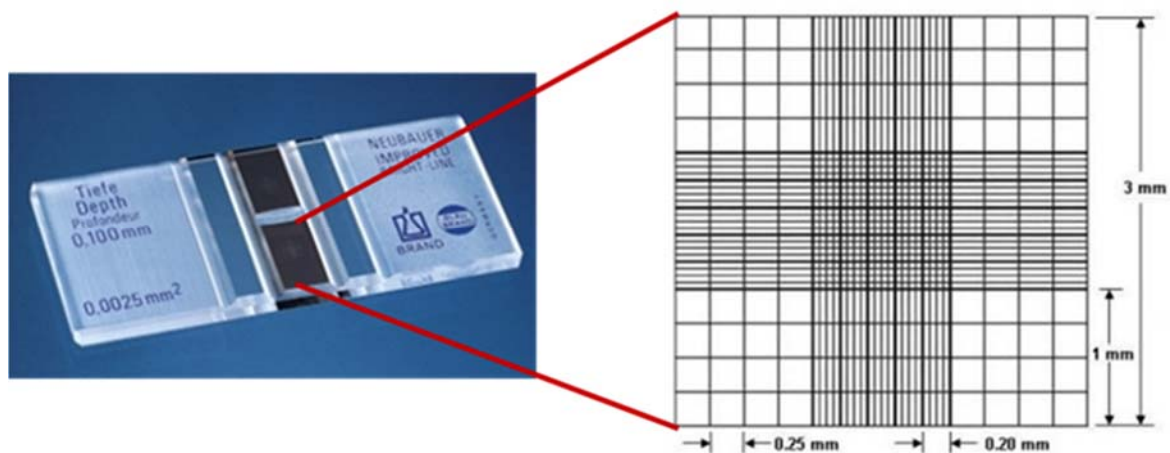


Figure 3.4. Schéma de la cellule de Neubauer (utilisée pour les comptages cellulaires montrant ses différents constituants).

- **Compteur de cellules automatique TC10 de Bio-Rad**

Le compteur de cellules automatique TC10 a été utilisé pour la réalisation des tests de viabilité cellulaire en introduisant 10 μ L du mélange de la suspension cellulaire et le bleu de trypan dans une cellule en plastique spéciale et elle est insérée dans le lecteur. Le logiciel de l'appareil effectue le comptage automatique à l'aide d'une analyse de plusieurs plans focaux pour déterminer la viabilité cellulaire avec une grande précision. Le compteur détecte automatiquement la présence du bleu de trypan dans l'échantillon et effectue des calculs par défaut compte tenu de la dilution 1/2 de l'échantillon contenant le bleu de trypan. Si la dilution de l'échantillon est différente, des calculs nécessaires doivent être effectués afin de déterminer la concentration réelle de l'échantillon ou changer les paramètres de dilution dans l'appareil avant le comptage.

Ce compteur permet de réaliser le comptage de cellules avec un diamètre compris entre 6 et 50 μm dans une plage de concentration comprise entre 5×10^4 à 1×10^7 cellules / mL. Cela fournit un nombre total de cellules totales et des cellules vivantes par millilitre et le pourcentage de la viabilité cellulaire. Il fournit également une image à différents grossissements de cellules qui ont été comptées et un histogramme qui montre la répartition des cellules vivantes et mortes en fonction de la taille.

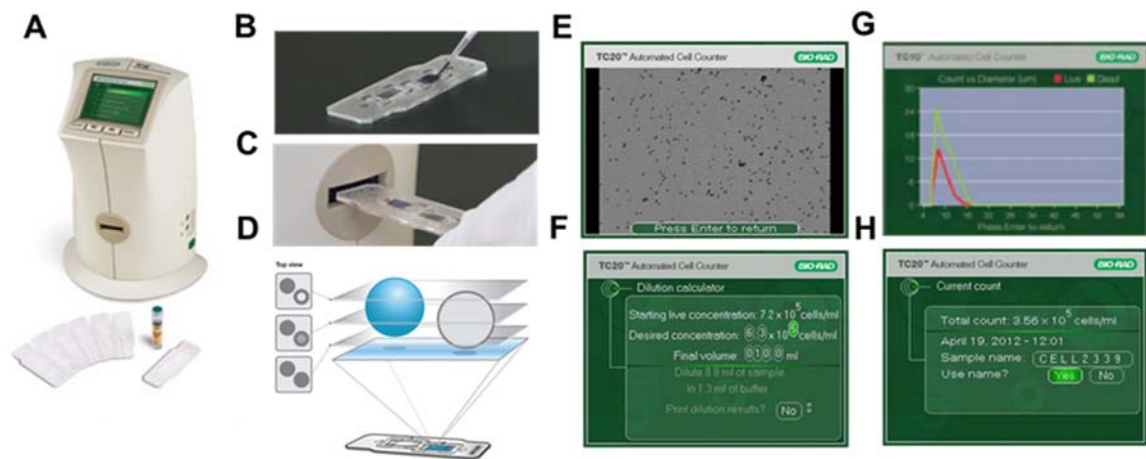


Figure 3.5. Les différentes composantes d'un compteur automatique.

(A) compteur automatique de cellules TC10 avec le réactif bleu de trypan et la cellule de comptage. (B) Image de la cellule en plastique avec 10 μL du mélange de la suspension cellulaire et le bleu de trypan (C) Image de l'insertion de la cellule dans le compteur. (D) Analyse schématique réalisée par le compteur de multiples plans focaux. (E) Capture de l'écran de l'image des cellules dans la cellule en plastique fournie par le compteur. (F) Capture d'écran de différents paramètres : la concentration initiale, la concentration finale et le volume de l'échantillon. (G) Capture d'écran de l'histogramme indiquant le nombre de cellules vivantes (courbe rouge) et morte (courbe verte) par rapport à leurs diamètres dans un comptage au bleu de trypan (H) Capture d'écran d'un comptage cellulaire au bleu de trypan indiquant le nombre total de cellules.

3.2.1.2. Test MTT

Le test MTT est une méthode colorimétrique sensible et quantitative qui permet de mesurer la viabilité et la prolifération cellulaire. Elle est basée sur la transformation d'un substrat appelé 3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényl tétrazolium (MTT), de couleur jaune et soluble dans l'eau à sa forme formazan de couleur bleu-violet insoluble dans l'eau par l'enzyme mitochondriale succinate déshydrogénase. Ce produit forme des cristaux insolubles dans l'eau, qui ne peuvent pas traverser la membrane plasmique et sont retenus à l'intérieur des cellules.

Des solvants organiques (DMSO, l'éthanol ou l'isopropanol-HCl) ont été utilisés pour solubiliser les cellules. Pour libérer ce produit, la quantité de formazan produite par colorimétrie peut être mesurée et elle est directement proportionnelle au nombre de cellules (dans un rang de concentrations). La capacité des cellules à réduire le MTT est un indicateur de l'intégrité et de l'activité des mitochondries, de sorte que les résultats peuvent être interprétés comme une mesure de la viabilité et / ou le nombre de cellules (**Figure 3.6**).

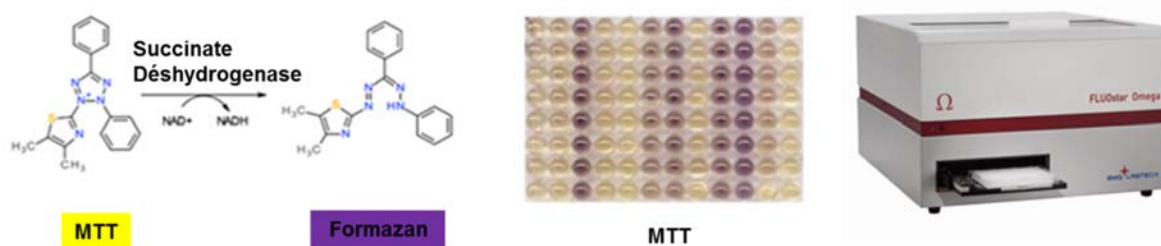


Figure 3.6. Schéma du test de viabilité avec le MTT, avec le lecteur de plaques FLUOstar Omega.

Méthodologie

Pour effectuer les tests MTT dans des plaques de 96 puits, tout d'abord une solution mère de MTT (5 mg / mL) est préparée dans 5 mL de milieu de culture sans rouge de phénol et sans suppléments pour chaque plaque. Un filtre de 0,22 µm est utilisé afin de stériliser et éliminer les débris insolubles présents dans la solution. Cette solution filtrée peut être conservée à 4 °C et protégée de la lumière pendant environ un mois. Ensuite, le milieu de culture est retiré de la plaque à 96 puits contenant les cellules soumises à des conditions souhaitées et 200 µL / puits de milieu frais sans rouge de phénol avec 50 µL / puits de la solution mère MTT sont ajoutés. Les plaques ont été protégées de la lumière en les couvrant avec un papier aluminium et incubés à 37 °C pendant 2-4 heures (en fonction de la lignée cellulaire). Après incubation, le milieu de culture avec MTT est éliminé et 100 µL de DMSO sont ajoutés pour solubiliser les cristaux de formazan. La plaque a été agitée pendant 10 minutes et l'absorbance a été mesurée à 570 nm, en utilisant l'absorbance à 690 nm en tant que référence pour la plaque en plastique. Le lecteur de plaques FLUOstar Omega (BMG Labtech) a été utilisé au cours de cette thèse pour mesurer l'absorbance dans des essais de MTT.

3.2.1.3. Test XTT

C'est une méthode colorimétrique similaire à la méthode du MTT, elle utilise un tétrazolium différent. Ce dosage est basé sur la conversion de 2,3-bis (2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl) -

2-H-tétrazolium-5-carboxanilide (XTT), de couleur jaune en un dérivé formazan de couleur orange qui est soluble dans l'eau par le biais d'une enzyme mitochondriale succinate déshydrogénase. Cette méthode présente un avantage majeur puisqu'elle ne nécessite pas l'utilisation d'agents tels que le DMSO pour solubiliser les cellules. Etant donné que le produit final est soluble dans l'eau, les cellules peuvent être récupérées après le test. De plus, le XTT est moins toxique que le MTT. Ce test permet d'évaluer la prolifération cellulaire et la cytotoxicité des composés dans des lignées cellulaires (**Figure 3.7**).

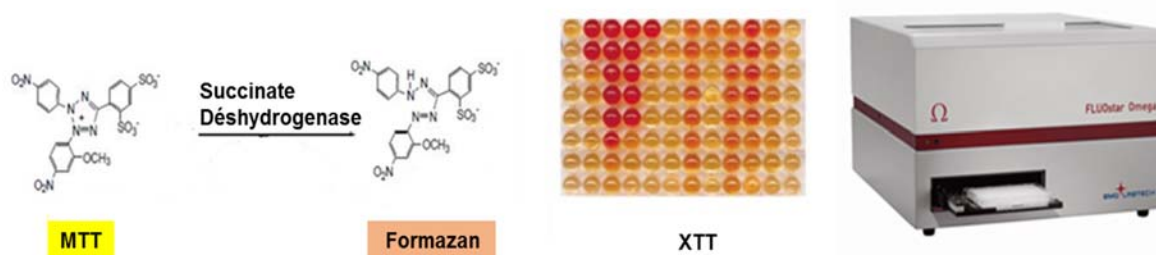


Figure 3.7. Schéma du test de viabilité avec le XTT, avec le lecteur de plaques FLUOstar Omega.

Méthodologie

Les tests XTT ont été effectués dans des plaques à 96 puits. Une solution mère de XTT (1 mg / mL) de 5 mL a été préparée dans un milieu de culture sans rouge de phénol et sans suppléments, additionné d'une solution de menadione (10 mM) dans de l'acétone. 10 μ L de cette solution de menadione (vitamine K3) ont été ajoutées pour chaque mL de XTT pour préparer la solution finale. Pour chaque plaque de 96 puits, 5 mL de XTT / ménadione ont été préparés. Dans chaque puit contenant précédemment 200 μ L du milieu, 50 μ L de solution de XTT / ménadione sont ajoutés. La plaque a été agitée et protégée de la lumière puis incubée à 37 °C. Après 4 heures d'incubation, la plaque a été mesurée à 450 nm en utilisant l'absorbance à 570 nm en tant que référence pour la plaque en plastique. Au cours de cette thèse, la mesure de l'absorbance dans des tests XTT a été réalisée à l'aide d'un lecteur de plaque FLUOstar Omega (BMG Labtech).

3.2.2. TESTS D'APOPTOSE

3.2.2.1. Analyse d'apoptose par l'annexine V/7-amino-actinomycine D

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est caractérisée par certains changements morphologiques tels que la perte de l'asymétrie membranaire qui se traduit par l'externalisation

de la phosphatidylsérine (PS), un simple constituant phospholipidique de la membrane plasmique, de l'intérieur vers l'extérieur de l'environnement cellulaire. L'Annexine V est une protéine de fixation de phospholipide qui présente une haute affinité pour la phosphatidylsérine. Cette protéine peut être conjuguée à un fluorochrome, phycoérythrin (PE), pour analyser et identifier les cellules apoptotiques par cytométrie en flux. L'Annexine V-PE peut être utilisée avec d'autres marqueurs comme le 7-Amino-Actinomycine D (7-AAD) qui permet de détecter les cellules mortes nécrotiques. Si les cellules analysées au FACS sont positivement marquées à l'Annexine V et négativement marquées au 7-AAD, c'est une apoptose. Si inversement, ça correspond à une nécrose.

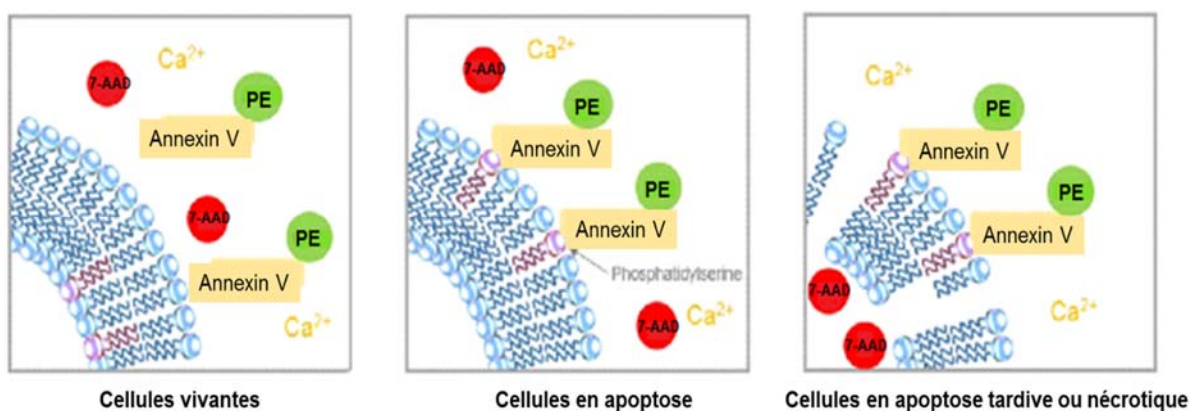


Figure 3.8. Schéma du principe du kit de la détection d'apoptose PE Annexin-V.

Méthodologie

Les cellules (10^6 cellules) sont lavées avec du PBS (1X) et trypsinées pour les détacher. Après une centrifugation à 1000 rpm pendant 5 min, les cellules sont lavées et centrifugées à nouveau pour récupérer le culot. Le kit « Annexin-V apoptosis detection kit » (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) est utilisé pour la détection et la quantification de l'apoptose.

Le culot est resuspendu dans 100 μ L de tampon de fixation (1X) et transféré par la suite dans des tubes à hémolyse avant l'addition de 4 μ l d'Annexine V conjuguée à la phycoérythrine (PE) et 4 μ l de 7-AAD. La suspension cellulaire est rapidement incubée à l'obscurité pendant 15 min avant d'être analysée par cytométrie en flux (Becton Dickinson FACScanto II flow cytometer. Les données ont été analysées avec le programme BD FACSDiva 6 (Becton Dickinson). Les populations de cellules vivantes sont distinguées par un marquage (PE Annexine V -/ 7-AAD -), les cellules apoptotiques au début de l'apoptose par (PE Annexine V +/ 7-AAD -), l'apoptose tardive par (PE Annexine V +/ 7-AAD +) et la nécrose par (PE Annexine V -/ 7-AAD +) (**Figure**

3.8). Le pourcentage calculé de cellules apoptotiques (%) regroupe les cellules apoptotiques précoces et les cellules apoptotiques tardives.

3.2.2.2. Détection de l'apoptose par le test Elisa

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée caractérisée par une série de changements morphologiques et biochimiques. L'un des principaux changements est la fragmentation de l'ADN qui se produit par l'activation de l'endonucléase nucléaire dépendante de Ca^{2+} et Mg^{2+} qui rompt l'ADN double hélice au niveau de la région de jonction entre nucléosomes (région la plus fragile) produisant des mono- et oligonucléosomes. En revanche, l'ADN des nucléosomes forme étroitement un complexe avec les histones H2A, H2B, H3 et H4, qui est moins accessible à l'action des endonucléases. Par conséquent, les fragments d'ADN produits sont des multiples de 180 paires de bases (pb) qui est la longueur de l'ADN existante dans une unité de nucléosome. Lorsque l'ADN est extrait à partir de cellules apoptotiques et séparé par électrophorèse sur gel d'agarose, ces mono- et oligonucléosomes produisent une échelle de motifs fragmentés typiques. L'enrichissement en mono- et oligonucléosomes dans le cytoplasme des cellules apoptotiques se produit plusieurs heures avant. La quantification de la fragmentation d'ADN des cellules, se fait par différentes méthodes de détection de l'apoptose. Ces méthodes sont basées sur la détection de fragments d'ADN de faible poids moléculaire (LMW, acronyme de faible poids moléculaire), qui augmente au cours de l'apoptose, ou l'ADN de poids élevé.

Le kit Cell Death Detection ELISA PLUS (Roche Diagnostics) a été utilisé au cours de ce travail pour la quantification relative de l'apoptose induite par divers composés. Ce kit est basé sur la détection de fragments d'ADN de type LMW formant un complexe avec des histones (mono- et oligonucléosomes) et se libérant dans le cytoplasme des cellules apoptotiques. Ce test utilise une analyse immunologique de type ELISA pour la détection de ces fragments LMW. De ce fait, les échantillons sont déposés dans une microplaque spéciale dont les puits sont pré-traités avec de la streptavidine et des anticorps monoclonaux anti-histone-biotine et anti-ADN-peroxydase qui sont reliés respectivement à des histones et à l'ADN des nucléosomes formant des immunocomplexes. Grâce à la forte affinité de la streptavidine pour la biotine, les immunocomplexes restent ancrés au fond du puits. Étant donné que l'anticorps anti-ADN est conjugué à l'enzyme peroxydase, la quantité d'enzyme fixée à l'immunocomplexe est proportionnelle à la quantité de mono- et oligonucléosomes dans l'échantillon et donc au nombre de cellules apoptotiques. L'action de cette enzyme sur le substrat 2,2'-azino-bis- (3-ethylbenzothiazole-sulfonique) (ABTS), donne lieu à un produit de couleur verte, de sorte que

l'activité de la peroxydase peut être déterminée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 415 nm.

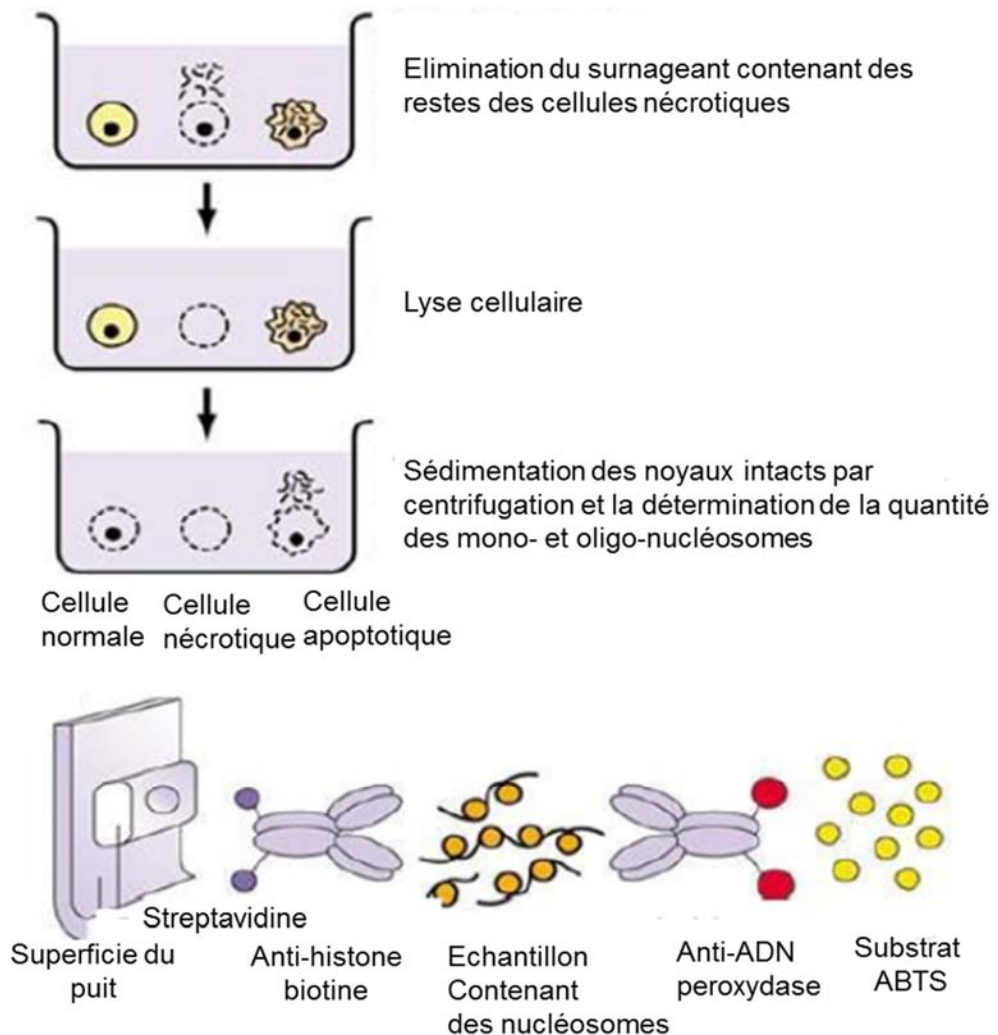


Figure 3.9. Schéma du principe du kit de détection de l'apoptose par le test d'ELISA de Roche.

3.2.2.3. Analyse de l'apoptose par la coloration de hoechst

Au cours du processus de l'apoptose, se produit un changement remarquable représenté par la condensation de la chromatine nucléaire. Le colorant Hoechst 33342 est un agent intercalant qui se lie à l'ADN des cellules et émet une fluorescence bleue. Cette fluorescence est plus intense lorsque la chromatine est plus condensée. Lorsque ce colorant est lié à l'ADN, les longueurs des ondes d'excitation maximales et d'émission sont de 350 nm et 461 nm

respectivement. Ainsi, l'observation de l'ADN par la coloration avec Hoechst 33342 permet de distinguer les cellules apoptotiques (chromatine plus brillante) de cellules normales (chromatine moins brillante) en utilisant le microscope à fluorescence.

Méthodologie

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits et soumises aux conditions requises pour l'expérience. Après le traitement, le milieu a été éliminé et 2 mL/puit de milieu frais et de 2 mL/puit d'un fixateur de Carnoy (méthanol : acide acétique V/V, 3 :1) ont été ajoutés et les cellules ont été incubées pendant 5 minutes température ambiante. Après ce temps d'incubation, le mélange a été enlevé et 2 mL de fixateur de Carnoy ont été ajoutés puis la plaque a été incubée à température ambiante pendant 10 minutes. Le fixateur a été enlevé et la plaque a été séchée à température ambiante. Par la suite, 2 mL du colorant Hoechst 33342 (10 mg/mL) dans du PBS ont été ajoutés. Après incubation durant 10 minutes à température ambiante, le colorant a été éliminé et les échantillons ont été visualisés sous microscope inversé à fluorescence en prenant des photos de plusieurs champs à différents grossissements des cellules apoptotiques.

3.2.3. Détection des niveaux intracellulaires des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les niveaux intracellulaires des ROS ont été mesurés en utilisant une sonde fluorogène, CMH2DCF-DA diluée dans 100 μ L de DMSO (Life Technologies, Oregon, USA.). Cette sonde se diffuse passivement à travers la membrane cytoplasmique. Ensuite, les groupes acétate sont clivés par des estérases intracellulaires et un groupe chlorométhyle réagissant avec les groupes thiol intracellulaire (comme le glutathion). Les oxydations successives en présence de ROS conduisent à la formation d'un produit fluorescent.

Méthodologie

Les cellules (2000 cellules par puits) ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits. Après traitement avec les molécules d'intérêt, les cellules ont été lavées avec du PBS (1X), remises en suspension avec HBSS (solution saline équilibrée) (GIBCO) et incubées avec 10 μ M de CMH2DCF-DA pendant 30 minutes à 37 °C dans l'obscurité. La fluorescence a été détectée à partir d'une longueur d'onde d'excitation et d'émission 492 et 517 nm, respectivement.

3.2.4. Tests d'invasion

La caractéristique distinctive des cellules constituant les tumeurs malignes est leur capacité à envahir les tissus adjacents, à se propager et entraîner des foyers métastatiques dans d'autres sites de l'organisme. La membrane basale de l'épithélium et de la matrice extracellulaire sous-jacente forme une barrière physique et continue, qui normalement bloque le passage des cellules et des macromolécules. Cependant, les cellules tumorales les plus agressives intégrant les tumeurs malignes sont capables de dégrader cette barrière localement. Cela leur permet d'envahir les tissus avoisinants et d'atteindre les systèmes lymphatique et circulatoire afin de se propager à des sites distants. Ce potentiel invasif est dû à des altérations dans l'adhésion cellulaire, la capacité de dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire et la mobilité des cellules tumorales.

3.2.4.1. Test d'invasion (chambre de boyden)

Le dispositif de chambre de Boyden a été construit par Boyden (Boyden, 1962). Les chambres de Boyden (NeuroProbe Inc., Bethesda, MD), sont utilisées pour mesurer la capacité invasive des cellules tumorales à travers les pores d'un filtre de 8 µm par chimiotactisme. Ces chambres sont composées de deux compartiments séparés par un filtre poreux composé d'une membrane de polycarbonate pré-traitée avec du matrigel. Le chimiotactisme est créé entre le compartiment inférieur recouvert avec du milieu complet (DMEM contenant du sérum de veau foetal) et les cellules traitées et déposées dans un milieu sans sérum sur le matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Méthodologie

Cent soixante dix microlitres du milieu complet ont été déposés dans le compartiment inférieur de la chambre Boyden. Les cellules traitées (pendant 24h et 72h) ont étéensemencées dans un milieu sans sérum à une densité de 5×10^4 cellules par puits sur le filtre revêtu de 2 mg/mL de matrigel. La chambre Boyden est incubée pendant 24 heures dans l'incubateur. Les cellules ont été fixées avec 1% de glutaraldéhyde et colorées avec 0,1% de violet de cristal. L'invasion cellulaire a été quantifiée en mesurant l'absorbance à 600 nm après la solubilisation des cellules colorées avec du SDS à 1%. L'inhibition de l'invasion cellulaire a été représentée en pourcentage d'invasion cellulaire.

3.2.4.2 Test de migration

Au cours de cette thèse, le test « fermeture de la plaie » (acronyme de la cicatrisation) a été utilisé. C'est un outil classique pour étudier la migration des cellules *in vitro*. Il est facile et il

n'est pas onéreux et largement utilisé. C'est un test basé sur l'observation du comportement d'une monocouche confluente de cellules après la réalisation d'une blessure (une plaie). Les cellules se déplaceront vers l'ouverture pour établir de nouveaux contacts cellule - cellule et fermant ainsi la «blessure». Les étapes de base impliquent la création d'une blessure des cellules au niveau de la monocouche cellulaire (avant et après traitement) puis la prise de photos de façon périodique au cours de l'expérience et la comparaison de toutes les images pour déterminer la vitesse de migration des cellules. Ce test permet d'analyser la migration de la monocouche et le mouvement des cellules individuelles.

Méthodologie

Les cellules ont été cultivées jusqu' à 90% de confluence. Le nombre de cellules pour créer une monocouche confluente dépend du type cellulaire. Les cellules (2000 cellules par puit) ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits. Une blessure verticale a été faite dans le centre du puit avec une pointe jaune stérile de 200 µL. Puis, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS (1X) pour éliminer les cellules détachées et elles ont étéensemencées avec le milieu de culture DMEM ou EMEM avant les traitements appropriés.

Des photos de blessures à temps zéro (T0) ont été prises. Après 24 h et 72 h de traitements, les cellules ont été lavées avec du PBS (1X), fixées avec de l'éthanol froid et colorées avec du Giemsa avant la prise des photos. Les données ont été représentées sous forme de pourcentage de migration cellulaire. Le pourcentage de la migration des cellules a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{La migration cellulaire (\%)} = \frac{[T0 - Tt - T\text{contrôle}]}{[T0 - T\text{contrôle}]} \times 100$$

T0: est la zone de la plaie mesurée au temps zéro.

Tcontrôle : est la zone de la plaie dans la condition contrôle (Cellules traitées avec du PBS).

Tt: est la zone de la plaie dans les puits traités (par les biomolécules d'intérêt).

3.2.4.3. Test d'adhésion

Le test d'adhésion nous permet d'étudier et de quantifier la capacité des cellules à adhérer aux protéines de la matrice extracellulaire (ECM) dans différentes.

Méthodologie

- Préparation de matrices

Cinquante µL de chaque solution protéique de la matrice extracellulaire (ECM) (5 µg/mL de pol-L-lysine, 5 µg/mL de vitronectine, 5 µg/mL de collagène, 5 µg/mL de laminine, 5 µg/mL de

la fibronectine et 10 µg/mL de fibrinogène) ont été déposés dans chaque puit d'une plaque à 96 puits. Après incubation pendant une nuit à 4 °C., les puits ont été saturés avec 50 µL de PBS/BSA (1%) pendant 1 heure à la température ambiante pour bloquer les sites non spécifiques.

- Préparation de la suspension cellulaire

Pendant la phase de saturation, les cellules ont été détachées avec une solution de versene (PBS/EDTA), puis centrifugées et lavées 2 fois avec le tampon d'adhésion (DMEM ou EMEM avec 0,2% de BSA). Ensuite, les cellules ont été mises en suspension dans un tampon d'adhésion.

- Fixation des cellules et mesure de l'absorbance

Les cellules ($5 \cdot 10^5$ cellules/mL) ont été traitées pendant 1h (sous agitation) ou 24h avec les protéines d'intérêt. Après incubation, les cellules traitées et non traitées ont été placées dans les puits et la plaque à 96 puits a été incubée à 37 °C pendant 1 à 2 heures. Ensuite, les cellules ont été lavées 2 fois avec du DMEM ou EMEM et 0,2% de BSA afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Les cellules adhérentes sont fixées avec du glutaraldéhyde à 1% pendant 10 minutes. Deux lavages ont été effectués avec de l'eau distillée puis les cellules ont été colorées pendant 30 minutes avec 50 µL du cristal violet à 0,1%. Après élimination du colorant, les cellules ont été solubilisées avec 50 µL de SDS à 1%. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 600 nm.

Concernant le test d'adhésion utilisant un anticorps bloquant. Les cellules ont été traitées sous différentes conditions pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules ont été ensemencées dans une plaque prétraitée avec l'anticorps monoclonal LM609 anti- $\alpha\beta3$ (10 µg / mL, Millipore). L'essai d'adhésion a été effectué selon la démarche décrite auparavant.

3.2.5. MICROSCOPIE

3.2.5.1. Microscopie optique

L'utilisation d'un faisceau de photons est la base du fonctionnement d'un microscope optique. Généralement, Les microscopes composés utilisés sont ceux disposant de plusieurs objectifs qui sont en mesure d'agrandir l'image jusqu'à deux mille fois. Les microscopes optiques actuels ont un pouvoir de résolution de 0,2 µm, mille fois supérieur à l'œil. Durant cette thèse, la

microscopie optique a été utilisée aussi bien pour l'entretien comme pour les expériences de la culture cellulaire. Les types de microscopes optiques utilisés sont les suivants :

Microscope à contraste de phase

Le microscope à contraste de phase est constitué d'un dispositif situé à l'intérieur ou au-dessous du condensateur, produisant une différence d'un quart de longueur d'onde dans les rayons lumineux. Cela provoque des variations de luminosité dans les éléments étudiés, ce qui permet de les différencier du reste de l'échantillon.

Divers microscopes à contraste de phase ont été utilisés lors de l'élaboration de cette thèse (**Figure 3.10**). Le microscope inversé TMS Nikon, a été utilisé en routine pour le suivi des expériences de la culture cellulaire. Il nous a permis l'observation microscopique des échantillons, dans différentes caractéristiques optiques variables (flasque, boîte de petri, plaques à puits multiples, etc.) sans préparation préalable, ce qui facilite l'observation de cellules sans affecter les conditions de culture. Le microscope ECLIPSE TE200-U de Nikon équipé avec une caméra photographique Nikon modèle DS Camera Head D-5M a été utilisé pour prendre des photos de cellules en culture. Le microscope LABOPHOT-2 de Nikon a été utilisé pour le comptage des cellules viables avec la cellule de Neubauer ou cellule de KOVA par la méthode d'exclusion du bleu de trypan



Figure 3.10. Microscopes inversés.

Microscope inversé TMS de Nikon (position à gauche), microscope inversé ECLIPSE TE200-U (position central). Microscope LABOPHOT-2 de Nikon (position à droite).

Microscopie à fluorescence

Le microscope à fluorescence est un microscope émettant une lumière ultraviolette dans lequel l'échantillon est éclairé par un faisceau lumineux d'une longueur d'onde spécifique qui va exciter certaines molécules capables d'absorber des photons à cette longueur d'onde.

L'image observée est le résultat d'une radiation électromagnétique émise par les molécules qui ont absorbé l'excitation primaire et réémis la lumière avec une longueur d'onde plus élevée. Pour ne laisser passer que l'émission secondaire désirée, des filtres appropriés doivent être placés au-dessous du condensateur et au-dessus de l'objectif. Ce type est utilisé pour détecter des substances auto-fluorescentes (vitamine A) ou des substances marquées par un fluorochrome.

Au cours de la réalisation de cette thèse, le microscope à fluorescence a été utilisé pour l'observation de cellules en culture soumises à une coloration Hoechst 33342. Le microscope à fluorescence en ECLIPSE TE200-U de Nikon utilisé est couplé à une lampe à mercure de haute pression. Le réactif Hoechst 33342 est un agent intercalant qui est excité par la lumière ultraviolette et émet une fluorescence bleue. Quand il est lié à l'ADN, les longueurs d'ondes maximales d'excitation et d'émission de ce colorant sont 350 nm et 461 nm respectivement.

Microscopie confocale

Le microscope confocal est un microscope qui utilise une technique d'imagerie optique pour augmenter le contraste et/ou reconstruire des images en trois dimensions en utilisant un « pinhole » (collimateur d'ouverture délimitant) pour éliminer la lumière défocalisée ou des foyers de lentilles éclairantes qui sont plus épaisses que le plan focal. Le pinhole est une ouverture située en face du photomultiplicateur qui empêche le passage de la fluorescence des régions de l'échantillon qui ne sont pas sur le même point. La lumière provenant de régions situées au-dessus ou au-dessous du plan focal ne converge pas sur le pinhole et elle n'est pas détectée par le photomultiplicateur de semi-conducteur.

Étant donné que seulement une petite partie de l'échantillon (point) est éclairée, un système de balayage est nécessaire afin de permettre de visionner tous les points de l'échantillon et aussi un système de formation d'image où l'information de chaque point est collectée. Le système de balayage peut être de deux types, un faisceau de laser qui se déplace à travers l'échantillon (balayage de faisceau) ou un faisceau qui reste stationnaire (phase de balayage). Le type de microscopie confocale le plus utilisé est celui dans lequel le faisceau de laser balaye l'échantillon et qui est appelé Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM).

La lumière réfléctée ou la fluorescence émise par l'échantillon est recueillie dans un photomultiplicateur et se transforme à un signal vidéo numérisé et stocké dans un ordinateur et visualisé à travers un moniteur. La plupart des systèmes ont plusieurs photomultiplicateurs et un système optique de collecte avec des longueurs d'onde différentes. La fluorescence est

définie comme étant la propriété que possèdent certaines molécules absorbant la lumière d'une longueur d'onde spécifique et émettant de la lumière à une longueur d'onde plus supérieure. La fluorescence peut se produire naturellement par certaines substances (chlorophylle, certains tissus frais, etc.), appelée fluorescence primaire ou auto-fluorescence. Dans d'autres cas, il est nécessaire de colorer avec un marqueur fluorescent appelé fluorochrome et dans ce cas la fluorescence est secondaire. Il existe différents fluorochromes qui marquent sélectivement divers composants cellulaires ou des tissus. Mais, on peut aussi associer ces fluorochromes à des protéines ou des anticorps dirigés spécifiquement contre certains composants cellulaires ou de tissus pour faciliter leur étude.

Le spectre d'excitation et le spectre d'émission sont deux caractéristiques importantes des fluorochromes. Le spectre d'excitation présente la gamme de longueurs d'ondes dans laquelle le fluorochrome absorbe la lumière. Le spectre d'émission dispose de la gamme de longueurs d'ondes dans laquelle le fluorochrome émet la lumière. Chaque spectre d'excitation et d'émission présente un pic qui correspond aux longueurs d'onde maximales d'absorption et d'émission, respectivement.

Pour cette raison, le microscope confocal est donc équipé avec des lasers qui émettent une lumière à des longueurs d'onde spécifiques coïncidant avec l'excitation maximale de différents fluorochromes. Normalement, un microscope confocal comporte plusieurs lasers ayant une ou plusieurs ondes d'émission : Argon (458, 476, 488, 496 et 514 nm), le néon hélium (de 543 nm), le néon hélium (de 633 nm), la diode bleue (405 nm), etc. Durant la réalisation de cette thèse, les fluorochromes les plus couramment utilisés sont les suivants :

- 4', 6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) est un colorant fluorescent qui se lie étroitement à des régions riches en AT de l'ADN. Quand il est lié à un ADN double brin, présente un maximum d'excitation à 358 nm (ultraviolet) et un maximum d'émission à 461 nm (bleu).

- Isothiocyanate de fluorescéine ou fluorescéine-5-isothiocyanate (FITC) : présente un maximum d'excitation à 492 et un maximum d'émission à 518 nm (vert).

- Alexa Fluor 488 : présente un maximum d'absorption à 488 nm et un maximum d'émission à 519 nm (vert). Leurs propriétés spectrales sont très semblables à celles de la FITC, mais permettent de générer des conjugués plus lumineux et photo-stables.

- Alexa Fluor 633 : présente un maximum d'absorption à 632 et un maximum d'émission à 647 (rouge).

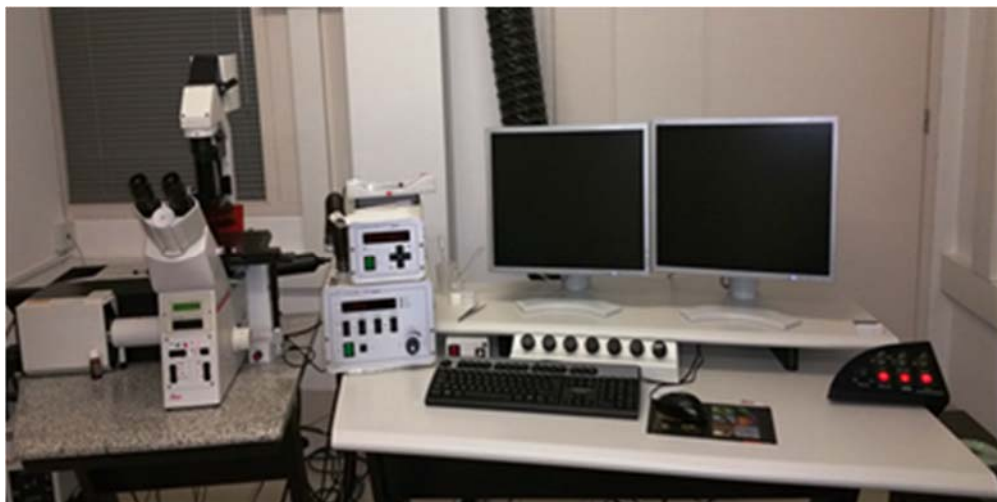


Figure 3.11. Microscope confocal Leica TCS-SP2.

Les essais avec la microscopie confocale ont été réalisés dans la section de microscopie confocale de l'Université de Murcie qui dispose d'un microscope à laser confocal Leica TCS-SP2 (Leica Microsystems) (**Figure 3.11**).

Méthodologie d'immunofluorescence indirecte pour les cellules fixées

Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de pétri de 3,5 cm de diamètre et placées sur une lamelle (avec de l'éthanol 70 °C stérilisée) à la flamme afin d'étudier l'expression et la distribution des protéines cellulaires. Ces cellules ont été soumises à des conditions adéquates selon l'expérience souhaitée (invalidation génique, traitement avec des composés, etc.). Tout d'abord, le milieu de culture a été éliminé. Après le lavage des cellules avec du PBS deux fois, les cellules ont été fixées avec de l'acétone froid pendant 5 minutes. Après incubation, le tampon de fixation a été éliminé et les cellules ont été lavées quatre fois avec du PBS froid. Ensuite, les sites non spécifiques ont été bloqués par de l'albumine de sérum bovin (BSA) (3-5%, p / v) dans du PBS pendant 30 minutes à température ambiante. Après saturation, les échantillons ont été lavés 3 fois avec du PBS et incubés durant 2 heures à température ambiante avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. L'anticorps a été dilué dans de du BSA à 1% (p/v) dans du PBS à la concentration indiquée par le fournisseur. Par la suite, les échantillons ont été lavés 3 fois avec du PBS, ils ont été placés sous agitation pendant 5 minutes et incubés pendant 1 heure avec les anticorps secondaires (ALEXA Fluor Dyes ; Life Technologies) conjugués à un fluorochrome approprié à une dilution de 1/200 dans de la BSA 1% (p/v) dans du PBS. Enfin, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS sous agitation pendant 5 minutes, l'excès de liquide a été retiré et la lamelle a été mise sur une lame en

utilisant un milieu de montage (ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Life Technologies)) contenant dans sa composition le DAPI (qui colore les noyaux en bleu tout en préservant l'échantillon et empêche la perte de la fluorescence).

3.3. TECHNIQUES DE BIOCHIMIE

3.3.1. PURIFICATION DES PROTEINES

Le venin de *Macrovipera lebetina*, prélevé dans le serpentarium de l'Institut Pasteur, a été recueilli dans de la glace. Le venin a été lyophilisé (paragraphe 3.3.2) et stocké à + 4 °C.

Purification de la protéine Lebein

La Lebein a été purifiée par chromatographie liquide FPLC (fast protein liquid chromatography) en utilisant un gel de filtration sur une colonne Superose 12 (HR 16/50) suivie d'une chromatographie sur colonne échangeuse d'anions Mono Q HR 5/5 puis d'une chromatographie sur colonne Mono S HR 5/5. Par la suite, la Lebein a été purifiée par Chromatographie liquide de haute performance (HPLC) en phase inverse sur une colonne C8 (5 µm, 4,6 x 250 mm) (Beekman, USA), puis éluée à un débit de 0,8 mL / min en utilisant un gradient d'acétonitrile de 10 à 25%. La pureté et la masse moléculaire apparente de la protéine purifiée ont été évaluées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-dodécylsulfate de sodium à 15% (SDS-PAGE) avec ou sans réduction (5% de β-mercaptoéthanol) selon la méthode de Laemmli et confirmée par spectrométrie de masse.

Purification de la protéine macrovipecetine

La protéine macrovipecetine a été purifiée par chromatographie liquide FPLC (fast protein liquid chromatography) en utilisant un gel de filtration sur une colonne Superose 12 (HR 16/50) suivie d'une chromatographie sur colonne échangeuse d'anions Mono Q HR 5/5.

Par la suite, La protéine a été purifiée par la Chromatographie liquide de haute performance (HPLC) en phase inverse sur une colonne C8 (5 µm, 4,6 x 250 mm) (Beekman, USA) équilibrée dans 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) dans 10% d'acétonitrile, puis éluée à un débit de 1 mL / min en utilisant un gradient linéaire d'acétonitrile (10-80%). La pureté et la masse moléculaire apparente de la protéine purifiée ont été évaluées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-dodécylsulfate de sodium à 15% (SDS-PAGE) avec ou sans réduction (5% de β-mercaptoéthanol) selon la méthode de Laemmli et confirmée par spectrométrie de masse.

3.3.1.1 Séparation des sous-unités protéiques

La protéine macrovipecetine a été réduite avec 6 M de guanidine-HCl, 0,5 M de Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1,4 μ M de DTT, pH 7,5 pendant 1 h à 37 °C. Les sous-unités ont été alkylées avec du 4-vinylpyridine à une concentration finale de 4 μ M pendant 5 min. La réaction a été stoppée avec du DTT (concentration 1,4 μ M final). Le mélange réactionnel a été déssalé et les sous-unités de la Macrovipecetine ont été purifiées par Chromatographie en phase inverse sur une colonne C8 (5 μ m, 4,6x250 mm) (Beckman, USA). Les solvants A et B étaient préparés avec de l'acide trifluoroacétique 0,1% (TFA) (v / v) et 0,1% de TFA (v / v) à 100% d'acétonitrile (v / v), respectivement. Les sous-unités ont été éluées avec un gradient linéaire de 10-80% B pendant 65 min et de 80 à 100% pendant 10 min à un débit de 1 mL / min, contrôlée à 214 nm.

3.3.1.2 Détermination de la concentration en protéines totales

La concentration protéique a été déterminée par une méthode colorimétrique BCA (Bicinchoninic Acid Protein Assay kit, Sigma) en utilisant une gamme de sérum d'albumine bovin (BSA) comme standard (comme cela est détaillé dans le paragraphe 3.3.3.1).

3.3.1.3 Digestion enzymatique et chimique des sous-unités protéiques

La sous unité α réduite et alkylée et a été digérée par une protéase Asp-N ou Lys-C (Roche Diagnostics, Bâle, Suisse). Une solution d'urée (concentration finale de 3 M) a été ajoutée au mélange pour assurer la solubilité. En outre la sous-unité α a été clivée chimiquement au niveau de la liaison Asn-Gly avec LiOH 4,5 M, dans du guanidine-HCl 6 M et hydroxylamine-HCl, 2 M à pH 9,0. Les peptides provenant des clivages ont été séparés par chromatographie en phase inverse sur une colonne C8 éluée avec un gradient linéaire de 10-70% B en 60 min à 1 mL/min. La sous-unité β réduite et alkylée est digérée par une protéase Lys-C ou Asp-N tel . Le clivage chimique après la méthionine a été réalisée par addition d'une solution de bromure de cyanogène (70 mg/mL) (CNBr; Sigma, St. Louis, MO) dans 70% d'acide formique à la sous-unité β (10 mL/10 μ g de protéines) dans l'obscurité pendant 24 heures à température ambiante. Le mélange de clivage a été dilué avec 10 volumes d'eau et concentré dans un appareil SpeedVac. Les peptides ont été purifiés comme décrit précédemment.

3.3.1.4. Séquençage peptidique et spectrométrie de masse

Les séquences N-terminales des sous-unités et des peptides provenant des digestions enzymatiques et chimiques ont été obtenues par dégradation d'Edman avec un séquenceur

Applied Biosystem 476 A équipé avec une HPLC avec du phénylthiohydantoïne en utilisant une colonne RP 18.

3.3.2. ANALYSE DE LA MASSE DES PROTEINES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse essentielle pour les études protéomiques en raison de sa grande capacité d'analyse, sa sensibilité et sa précision dans la détermination des masses moléculaires de protéines.

Les masses moléculaires des sous-unités ont été déterminées par spectrométrie de masse la méthode électro-spray à l'aide d'un instrument Trio2 / 3000 ESI (VG Biotech). Le programme BLAST a été utilisé pour l'alignement des séquences des sous-unités α et β de la macrovipecetine avec les autres lectines de type C.

3.3.3. LYOPHILISATION

La lyophilisation est une technique qui consiste en l'élimination de l'eau d'une substance congelée sans passer par l'état liquide. Les solutions à lyophiliser ont été congelés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cette basse température empêche les modifications chimiques qui peuvent détériorer la qualité des échantillons), puis elles sont soumises à un vide poussé qui passe l'eau d'un état solide à l'état gazeux sans passer par l'état liquide. Durant la réalisation de cette thèse, le processus de lyophilisation a été réalisée à l'aide d'un lyophilisateur Virtis Advantage 2.0 ES.

3.3.4. ELECTROPHORESE

La technique de séparation des molécules appelée aussi électrophorèse est basée sur le mouvement connu de toute molécule chargée lorsqu'elle est soumise à un champ électrique. Les techniques électrophorétiques sont largement utilisées pour purifier et caractériser les molécules chargées comme les protéines et les acides nucléiques, pouvant être utilisées à des fins analytiques et / ou des préparatives.

3.3.4.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-dodécylsulfate de sodium : SDS-PAGE

Une des méthodes d'électrophorèse la plus appliquée pour la séparation des mélanges complexes de protéines est une électrophorèse des protéines sur des gels de polyacrylamide (PAGE = électrophorèse sur gel de Polyacrylamide) en présence du détergent anionique dodécylsulfate de sodium (SDS). Cette technique est pratique, rapide et économique et connu sous le nom de SDS-PAGE. Les gels de polyacrylamide ont un certain nombre de propriétés

qui en font un excellent moyen pour la séparation des protéines telles que : l'élasticité, la compatibilité avec une grande variété de composés chimiques et une porosité contrôlable. Ces gels de polyacrylamide sont le résultat de la polymérisation chimique d'un mélange d'acrylamide et de bisacrylamide (N, N'-méthylènebis acrylamide), où l'acrylamide forme de longues chaînes linéaires et le bisacrylamide donne lieu à des points de ramification qui entrelacent les chaînes d'acrylamide. Le tampon (Tris-HCL) et un agent initiateur de polymérisation comme le persulfate d'ammonium et le TEMED (N, N, N', N'-tétraméthyl-éthylènediamine) sont également ajoutés au mélange. Dans ce système, l'anion persulfate se décompose pour former des radicaux libres qui initient la réaction de la polymérisation. En SDS-PAGE, l'échantillon protéique est traité avec un agent de réduction le 2-mercaptoéthanol et un agent dénaturant le dodécylsulfate de sodium (SDS) pour rompre les liaisons disulfures et conférer aux protéines une charge négative. Ceci est réalisé par dénaturation par la chaleur (100 ° C) pendant 5 min. Les protéines ayant la même densité de charge se déplacent à la même vitesse dans un champ électrique (à partir de la cathode vers l'anode) et seront séparées en fonction de leurs tailles (**Figure 3.12**). L'échantillon de protéine a été fractionné par électrophorèse sur gel de polyacrylamide x%, comprenant deux modes successifs de migration, un gel de séparation (Resolving gel) et un gel de concentration (Stacking gel).

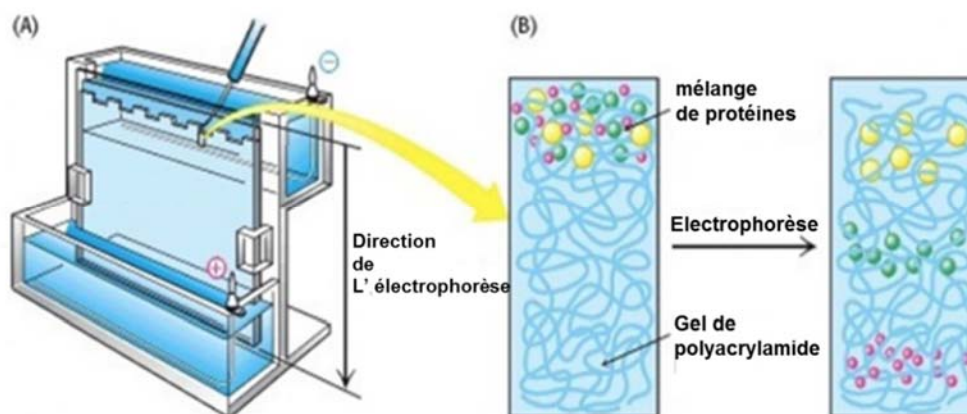


Figure 3.12. Schéma du dispositif d'électrophorèse.

(A) Schéma du dispositif d'électrophorèse montrant la source de tension générant le champ électrique avec deux électrodes, l'une positive (anode) et l'autre est négative (cathode) ; (B) la séparation des protéines en fonction de leurs tailles par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Au cours de cette thèse, l'électrophorèse SDS-PAGE a été réalisée selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970).

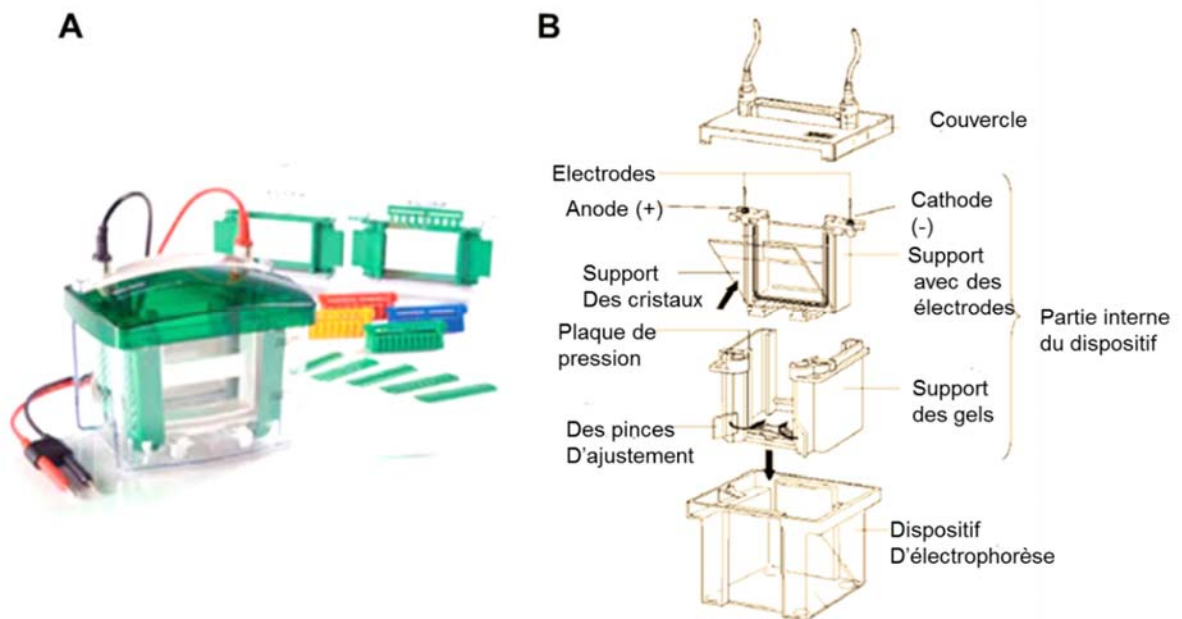


Figure 3.13. Schéma des composantes du système Mini Protean 3 (Bio-Rad) et du montage du dispositif d'électrophorèse.

(A) Les composantes du système Mini Protean 3 de Bio-Rad Laboratories. (B) Schéma du montage du système du dispositif d'électrophorèse.

Méthodologie

Préparation du tampon dénaturant: Tampon de Lyse (Laemmli)

- 2,5% de SDS
- 10%
- Glycérine
- 100 mM Tris pH (6,8)

Préparation des échantillons

Après un temps d'incubation appropriée dans les conditions désirées, le milieu a été aspiré. Les puits ont été lavés 2 fois avec du PBS (1X) avant d'ajouter le tampon de lyse 100 µL (Laemmli). Ensuite, les lysats cellulaires ont été transférés dans des tubes à Eppendorf et conservés à -30 ° C jusqu'à leurs utilisations.

Quantification des protéines totales dans les échantillons

La concentration des lysats obtenus a été déterminée par une méthode colorimétrique BCA (kit Protein Assay Bicinchoninic Acid, Sigma) en utilisant une plaque à 96 puits. Une gamme standard de BSA (1 µg / µL) avec une gamme de concentrations allant de 2 µg à 32 µg a été préparé. 2 µL de tampon Laemmli ont été ajoutés dans les puits à la gamme de calibration afin d'éliminer toute interférence du réactif avec le tampon de lyse utilisée. Le même volume de l'extrait de protéine est quantifié. Après avoir ajouté la solution de BCA à tous les puits, la plaque est incubée à 37 °C pendant 30 min. Enfin, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde 540 nm. La courbe obtenue de la gamme de BSA nous a permis de déterminer les concentrations de protéines.

2 µL du mélange (β-mercaptoéthanol 100 mM et 0,01% de bleu de bromophénol) ont été ajoutées à chaque échantillon. Les derniers ont été chauffés à 95-100 °C pendant 5 minutes afin d'assurer la dénaturation des protéines.

Préparation des gels de concentration et de séparation

Gel de séparation

Tout d'abord, les plaques du système (0.75 mm) (Mini Protean 3) sont montées. Ensuite, la solution de gel de séparation est préparée.

Gel de séparation (10%)

Composés	Quantités
Bisacrylamide 30%/ Acrylamide	3.3 mL
Tampon de gel de séparation (Resolving)	2.5 mL
H2O	4.2 mL
Persulfate d'ammoniaque 10% (p/v)	100µL
TEMED	10µL

Le Tampon de gel de séparation (Resolving) est préparé avec les composés suivants : Tris-CI+0.4% SDS (4X), 1.5 M, pH=8.8.

Gel de concentration (4%)

Composés	Quantités
Bisacrylamide 30%/ Acrylamide	1.3 mL
Tampon de gel de concentration (Stacking)	2.5 mL
H2O	6.2 mL
Persulfate d'ammoniaque 10% (p/v)	100µL
TEMED	10µL

Le tampon de gel de concentration (Stacking) est préparé avec les composés suivants : Tris-HCl+0.4% SDS (4X), 0.5 M, pH=6.8.

Electrophorèse

En premier lieu, un tampon de l'électrophorèse 10X (30,3 g de Tris base (0,25 M) + 144g de Glycine (1.92M) + 10g SDS + H2O est préparé. La préparation de 400 mL de ce tampon (1X) pour deux gels est suffisante. Une fois que les agents de polymérisation (β -mercaptoéthanol et de bleu de bromophénol) sont ajoutés, le gel de séparation est coulé entre les deux plaques, puis, le tampon d'électrophorèse est ajouté. Le gel de concentration est mis après la polymérisation du gel de séparation et le peigne est placé. Les peignes sont enlevés et les échantillons sont placés dans chaque puits. Le marqueur de taille est mis aussi afin de détecter le poids moléculaire des protéines. Enfin, la migration est réalisée à 80V puis 120V.

3.3.5. WESTERN BLOT

Afin de détecter les protéines dans un échantillon dans lequel il y a un mélange complexe de protéines (un extrait de cellules ou de tissus), la technique utilisée est le Western Blot. Tout d'abord, les protéines ont été séparées par électrophorèse sur des gels de polyacrylamide, puis transférées sur une membrane (nitrocellulose ou PVDF) en appliquant un champ électrique perpendiculaire au gel. Une fois que les protéines ont été transférées sur une membrane, la protéine d'intérêt est détectée grâce à un anticorps spécifique. Un procédé d'immuno-détection indirect a été utilisé lors de cette thèse. Tout d'abord, un anticorps primaire dirigé spécifiquement contre la protéine d'intérêt et, d'autre part, un anticorps secondaire couplé à une molécule (phosphatase alcaline ou la peroxydase) est utilisé. Cette technique nous a permis de détecter la présence des protéines d'intérêt dans nos échantillons et à comparer leurs niveaux dans différentes conditions. Afin de comparer les niveaux d'une protéine

particulière dans différents échantillons, il est nécessaire de normaliser en utilisant une protéine de référence. Au cours de cette thèse, la β -actine a été utilisée comme protéine de référence, car son taux d'expression reste constant quelles que soient les conditions cellulaires.

Méthodologie

Le Western Blot se fait en cinq étapes :

Transfert de protéines sur la membrane par électro-transfert

En premier lieu, le tampon de transfert de l'ordre de (10X) (30,3g Tris base + 144g de Glycine + H₂O) a été préparée. Après électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF, préalablement incubée dans de l'éthanol, dans un tampon de transfert (1X) contenant 20% d'éthanol (Immobilon-Millipore) par électro-transfert.

Pour réaliser le transfert, un système Mini Trans Blot Cell (Bio-Rad) est préparé (**Figure 3.14**). Ce système est constitué d'une cassette en plastique avec deux éponges, du papier filtre, gel, une membrane et un papier filtre immergée dans le tampon de transfert. Le transfert a été effectué pendant une nuit à 4 °C (chambre froide) à un ampérage de 100 mA. Le transfert des protéines est vérifié par coloration de la membrane à l'Amidoblack qui est préparé comme suit (25% d'isopropanol, 10% d'acide acétique, Amidoblack 1 mg/mL). Ensuite, la membrane de PVDF a été décolorée avec du tampon de décolorant (30% d'éthanol + 10% acide acétique) puis, la membrane est séchée à l'air libre.



Figure 3.14. Composantes du Dispositif de transfert (système Mini Protean 3 de Bio-Rad).

Blocage des sites non spécifiques

Ce processus implique la saturation de tous les sites de liaison aux protéines membranaires qui ne sont pas occupés par les protéines transférées, afin d'éviter une liaison non spécifique d'anticorps à la membrane. Pour cela, la membrane est incubée 1-2 heures dans une solution de saturation à température ambiante sous agitation. La solution de saturation la plus utilisée au cours du développement de cette thèse était du PBS contenant 5% de la poudre de lait écrémé. Après le blocage, la membrane a été lavée avec du PBS (1X) à trois reprises pendant 10 min.

Incubation avec des anticorps

La membrane est incubée dans un anticorps primaire à la concentration appropriée dans une solution de 1% de lait écrémé en poudre pendant une nuit à 4 °C ou pendant 2 heures à température ambiante sous agitation. Après incubation, l'anticorps primaire est éliminé de la membrane par 3 lavages avec du PBS (1X). Chaque lavage dure 10 minutes. Par la suite, la membrane est incubée pendant 1 à 2 heures avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La membrane est lavée à nouveau 3 fois pendant 10 minutes dans du PBS (1X) sous agitation et le signal est révélé par chimioluminescence (Pierce réactif HRP ou Millipore).

Révélation de l'activité peroxydase

La révélation a été faite par deux procédés :

- 1/ Dans une chambre noire, la membrane a été couverte de 1 mL de mélange de détection (ECL) utilisé pour la révélation (Pierce ou Millipore). Dans une cassette, le temps d'exposition du film sur la membrane est variable en fonction de l'intensité du signal désiré et l'efficacité de l'anticorps utilisé. Ensuite, le film est immergé dans une solution de révélation, suivi d'un lavage à l'eau puis le signal est fixé par une solution de fixation. Le film est ensuite séché à l'air libre.
- 2/ La membrane est incubée avec le mélange de détection (ECL) (Millipore ou Pierce) pendant 5 minutes à température ambiante. Le temps d'incubation diffère selon la quantité de protéine présente dans l'échantillon et l'efficacité de l'anticorps primaire utilisé. Après ces temps d'incubation, le mélange est éliminé et la membrane est révélée grâce à l'appareil Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories), permettant de capturer des images de la réaction de chimioluminescence et permet de quantifier les niveaux de protéines présents dans nos échantillons.

3.3.6. FRACTIONNEMENT CELLULAIRE : EXTRACTION DE LA FRACTION NUCLEAIRE ET CYTOSOLIQUE

Pour le fractionnement cellulaire, les cellules ont étéensemencées dans une plaque de 6 puits puis soumises à aux traitements appropriés. Après un temps d'incubation, les cellules ont été

grattées avec du PBS froid. Ensuite, centrifugées et lavées avec du PBS puis, mises dans la glace. La suspension cellulaire a été reprise dans un tampon 1 contenant 25 mM de HEPES (pH 7,9), 5 mM MgCl₂ 0,5 mM DTT additionné de 1 mM d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics, Barcelone, Espagne). Ensuite, le NP40 a été ajouté à une concentration finale de 1% (v / v) et les lysats ont été incubés pendant 15 minutes dans de la glace. Les noyaux ont été sédimentés par centrifugation à 2500 rpm pendant 1 min à 4 °C et le surnageant contenant la fraction cytoplasmique a été recueilli et gardé à 30 °C jusqu'à utilisation. La fraction restante (nucléaire) a été lavée dans le tampon 1 contenant du NP-40 (1%). Le culot nucléaire est lysé dans le tampon 2 contenant 25 mM HEPES (pH 7,9), NaCl 350 mM, 10% de sucrose, 0,05% de NP-40, 1 mM de DTT et des inhibiteurs de protéases. La fraction nucléaire a été centrifugée pendant 1 h à 4 °C. Le surnageant contenant les protéines solubles nucléiques est centrifugé à 14 000 rpm pendant 10 min, puis gardé à 30 °C.

3.4. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

3.4.1. EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES

3.4.1.1. Extraction de l'ARN total

Pour l'extraction de l'ARN total à partir de cellules, le kit PureLink™ RNA Mini (Invitrogen) a été utilisé.

Méthodologie

L'ARN total a été extrait à partir des lysats cellulaires. En fonction du fabricant, le volume du tampon de lyse a été ajusté pour le nombre de cellules. L'homogénéisation de l'échantillon a été faite à l'aide d'une aiguille de seringue de façon répétée. Une fois que l'échantillon est homogénéisé, le volume de 70% d'éthanol approprié, en fonction du nombre de cellules de départ a été ajouté, suivant les instructions du fabricant. Par la suite, ce mélange a été agité par le vortex et 700 µL de la suspension ont été transférés dans des colonnes de purification insérées dans tubes de centrifugation de 2 mL. Le contenu a été centrifugé à 12 000xg pendant 15 secondes à température ambiante. L'éluat a été éliminé et la colonne a été réinsérée dans le même tube de centrifugation. Ensuite, 700 µL de tampon de lavage 1 (Wash Buffer I, fournit par le kit) sont ajoutés à la colonne de purification et le contenu est centrifugé à 12 000 x g pendant 15 secondes à température ambiante. L'éluat a été éliminé et la colonne a été placée dans un nouveau tube de centrifugation de 2 mL. 500 µL de tampon de lavage 2 ont été ajoutés (tampon de lavage II, fournit par le kit) et le contenu a été centrifugé à 12 000xg pendant 15

secondes à température ambiante. Cette étape de lavage a été répétée deux fois. Enfin, la colonne a été insérée dans un nouveau tube de centrifugation de 1,5 mL et 25 µL de RNase ont été ajoutés. Le contenu a été incubé pendant 2 minutes à température ambiante et finalement l'ARN a été élué par centrifugation à 12 000xg durant 2 minutes. Cet ARN total obtenu a été stocké à -80 °C jusqu'à son utilisation.

3.4.1.2. Extraction de l'ARNm

Le kit Illustra Quick Prep Micro mRNA Purification (GE Healthcare Life Sciences) a été utilisé pour l'extraction de l'ARNm. Ce kit est conçu pour l'extraction directe de l'ARN polyadénylé (la polyadénylation se produit à l'extrémité 3' » durant la maturation de l'ARN pré-messager) à partir de petites quantités de tissu ou de cellules eucaryotes sans la nécessité d'une purification intermédiaire de l'ARN total.

Méthodologie

Tout d'abord, la résine de cellulose avec l'oligo- (dT) a été préparée. Pour cela, le tube oligo- (dT) -cellulose (fournit par le kit) est agité jusqu'à ce que la suspension devienne homogène. 1 mL de cette suspension a été transféré dans un tube de centrifugation et centrifugé pendant 10 secondes à 16 000xg. Le surnageant a été éliminé par la suite. Les culots cellulaires (maximum 10^7 cellules) ont été remis directement en suspension avec 0,4 mL de tampon d'extraction et ils ont été agités au vortex jusqu'à l'homogénéisation de la suspension. Ensuite, l'échantillon a été dilué avec 0,8 mL de tampon d'élution. Ce mélange a été centrifugé à 16 000xg pendant 1 minute à température ambiante et le surnageant a été transféré dans le tube préparé avec la résine de la matrice de cellulose avec oligo- (dT).

Ce surnageant a été incubé avec la résine de la cellulose avec oligo- (dT) pendant 3 minutes avec une agitation afin de faciliter la formation de liaisons hydrogènes entre les queues de poly (A) et d'oligo (dT) ancrée à la matrice de cellulose. Après ce temps d'incubation, le mélange a été centrifugé à 16 000xg pendant 10 secondes et le surnageant a été aspiré. Pour les lavages, 1 mL de tampon à forte concentration en sel a été ajouté, puis mélangé et centrifugé à 16 000xg pendant 10 secondes et le surnageant a été aspiré. Cette étape a été répétée 3-4 fois. Puis, le contenu a été lavé deux fois avec 1 mL de tampon à faible concentration en sel, puis mélangé et centrifugé à 350xg pendant 2 minutes. Une fois que le lavage a été effectué, 0,3 mL de tampon à faible concentration en sel avec de la résine ont été ajoutés puis mélangés avec une micropipette et transférés dans une colonne placée dans un tube de centrifugation de 2 mL. Le contenu a été centrifugé à 16 000xg pendant 5 secondes. La colonne a été lavée 2-3 fois avec 0,5 mL de tampon à faible teneur en sel. Enfin, la colonne est placée dans un tube

stérile et centrifugée à nouveau, puis 0,2 mL de tampon d'élution, préalablement chauffé à 65 °C ont été ajoutés sur la résine. Pour l'élution de l'ARNm, le tube a été centrifugé à une vitesse maximale pendant 5 secondes et l'ARNm obtenu a été gardé à -80 ° C jusqu'à utilisation.

3.4.2. RETROTRANSCRIPTION

La retro-transcription (RT) ou la transcription inverse est un processus qui consiste à générer une chaîne d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN par action de l'enzyme transcriptase reverse.

Méthodologie

Avant la rétrotranscription, l'ARN a été dilué (1 ng à 5 µg d'ARN total ou de 1 à 500 ng d'ARNm) dans de l'eau exempte de RNase pour obtenir un volume final de 7 µL. Ensuite, 1 µL de tampon de réaction (10X) et 2 µL de DNase I (1 unité / µL) ont été ajoutés et incubés. Après une incubation pendant 30 minutes à température ambiante, la réaction a été arrêtée par addition de 1 µL d'une solution contenant 50 mM d'EDTA, qui chélate les ions calcium et magnésium de la solution nécessaire à l'exécution de la DNase. Ainsi, La DNase présente dans le milieu réactionnel a été dénaturée afin d'empêcher la digestion de l'ADNc formé au cours de la rétrotranscription inverse. L'ARN traité avec de la DNase a été chauffé à 70 °C pendant 10 minutes. Cette étape de chauffage permet la dénaturation de l'ARN et l'élimination des structures secondaires possibles qui empêcheraient l'hybridation des amorces. Pour effectuer la RT, 10 µL de d'ARNm obtenu à partir de la digestion avec de la DNase I ont été préparés pour chaque condition, puis 10 µL d'un mélange contenant: 4,6 µL de tampon de réaction (5X), 2,35 µL di-thyothréitol (DTT, 0,1 M), 1,65 µL d'oligo (dT) 20 (50 µM), 1,15 µL de dNTP (10 mM), 0,35 µL Inhibiteur de RNase (130 U / µL), 0,5 µL d'eau a été ajouté. Tous les réactifs ont été obtenus auprès du fournisseur Invitrogen. La composition du tampon de réaction (5X) est 250 mM de TRIS-HCl, 375 mM de KCl et 15 mM de MgCl₂. Le mélange de dNTP est une solution aqueuse avec un (pH 7,5) des sels de sodiques de la dATP, la dCTP, la dGTP et la dTTP.

Ensuite, Le mélange a été chauffé à 42 ° C pendant 2 minutes jusqu' à atteindre la température optimale pour l'enzyme et l'hybridation des amorces à l'ARN. Ensuite l'enzyme transcriptase reverse (M-MLV RT) (200 U) a été ajouté à chaque tube. Dans ce mélange tous les composants sont en excès de sorte que l'ARNm soit le seul facteur limitant dans la réaction. Puis les tubes ont été placés dans le thermocycleur et maintenus à 42 °C pendant 50 minutes pour permettre la synthèse d'ADNc par la la transcriptase reverse. Enfin, la température été

augmentée jusqu'à 72 °C pendant 15 minutes pour inactiver l'enzyme. Enfin, les tubes réactionnels ont été centrifugés et l'ADNc a été stocké à -20 °C jusqu'à son utilisation.

3.4.3. REACTION DE LA POLYMERASE EN CHAÎNE (PCR)

La réaction de la polymérase en chaîne connu par son acronyme PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique de biologie moléculaire qui amplifie la séquence d'ADN spécifique (simple brin ou double brin) présente dans un échantillon complexe par un processus cyclique pour générer des millions de copies qui peuvent être utilisées pour diverses applications.

3.4.3.1. PCR en temps réel

La PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR, acronyme de la réaction en chaîne de polymérase quantitative) est une modification de la technique de PCR, introduite par Higuchi et al, en 1992, ce qui est une véritable révolution dans la recherche biomédicale. Cette technique permet la détection précise et la quantification du produit généré par la PCR simultanément que dans le processus d'amplification grâce à l'utilisation d'une technologie fluorescente. Durant la réalisation de cette thèse, les expériences de PCR en temps réel ont été réalisées à l'aide du dispositif 7500 PCR Real Time PCR System (Applied Biosystems) situé dans le département de biologie moléculaire à l'Université de Murcie. En outre, comme fluophore, le SYBR Green I a été utilisé comme agent intercalant qui se lie avec une haute affinité à l'ADN double brin en augmentant sa fluorescence d'environ 1 000 fois.

La méthode de quantification relative est basée sur la comparaison du Ct du gène en question au Ct du gène de référence (β -actine, GAPDH, etc). En utilisant le modèle mathématique du delta Ct (Δ Ct), nous pouvons déterminer le nombre de copies d'un gène par rapport au nombre de copies du gène de référence (β -actine dans notre cas), en supposant que l'efficacité d'amplification de la PCR est 100% pour le gène en question :

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{gène en question}) - \text{Ct} (\beta\text{-actine})$$

$$2^{-\Delta\text{Ct}} = \text{nombre de copies du gène d'intérêt} / \text{copie de } \beta\text{-actine}$$

De plus, cette quantification relative permet également de connaître la variation de l'expression d'un gène particulier lorsque les cellules ont été soumises à différents traitements ou exposés à différentes situations expérimentales. Pour cela, nous avons utilisé le modèle mathématique du delta-delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct), qui permet de comparer le nombre de copies du gène d'intérêt par

rapport au nombre de copies du gène de référence, dans différentes conditions expérimentales:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{condition de contrôle}) - \Delta Ct (\text{traitement})$$

2⁻ $\Delta\Delta Ct$ = nombre de fois que varie l'expression d'un gène après le traitement comparé au contrôle.

Méthodologie

Les expériences de PCR en temps réel ont été effectuées en utilisant des plaques de 96 puits (Microamp optical 96 well reaction plates, Applied Biosystems). Dans chaque puits de la plaque, 8 μL d'ADNc (0,4 - 0,04 μg), 1 μL de chaque amorce forward et reverse (10 μM) et 10 μL du mélange réactionnel Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) contenant le fluorochrome SYBR Green I, le dNTP, l'ADN polymérase AmpliTaq Gold et le fluorophore ROX comme référence ont été mis dans le tampon de réaction optimisé pour la réaction. L'AmpliTaq Gold ADN polymérase est activée uniquement à des températures élevées. Cela permet d'effectuer une PCR Hot Start qui permet d'éviter la formation de dimères d'amorces ou l'élongation non spécifique des amorces pendant la PCR. En outre, la présence du fluorophore ROX permet d'éliminer la fluorescence résiduelle de la plaque et permet la détection de la fluorescence du SYBR Green I avec une plus grande sensibilité et efficacité. Une fois tous les réactifs ont été ajoutés dans les puits, la plaque a été couverte avec un adhésif spécial (pour éviter l'évaporation pendant le chauffage) et centrifugée à 1 500 rpm durant 1 minute. Enfin, la plaque a été placée dans le thermocycleur (7500 Real Time PCR System de Applied Biosystems) et le programme avec les conditions souhaitées a été établi. Le programme Le programme de PCR comporte 3 étapes: une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min, suivie par un programme d'amplification de 40 cycles (15 s à 95°C, 11 s à 55°C, 22 s à 72°C), avec une lecture unique de la fluorescence de SYBR green en fin de chaque élongation terminée par un programme de courbe de fusion (dénaturation à 95 °C pendant 15 secondes, renaturation des brins d'ADN par abaissement de la température à 60 °C pendant 1 minute et dénaturation lente par élévation de la température à 95 °C pendant 15 secondes) pour établir la courbe de dénaturation du fragment d'ADN amplifié et déterminer la T_m .

3.5. APPROCHES BIOINFORMATIQUES

3.5.1. MODELISATION MOLECULAIRE

Le programme « Protein Data Bank » regroupe la majorité des structures protéiques (Koh *et al.*, 2006) et un grand nombre de structures d'une même molécule avec ou sans ligand. Ce qui permet d'avoir une information pertinente sur la molécule d'intérêt par modélisation comparative (Scarborough *et al.*, 1991). Le modèle tridimensionnel de la protéine macrovipectine a été obtenu en utilisant la modélisation comparative à l'aide du programme MODELLER qui produit une structure représentative de la séquence fournie, à l'aide d'un modèle choisi grâce aux homologues qu'il présente avec cette séquence. La recherche d'homologues des deux chaînes α et β de la protéine macrovipectine a été effectuée à partir de sa séquence primaire à l'aide du programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) qui permet d'effectuer un alignement de séquence pour identifier les molécules similaires dans la banque des protéines (Protein Data Bank : PDB).

L'alignement de séquences cibles avec la matrice identifiée (le template) a été établi avec la méthode développée par Needleman et Wunsch qui utilise un algorithme de programmation dynamique implémenté dans le programme EMBOSS afin de réaliser un alignement global optimisé par inspection visuelle (pour mieux aligner les éléments de la structure secondaire). L'alignement sert à extraire les contraintes spatiales de la structure du modèle et à déterminer le modèle 3D de la macrovipectine en utilisant MODELLER (version 9.16). Une vingtaine de structures de la macrovipectine ont été générées pour chaque chaîne et les modèles obtenus ont été optimisés par minimisation en gradient conjugué et une dynamique moléculaire. La qualité globale de l'énergie a été évaluée en calculant le score DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) pour chaque modèle. La qualité stéréochimique de la structure et les profils énergétiques du modèle (packing des acides aminés) ont été calculés et évalués par le biais du diagramme de Ramachandran et Prosa plots. La sélection du modèle a été réalisée suite à l'ensemble des scores DOPE associés à une visualisation du modèle sur Pymol.

3.5.2. ARRIMAGE MOLECULAIRE

Le docking ou arrimage moléculaire est une technique permettant de simuler l'interaction entre un "récepteur" et son ligand (souvent une petite molécule). Plusieurs logiciels spécialisés permettent de réaliser ce type de simulations (DOCK, AUTODOCK et AUTODOCK VINA,

GLIDE, GOLD, RosettaDock, ZDOCK (protéine/protéine), HADDOCK (protéine/protéine), CHARMM.

Le modèle sélectionné de la macrovipecetine a été utilisé afin de déterminer l'interaction protéine-protéine entre la molécule d'intérêt et l'intégrine $\alpha\beta3$. Nous avons utilisé une structure du co-cristal de l'intégrine en complexe avec un peptide cyclique RGDF (code PDB : 1L5G) à partir duquel nous avons supprimé le segment 440-956 de la chaîne a et 532-690 de la chaîne b. Par conséquent, la structure du récepteur correspondait à un domaine «propeller» β , un domaine $\beta1$ et un domaine hybride $\beta1$. Le serveur ClusPro a été utilisé pour effectuer l'arrimage, combinant une rapide transformation d'échantillonnage (qui est une étape de regroupement) et un raffinement de la minimisation de l'énergie en utilisant le programme CHARMM (Comeau *et al.*, 2004 ; Kozakov *et al.*, 2017). Les complexes obtenus ont été analysés en se basant sur les conditions électrostatiques et de van der Waals ensemble (vdW + Elec).

3.6. STATISTIQUES

Les résultats des expériences présentées dans cette thèse sont exprimés sous forme de moyennes \pm écart-type standard (SD) ou d'une erreur standard de la moyenne (SEM) d'un nombre de mesures entre 2 à 6 répétitions en fonction de l'expérience réalisée.

La différence statistique entre les différents groupes expérimentaux a été évaluée en utilisant le programme Microsoft Excel à l'aide de la méthode paramétrique du test t Student.

Dans d'autres cas, la différence statistique entre les différents groupes expérimentaux a été évaluée en utilisant le programme Graph Pad Prism 7 via deux tests :

- Le test One Way ANOVA (pour comparer les différents groupes en tenant compte d'un seul facteur dans l'analyse).
- Le test Two-Way ANOVA (pour comparer différents groupes en tenant compte de deux facteurs dans l'analyse).

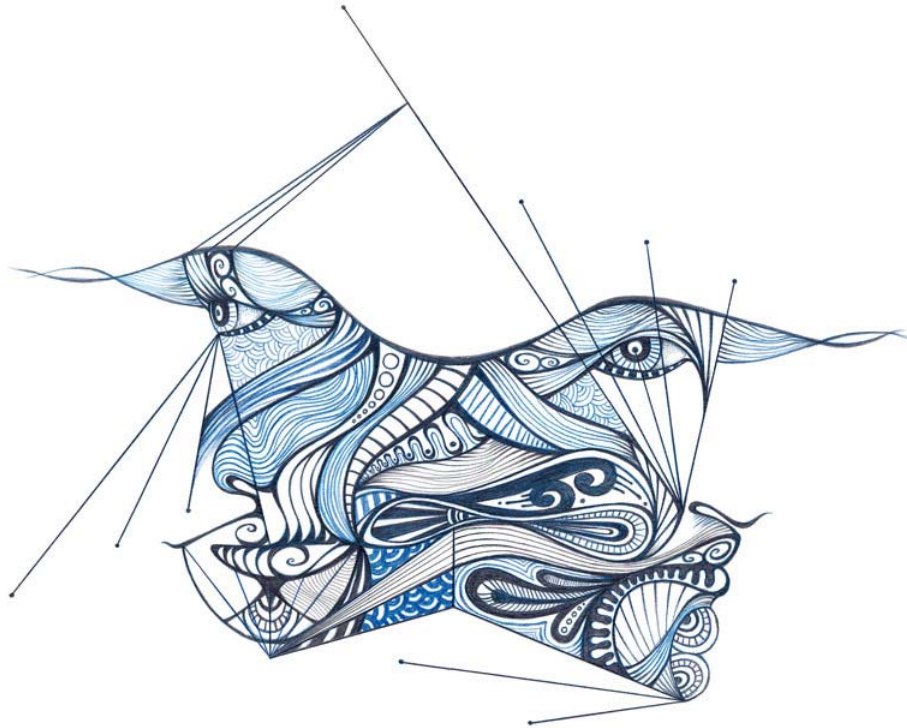
Lorsque $P < 0,05$, les résultats obtenus sont considérés statistiquement significatifs.

Dans des expériences de microscopie confocale, la co-localisation de différentes protéines marquées par les anticorps liés à des fluorochromes a été mesurée par le coefficient de corrélation de Pearson (r). Ce procédé nous a permis de déterminer la force de la relation linéaire entre les valeurs d'intensité de fluorescence et les pixels d'images correspondants pour chaque fluorochrome. Cet indice de corrélation r varie dans l'intervalle $[-1, 1]$, en étant $r = 1$, la corrélation est considérée positive parfaite ; $0 < r < 1$, la corrélation est positive ; $r = 0$, corrélation

est inexistante ; $-1 < r < 0$, la corrélation est négative ; et $r = -1$, la corrélation est négative parfaite.

Durant la réalisation de cette thèse, la courbe de régression linéaire a été employée pour l'élaboration de différentes courbes d'étalonnage. Ainsi, la courbe de régression linéaire a été appliquée par rapport à l'augmentation de l'absorbance à 415 nm en fonction du temps, afin de déterminer la pente utilisée pour calculer le facteur d'enrichissement cytosolique en nucléosomes dans les essais d'apoptose, comme est indiqué au paragraphe 3.2.2.2 de la présente thèse.

CAPÍTULO 4/ CHAPITRE 4



RESULTADOS/RESULTATS

*Une réalisation est toujours précédée
par une préparation spectaculaire.*

Robert H. Schuller

4. RESULTADOS/RESULTAS

4.1. LA LEBEINA, UNA DESINTEGRINA DERIVADA DEL VENENO DE SERPIENTE, INDUCE APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS DE MELANOMA

4.1. LA LEBEIN, UNE DESINTEGRINE DERIVEE DE VENIN DE SERPENT, INDUIT L'APOPTOSE DANS DES CELLULES DE MELANOME



4.1.1. TÍTULO/ TITRE

Lebein, a Snake Venom Disintegrin, Induces Apoptosis in Human Melanoma Cells.

4.1.2. AUTORES/ AUTEURS

Manel B. Hammouda, María F. Montenegro, Luis Sánchez-del-Campo, Ons Zakraoui, Zohra Aloui, Ichrak Riahi-Chebbi, Habib Karoui, José Neptuno Rodríguez-López* and Khadija Essafi-Benkhadir *

4.1.3. REFERENCIA/ REFERENCE

Toxins **2016**, *8*(7), 206

4.1.4. URL

<http://www.mdpi.com/2072-6651/8/7/206>

4.1.5. RESUMEN

El melanoma es el tipo de cáncer de piel más agresivo, con un mal pronóstico y caracterizado por sus propiedades muy invasivas y quimioresistentes. A pesar de que los recientes avances en la inmunoterapia podrían hacer pensar en tratamientos mejorados contra el melanoma todavía, hoy en día, hay una necesidad imperiosa de nuevos enfoques terapéuticos para superar los mecanismos de resistencia y los efectos secundarios asociados a los distintos tratamientos. De momento se han propuesto varias propiedades antitumorales para diferentes desintegrinas aisladas de serpientes venenosas, incluyendo la Lebeina; Sin embargo, el efecto exacto de la Lebeina en el melanoma no es conocido. En este estudio, mostramos que la Lebeina bloquea la proliferación celular del melanoma e induce un fenotipo más diferenciado, mediante la inhibición de la quinasa extracelular regulada por señal de fosforilación (ERK) y del factor de transcripción asociado con microftalmia (MITF). Tras la exposición a Lebeina, las células de melanoma fueron menos invasivas, presentando una sobreexpresión de E-cadherina. Además, la Lebeina fue capaz de inducir apoptosis independiente de caspasas, pero mediada por el factor inductor de la apoptosis (AIF) y la proteína X asociada a BCL-2 (BAX). El tratamiento con Lebeina también produjo una disminución de BCL-2. Dependiendo del estado de la línea celular, con respecto a p53 (tipo salvaje o mutante), la Lebeina generó una respuesta distinta en relación con la activación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Por lo tanto, en este artículo, proponemos a Lebein como un nuevo candidato para el desarrollo de posibles terapias contra el melanoma.

4.1.5. RESUME

Le mélanome est la forme la plus agressive des cancers de la peau qui se caractérise par un grand potentiel métastatique, ce qui le rend très résistant aux thérapies actuelles. Son mauvais pronostic est dû à la résistance à la chimiothérapie. Malgré les récentes recherches prometteuses dans le domaine de l'immunothérapie, il y a un besoin urgent de nouvelles approches thérapeutiques afin de bien comprendre les mécanismes de résistance aux traitements et éviter leurs effets secondaires. Les propriétés anti-néoplasiques de différentes désintégrines purifiées à partir des venins de serpents ont été mises en évidence dans plusieurs travaux. Notre groupe a validé le pouvoir antitumoral de la Lebein, une désintégrine du venin de la vipère Tunisienne *Macrovipera lebetina* sur des cellules tumorales originaires d'un adénocarcinome du colon. Cependant, l'effet de la Lebein dans le mélanome n'a jamais été investigué. Ainsi, dans cette étude, nous avons montré que Lebein inhibe la prolifération des cellules tumorales originaires d'un mélanome agressif et induit un phénotype cellulaire plus

différencié associé à une inhibition de la phosphorylation de la kinase (ERK, extracellular signal-regulated kinase) et la surexpression du facteur de transcription (MITF, microphthalmia-associated transcription factor). Après traitement avec la protéine Lebein, les cellules de mélanome ont perdu leur capacité d'adhésion et elles étaient moins invasives avec une surexpression de la protéine E-cadhérine. Cette désintégrine a induit une apoptose indépendante des caspases impliquant la protéine (AIF, Apoptosis inducing factor). Cette mort cellulaire programmée a été associée à une surexpression des protéines proapoptotiques, Bax et Bim et à une inhibition des niveaux protéiques de la protéine anti-apoptotique (Bcl-2). La lebein a modulé d'une manière différentielle les niveaux intracellulaires des espèces réactives d'oxygène (ROS) et les taux de p53 en fonction de la lignée cellulaire utilisée et le statut de p53 dans ces cellules (type sauvage ou muté). A la lumière de ces activités, nous avons proposé la Lebein comme un nouveau candidat anti-tumoral à potentiel thérapeutique pour le mélanome.

4.2. LA MACROVIPECETINA, UNA LECTINA DE TIPO C DERIVADA DE MACROVIPERA LEBETINA, INHIBE LA PROLIFERACIÓN Y SUPRIME LA MIGRACIÓN EN LAS CÉLULAS DE MELANOMA SK-MEL-28 Y LAS SENSIBILIZA PARA EL CISPLATINO

4.2. LA MACROVIPECETINE, UNE LECTINE DE TYPE C, DERIVEE DE MACROVIPERA LEBETINA, INHIBE LA PROLIFERATION, LA MIGRATION ET L'INVASION DANS DES CELLULES DU MELANOME SK-MEL-28 ET LES SENSIBILISE A LA DROGUE CISPLATINE



4.2.1. TÍTULO/TITRE

Macrovipecetin, a C-type lectin from Macrovipera lebetina venom, inhibits proliferation, migration and invasion of SK-MEL-28 human melanoma cells and enhances their sensitivity to Cisplatin

4.2.2. AUTORES/ AUTEURS

Manel B. Hammouda, Ichrak Riahi-Chebbi, Soumaya Soud, Houcemeddine Othman, Zohra Aloui, Najet Srairi-Abid, Habib Karoui, Ammar Gasmi[†], Edith M. Magnenat, Timothy N. C. Wells[‡], Kenneth J. Clemetson, José Neptuno Rodríguez-López* and Khadija Essafi-Benkhadir*

4.2.3. REFERENCIA/ REFERENCE

Biochim Biophys Acta. 2017 Nov 28;1862(3):600-614.

4.2.4. URL

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416517303859>

4.2.5. RESUMEN

La resistencia del melanoma a un amplio número de tratamientos es un problema clínico muy importante. El cisplatino es un agente quimioterapéutico que genera daños en el ADN e induce apoptosis en un amplio rango de células tumorales y, en la actualidad, se utiliza en el tratamiento del melanoma maligno. Sin embargo, su eficacia, en algunos casos, se ve disminuida por la aparición de resistencias a este fármaco. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos inhibidores tumorales que pueden impedir la resistencia del melanoma maligno al cisplatino podría ser de interés. Con este fin, purificamos la macrovipecetina, una proteína heterodimérica y lectina de tipo C, a partir del veneno de la serpiente *Macrovipera Lebetina*. En este trabajo, investigamos el efecto antitumoral de esta proteína y los efectos de su combinación con el cisplatino en las células SK-MEL-28 de melanoma humano.

Se observó que la macrovipecetina disminuía la viabilidad celular de SK-MEL-28 con más eficiencia que el cisplatino. Además, cuando se combinaron ambos fármacos la macrovipecetina aumentaba la sensibilidad de SK-MEL-28 al cisplatino, aumentando la inducción de apoptosis mediante la activación de las quinasas ERK1/2, p38 y Akt. La muerte celular, provocada por la combinación de fármacos, estaba mediada por un aumento en la expresión del factor inductor de apoptosis (AIF) y resultó ser independiente de la activación de caspasas. Por otra parte, la macrovipecetina sola o combinada con el cisplatino desencadenó la activación del factor de transcripción NF- κ B y se inducía la expresión de TRADD con la consiguiente acumulación de p53, que activaba proteínas relacionadas con la apoptosis como Bax, Bim y Bad e inhibía la expresión de Bcl-2, una proteína anti-apoptótica. Los resultados indican que la macrovipecetina sola o en combinación con el cisplatino actúa como una molécula antioxidante, disminuyendo los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células SK-MEL-28. Además, la macrovipecetina sola o en combinación con cisplatino también disminuyó la adhesión de las células SK-MEL-28 a diferentes matrices como poli-L-lisina, fibrinógeno, fibronectina y vitronectina a través de la regulación, a la baja, de la expresión de la integrina $\alpha\beta$ 3. Un estudio *in silico* sugiere que sólo la cadena α de la macrovipecetina interactuaba con el motivo RGD de la integrina $\alpha\beta$ 3. En general, los tratamientos ensayados inhibían la migración y la invasión celular, regulando la expresión de proteínas como E-cadherina, vimentina, β -catenina, C-src y Rho A, lo que resulta compatible con la adquisición de un fenotipo menos invasivo en las células de melanoma tratadas con macrovipecetina. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la macrovipecetina posee un

potencial terapéutico para evitar la resistencia de las células de melanoma a la quimioterapia con cisplatino.

4.2.5. RESUME

L'échec du traitement du mélanome malin est un problème clinique majeur. Le cisplatine, est un agent chimiothérapeutique qui provoque des dommages dans l'ADN et induit une apoptose cellulaire. Il est couramment utilisé dans le traitement du mélanome malin. Cependant, son efficacité est remise en question par la résistance des cellules de mélanome à la thérapie. Par conséquent, la recherche de nouveaux agents anti-tumoraux pouvant pallier à la résistance du mélanome malin aux traitements, est une alternative très prometteuse. À cet effet, nous avons purifié la macrovipecetine, une protéine hétérodimérique appartenant à la famille des lectines de type C à partir du venin de *Macrovipera Lebetina*. Nous avons validé son pouvoir anti-tumoral *in vitro* et nous avons caractérisé son mécanisme d'action dans des cellules originaires d'un mélanome.

Nous avons montré que cette protéine non seulement dotée d'une activité anti-proliférative mais combinée avec la drogue chimio thérapeutique, cisplatine a exercé un effet synergique sur la viabilité des cellules cancéreuses SK-MEL-28, IGR-39 et A375.

La macrovipecetine a sensibilisé les cellules SK-MEL-28 au cisplatine en augmentant leur apoptose par activation des kinases ERK1/2, p38 et AKT. Ainsi, la mort cellulaire induite a été associée à une augmentation de l'expression de la protéine (AIF), le principal médiateur de l'apoptose indépendante des caspases. De plus, la macrovipecetine seule ou combinée à la drogue a déclenché l'activation du facteur NF- κ B et a induit l'expression de TRADD avec l'accumulation de la protéine p53, qui à son tour a régulé les protéines pro-apoptotiques Bax, Bim et Bad et a inhibé l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Nos résultats ont indiqué que la macrovipecetine seule ou combinée au cisplatine agit comme une molécule antioxydante en diminuant les taux des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules de mélanome SK-MEL-28. D'une manière intéressante, la protéine seule ou en combinaison avec la drogue a inhibé l'adhésion des cellules SK-MEL-28 à différentes matrices extracellulaires via l'inhibition de l'expression de l'intégrine $\alpha\beta$ 3. L'étude *in silico* par arrimage moléculaire a suggéré que la macrovipecetine établit une interaction avec l'intégrine $\alpha\beta$ 3 uniquement via sa chaîne α et le motif RGD. Ces traitements ont également bloqué la migration et l'invasion cellulaire en induisant une surexpression de la protéine E-cadherine, une modulation négative des taux de protéines vimentin, RhoA, C-Src et β -catenine ce qui est en faveur d'un phénotype moins invasif de ces cellules. Ainsi, nos résultats suggèrent que la

protéine macrovipecetine peut avoir un potentiel thérapeutique pour les mélanomes résistants à la chimiothérapie en tant que composé naturel qui pourrait être utilisé seul ou en association avec le médicament chimiothérapeutique, le cisplatine.

4.3. UNA NUEVA TERAPIA HIPOMETILANTE PARA INDUCIR APOPTOSIS DEPENDIENTE DE E2F1 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA CON RECEPTOR DE ESTRÓGENO- α -NEGATIVO

4.3. UNE NOUVELLE THÉRAPIE HYPO-MÉTYLANTE INDUISANT L'APOPTOSE DÉPENDANTE D'E2F1 DANS DES CELLULES CANCÉREUSES DU SEIN N'EXPIMANT PAS LE RECEPTEUR D'ŒSTROGENE α

BMC
Cancer



BioMed Central
The Open Access Publisher

4.3.1. TÍTULO/ TITRE

Promoting E2F1-mediated apoptosis in oestrogen receptor- α -negative breast cancer cells.

4.3.2. AUTORES/ AUTEURS

Montenegro MF, Collado-González Mdel M, Fernández-Pérez MP, **Hammouda MB**, Tolordava L, Gamkrelidze M, Rodríguez- López JN.

4.3.3. REFERENCIA/ REFERENCE

BMC Cancer **2014**, 14 :539

4.3.4. URL

<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-14-539>

4.3.5. RESUMEN

Es conocido que en células de cáncer de mama ER α -positivas el receptor de estrógeno α (ER α) regula la expresión de E2F1 para mediar la resistencia al tamoxifeno. Por lo tanto, nuestro objetivo fue definir el posible papel de ER α y E2F1 en la resistencia de células de cáncer de mama ER α -negativas al 4-hidroxitamoxifeno (4OHT). En este estudio se han utilizado técnicas convencionales para demostrar los efectos del 4OHT sobre la expresión de ER α y E2F1 y también se han examinado los efectos individuales y combinados del 4OHT con dipiridamol (DIPY) y 3-O- (3,4,5-trimetoxibenzoil) -(-)-catequina (TMCG) en células de cáncer de mama ER α -negativas, la línea MDA-MB-231, utilizando ensayos de viabilidad, tinción de Hoechst, espectroscopía de masas MALDI-TOF y microscopía confocal. A pesar del fenotipo ER α -negativo de las células MDA-MB-231, se observó que el 4OHT regulaba de forma eficiente ER α en estas células y que esta regulación positiva promovía el crecimiento celular mediado por E2F1. Debido a que E2F1 juega un doble papel en el crecimiento celular/apoptosis, diseñamos una terapia que incorpora TMCG/DIPY para aprovechar la expresión elevada de E2F1 en estas células tratadas con 4OHT. Observamos que el 4OHT actuaba de forma sinérgica con esta combinación y mejoraba la toxicidad de la terapia TMCG/DIPY en células de cáncer de mama ER-negativas. Dado que el tratamiento con TMCG/DIPY modula el estado/estabilidad de metilación de E2F1, los resultados demuestran que las terapias dirigidas contra la maquinaria epigenética de las células cancerosas en presencia de un E2F1 sobreexpresado pueden dar como resultado una muerte celular eficiente mediada por E2F1.

4.3.5. RESUME

Etant donné que le récepteur d'oestrogène α (ER α) régule l'expression d'E2F1 pour médier la résistance au tamoxifène dans les cellules de cancer du sein à ER α -positif, nous avons cherché à définir les rôles possibles de ER α et E2F1 dans la résistance des cellules de cancer du sein (ER α -négatif) au 4-hydroxy-tamoxifène (4OHT).

En dépit du statut ER α -négatif des cellules MDA-MB-231, nous avons observé que 4OHT a activé l'expression du récepteur ER α dans ces cellules et que cette régulation positive médiée par E2F1 a favorisé la croissance cellulaire. E2F1 joue un double rôle dans la prolifération cellulaire et l'apoptose. Pour cette raison, nous avons conçu une thérapie combinée TMCG / DIPY afin d'augmenter l'expression E2F1 dans les cellules traitées par le 4OHT. Le 4OHT a augmenté la toxicité de TMCG / DIPY dans les cellules tumorales MDA-MB-231 (ER α -négatif). Le traitement par le TMCG / DIPY a modulé la méthylation et la stabilité de E2F1 ce qui suggère

que les thérapies ciblant le mécanisme épigénétique des cellules cancéreuses en induisant une surexpression de E2F1 peuvent entraîner une mort cellulaire médiée par cette protéine.

CAPÍTULO 5



CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

*Por la ignorancia nos equivocamos
y por las equivocaciones aprendemos*

Proverbio Romano

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. CONCLUSIONES

En el melanoma

- 1) La Lebeina inhibe la viabilidad celular de las células de melanoma SK-MEL-28 y LU-1205.
- 2) En células SK-MEL-28 con p53-mutado, la Lebeina activa la expresión de p53, que a su vez regula negativamente los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) al actuar como un antioxidante. Sin embargo, en las células LU-1205, que disponen de un p53 salvaje, la Lebeina inhibe la expresión de p53, ejerciendo una función prooxidante, que se traduce en la generación de ROS. En cualquier caso, el desencadenamiento de la apoptosis por la Lebeina no requiere de la activación de p53.
- 3) La Lebeina induce la diferenciación de las células de melanoma mediante la acumulación del factor de transcripción MITF. Esta acumulación es debida a la inhibición de la fosforilación de la kinasa ERK y la activación de la expresión de la proteína E-cadherina.
- 4) La Lebeina induce una apoptosis independiente de caspasas, aunque mediada por la proteína AIF. Como consecuencia, la Lebeina estimula las expresiones de proteínas pro-apoptóticas, como Bax y Bim, mientras que inhibe la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2.
- 5) La macrovipecetina sola o combinada con el cisplatino inhibe la viabilidad celular de las células de melanoma SK-MEL-28, IGR-39 y A-375.
- 6) El tratamiento macrovipecetina-cisplatino induce apoptosis a través de la proteína AIF y el receptor de muerte celular TRADD. Esta última proteína asociada a TNF-R1 induce la fosforilación de NF- κ B que actúa como una proteína pro-apoptótica, que, a su vez, activa la expresión de p53.
- 7) Por lo tanto, la activación de p53 por nuestro tratamiento reduce los niveles de ROS, activa las proteínas proapoptóticas Bax y Bad e inhibe la proteína antiapoptótica Bcl-2, cuya función podría estar antagonizada por unos mayores niveles de proteína Bim.

8) La macrovipecetina sola o combinada con cisplatino regula la vía de supervivencia mediada por las kinases ERK1/2, AKT y p38.

9) La macrovipecetina sola o combinada con el cisplatino inhibe la adhesión de las células de melanoma a varias matrices tales como la poli-L-lisina, Fibrogéno, Fibronectina y Vitronectina mediante la inhibición de la integrina $\alpha\beta3$.

10) El estudio *in silico* (Docking) demostró que la cadena α de la macrovipecetina, a través de su secuencia RGD, interacciona con la integrina $\alpha\beta3$.

11) La macrovipectina, sola o en combinación con el fármaco, cisplatino, fue capaz de regular dos proteínas relacionadas con la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la invasividad del melanoma, la E-cadherina y la vimentina. Se observó un aumento de la expresión de E-cadherina y una disminución de la vimentina. Además, estos tratamientos bloquearon la migración y la invasión de las células de melanoma al inhibir la expresión de las proteínas β -catenina, c-Src y RhoA.

En el cáncer de mama

1) 4-Hidroxitamoxifeno (4OHT) estimula la expresión del receptor ER α en células de cáncer de mama con receptor ER α negativo.

2) ER α regula la expresión de E2F1 en respuesta al tratamiento con Tamoxifeno en las células de cáncer de mama con receptor ER- α positivo.

3) Aquí, presentamos una terapia experimental que es efectiva en células de cáncer de mama independientemente de su estado de p53 y ER α , y confirmamos la hipótesis de que la elevación de E2F1 en presencia de estrés genotóxico podría representar una valiosa terapia contra el cáncer

4) Debido a que se requiere la desmetilación de E2F1 para su acumulación tras daño en el ADN y la activación de sus genes proapoptóticos diana (como p73, Apaf1 y Bim, entre otros), las terapias dirigidas a la maquinaria epigenética de las células cancerosas pueden resultar útiles para promover apoptosis, dependiente de E2F1, en tumores deficientes en p53.

5) Dado que el tratamiento con TMCG/DIPY modula el estado de metilación y la estabilidad de E2F1, observamos que la sobreexpresión dependiente de 4OHT de E2F1 influye

positivamente en la muerte celular mediada por E2F1 en células de cáncer de mama ER α negativas.

5.2. PERSPECTIVAS

Aunque nuestros resultados son alentadores, nuestro estudio no tiene en cuenta el microambiente tumoral. El estudio del microambiente tumoral es importante y es posible que nuevas interacciones estén involucradas en la resistencia de los melanomas. Por lo tanto, sería interesante validar esta actividad antitumoral de la Lebeina y la macrovipecetina en un modelo de tumorigénesis in vivo en ratones atímicos "desnudos".

Los estudios clínicos de pacientes con resistencia a la quimioterapia basada en el cisplatino también prometen validar la capacidad de la macrovipecetina para revertir la resistencia a este fármaco y para identificar a los actores en esta resistencia que probablemente serían marcadores predictivos de la falla terapéutica.

CHAPITRE 5



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Par ignorance nous nous trompons

Et des erreurs nous apprenons

Proverbe Romain

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5.1. CONCLUSIONS

Dans le monde entier, l'incidence du mélanome malin a augmenté plus rapidement que toute autre tumeur solide. Ainsi, 60 à 80% de décès sont dus au cancer de la peau (Eggermont *et al.*, 2014). Malgré les avancées majeures qui ont été réalisées dans la compréhension du mélanome au cours de la dernière décennie, le traitement de ce cancer malin à un stade avancé reste difficile. Le mauvais pronostic du mélanome est dû à la forte résistance des cellules de mélanome aux médicaments chimiothérapeutiques conventionnels y compris les médicaments à base de platine comme le cisplatine (Ascierto *et al.*, 2010).

Dans ce contexte, la caractérisation et l'identification de biomolécules actives, des combinaisons de médicaments et de nouvelles cibles cellulaires dans le mélanome pourraient aider à développer de nouvelles thérapies afin de pallier à cette résistance et d'améliorer l'efficacité et la réponse au traitement.

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans le cadre des objectifs et thématiques du Laboratoire d'Epidémiologie moléculaire et Pathologie Expérimentale Appliquée aux maladies infectieuses (LR11IPT04) à l'Institut Pasteur de Tunis et du Département de Biochimie et Biologie Moléculaire A à l'Université de Murcie en Espagne. Ils sont orientés essentiellement vers la valorisation et la caractérisation de biomolécules d'origine naturelles sur des modèles pertinents de pathologie expérimentale *in vitro*. Cela servira à la découverte de nouveaux agents thérapeutiques et anti-cancéreux. Une grande partie de cette thèse s'est basé sur la mise en évidence de l'activité pharmacologique de protéines identifiées à partir de sources naturelles (venins) en particulier d'une désintégrine purifiée à partir du venin de la vipère *Macrovipera Lebetina* (1. Lebein) et une lectine de type C extraite à partir du même venin (2. Macrovipecetine, seule ou combinée au cisplatine) sur des cellules tumorales originaires d'un mélanome. La caractérisation du mécanisme d'action et l'identification de cibles cellulaires impliquées dans l'action de ces biomolécules ont constitué la majeure partie des travaux effectués dans cette thèse dans la perspective de développer de nouveaux agents thérapeutiques anti-cancéreux et d'identifier des pistes prometteuses associées à la pathologie.

a. La lebein du venin de *Macrovipera lebetina* induit l'apoptose dans les cellules de mélanome

L'introduction de nouveaux composés naturels pour le traitement du cancer a impliqué l'utilisation de différentes molécules isolées des venins de serpent comme les lectines de type C et les désintégrines. Ces dernières sont des protéines qui sont capables de se lier spécifiquement aux intégrines cellulaires et bloquent leur activité et leur expression et par conséquent les processus de l'adhésion et la migration cellulaire, la prolifération et l'angiogenèse (Zakraoui *et al.*, 2016).

Nous avons montré que la Lebein a inhibé la prolifération de deux lignées cellulaires de mélanome, SK-MEL-28 et LU-1205, d'une manière dose dépendante après 24 h de traitement. Les cellules traitées avec la protéine ont montré des changements morphologiques tels qu'une perte d'ancrage, une réduction de volume, un aspect arrondi et une condensation de la chromatine. Par la suite, nous avons exploré la capacité de la Lebein à affecter les protéines impliquées dans les voies de prolifération et de survie.

MITF est le régulateur principal des cellules de mélanome, et il est responsable du contrôle de la plupart des processus cellulaires physiologiques importants, tels que la prolifération, l'invasivité, la résistance aux médicaments et d'autres fonctions. De nombreux composés naturels ont été validés en tant qu'inducteurs de la différenciation des cellules de mélanome et ceci via la régulation de MITF et l'inhibition de la phosphorylation ERK (Sztiller-Sikorska *et al.*, 2014). En se basant sur le fait que la Lebein a induit une diminution de la phosphorylation ERK, nous avons examiné si cela pourrait avoir un impact sur les niveaux de MITF et les processus cellulaires en aval. Comme attendu, ce blocage dans l'activité ERK a entraîné une augmentation des taux de transcrits et de protéines MITF.

Il est connu que des niveaux augmentés de MITF sont associés non seulement à un phénotype plus différencié avec moins de prolifération cellulaire mais aussi à des propriétés non invasives. Il a été démontré que la perte de l'E-cadhérine est capable de favoriser l'invasion cellulaire (Onder *et al.*, 2008). D'une manière intéressante, la Lebein a induit une augmentation dose-dépendante de la protéine E-cadhérine dans les deux lignées cellulaires après 24 h de traitement. Ceci a confirmé le phénotype moins invasif dans les cellules de mélanome SK-MEL-28 et LU-1205 induit par la Lebein.

Une étude de Smalley *et al.*, 2007, a rapporté que la surexpression de p53 induisait seulement l'apoptose dans les cellules où p53 est muté et non pas dans les cellules où p53 est sauvage (p53-WT). Ceci suggère que la surexpression de p53 n'était pas suffisante pour induire l'apoptose et que les cellules p53-WT possédaient d'autres mécanismes pour supprimer l'apoptose induite par p53. Ainsi, Il a été démontré qu'une perte d'expression de p53, due à la

régulation négative de SESN1, SESN2 et GPX1 sans effet sur les gènes prooxydants Bax, NQO1 et Puma, conduit à une augmentation de la génération des ROS et à des dommages oxydatifs de l'ADN. Par contre une activation de l'expression de p53 conduit à une inhibition des niveaux des ROS par augmentation des enzymes antioxydantes (Sablina *et al.*, 2005).

Vu qu'il existe une relation entre les niveaux des ROS et l'expression de la protéine p53, nous avons proposé de déterminer les niveaux des ROS et l'expression de p53, dans les deux lignées cellulaires de mélanome avec un différent statut en p53, SK-MEL 28 à p53-muté et LU1205 à p53-WT afin de mieux comprendre l'activité anti-tumorale de la Lebein. Ainsi, nous avons pu démontrer que la Lebein active l'expression de p53, qui à son tour, régule négativement les niveaux intracellulaires des ROS en agissant comme un anti-oxydant dans les cellules SK-MEL-28 (p53-muté) alors qu'elle inhibe l'expression de p53 en exerçant une fonction pro-oxydante traduite par la génération des ROS dans les cellules LU-1205 (P53-WT). L'une des formes de mort cellulaire les plus étudiées est l'apoptose, caractérisée entre autres par la fragmentation de l'ADN chromosomique. C'est un processus étroitement régulé qui peut être activé de différentes manières en raison du stress cellulaire ou en réponse à des signaux provenant d'autres cellules. L'un des signaux clés pour l'activation de l'apoptose est l'augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax et la diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Une fois que cela est déclenché, il y a une libération de cytochrome c de la mitochondrie qui active habituellement les caspases. Cependant, il y a des cas d'apoptose indépendante de la caspase, où se produit une libération d'AIF par les mitochondries, la translocation nucléaire et la fragmentation de l'ADN. Nos résultats ont suggéré que la Lebein a induit un signal de mort cellulaire apoptotique avec une augmentation de l'expression de Bim et du rapport Bax / Bcl-2 avec l'activation du facteur apoptotique, AIF.

En conclusion à cette première partie, nous avons validé l'effet bénéfique de la Lebein comme potentiel agent anti-tumoral via son rôle proapoptotique, anti-prolifératif et anti-invasif.

b. La macrovipecetine, une lectine de type C du venin de *Macrovipera lebetina*, inhibe la prolifération, l'adhésion, la migration et l'invasion des cellules humaines de mélanome SK-MEL-28 et améliore leur sensibilité au cisplatine

Comme les désintégrines, les lectines de type C, sont des antagonistes d'intégrines et ont été décrites par leur activité anti-tumorale (Marcinkiewicz, 2013). Dans cette deuxième partie, nous nous sommes concentrés non seulement sur l'identification d'une protéine snaclec avec une activité antitumorale, mais aussi sur l'amélioration de l'efficacité d'un médicament

chimiothérapique, la drogue cisplatine connue pour son efficacité limitée dans le mélanome quand elle est utilisée seule. Nous avons purifié et déterminé la structure de la macrovipectine qui est une protéine est hétérodimérique, composée de deux sous-unités (α - et β -) qui contiennent respectivement 131 et 127 résidus. Les Masses moléculaires des deux chaînes α et β étaient de 15422.7 et 15031.7 Da, respectivement, obtenues par spectrométrie de masse. En se basant sur le fait que les cellules de mélanome sont résistantes à un composé endommageant l'ADN, le cisplatine (Helmbach *et al.*, 2002), nous avons exploré le rôle de la macrovipectine dans l'amélioration de l'efficacité de cette drogue dans les cellules de mélanome humain.

Tou d'abord, l'effet de la macrovipectine, seule ou combinée à la drogue cisplatine a été testée sur des kératinocytes (cellules saines de la peau), afin de déterminer si le traitement affecte ou non des cellules saines. Nos résultats ont montré que ni la macrovipectine, ni le cisplatine n'étaient toxiques aux concentrations utilisées. *In vitro*, la macrovipectine seule ou combinée au cisplatine a inhibé la viabilité des trois lignées cellulaires testées, SK-MEL-28, A-375 et IGR-39 après un traitement de 24h et 72h. Cet effet inhibiteur de la prolifération cellulaire des cellules SK-MEL-28 a été associé à une inhibition des deux kinases de survie ERK_{1/2} et p38. Cette inhibition de la prolifération suite au traitement par la macrovipectine combinée à la drogue a été également associée à la déphosphorylation de la kinase AKT dont les niveaux élevés sont corrélés avec la progression tumorale (Dai *et al.*, 2005).

Même si les caspases jouent un rôle central dans le déclenchement de l'apoptose, plusieurs médiateurs tels que l'AIF et l'endonucléase G ont été considérés comme les effecteurs moléculaires de la mort cellulaire programmée indépendante des caspases (Delavallée *et al.*, 2011). La macrovipectine combinée au cisplatine a induit l'apoptose indépendante des caspases en activant la protéine AIF après 24h et 72h de traitement.

TRADD, récepteur de mort cellulaire, induit le facteur de transcription NF- κ B qui joue un rôle important dans la régulation de la signalisation anti-apoptotique (Micheau *et al.*, 2001) et pro-apoptotique (Fujioka *et al.*, 2004). Les médicaments chimiothérapeutiques combinés aux inhibiteurs de NF- κ B favorisent l'apoptose des cellules tumorales (Godwin *et al.*, 2013). Cependant, NF- κ B fonctionne également comme un facteur pro-apoptotique en stabilisant p53 afin d'initier l'apoptose cellulaire (Fujioka *et al.*, 2004). En cas de dommage irréparable, p53 induit les protéines pro-apototiques de la famille Bcl-2, telles que Bax, Noxa, Puma, Bik et Bid. De plus, pour déclencher l'apoptose mitochondriale, p53 peut également interagir directement avec les membres de la famille Bcl-2 (Schuler et Green, 2005). Dans ce travail, nous avons proposé la macrovipectine-cisplatine comme traitement induisant l'apoptose à travers la

protéine AIF et le récepteur de mort TRADD. Cette protéine du domaine de la mort associée au TNF-R1 induit la phosphorylation de NF- κ B qui agit comme une protéine pro-apoptotique, qui à son tour active l'expression de p53. Comme il a été décrit auparavant, il existe une relation évidente entre l'expression de p53 et les niveaux des ROS. De ce fait, p53, le suppresseur de tumeur le plus commun procède en inhibant les niveaux de ROS, active les protéines pro-apoptotiques, Bax et Bad et inhibe la protéine anti-apoptotique, Bcl-2 dont la fonction pourrait être antagonisée par une augmentation des taux de la protéine Bim (Hemann et Lowe, 2006). L'adhésion à la paroi vasculaire est l'une des étapes clés qui contribuent à la progression tumorale (Okegawa *et al.*, 2004). Vu que les snaclecs sont des inhibiteurs naturels des interactions intégrine-ligand (Sarray *et al.*, 2007) et que la macrovipectine appartient à cette famille de protéines, nous avons étudié la capacité de la protéine seule ou combinée, à affecter l'adhésion des cellules de mélanome SK-MEL-28 aux différentes protéines de la matrice extracellulaire. La macrovipectine a inhibé l'attachement des SK-MEL-28 à la poly-L-lysine, la fibronectine et vitronectine et elle a affecté légèrement leur adhérence au fibrinogène.

Nous avons constaté que l'adhésion cellulaire à la vitronectine et à la fibronectine est la plus affectée. Comme l'intégrine $\alpha\beta 3$ est un médiateur de la liaison de la vitronectine aux cellules de mélanome et joue un rôle primordial dans leur agressivité (Ganguly *et al.*, 2013), nous avons stipulé que la protéine interagirait avec l'intégrine $\alpha\beta 3$ dans les cellules SK-MEL-28. Nous avons effectué un test d'adhésion en utilisant un anticorps bloquant de cette intégrine $\alpha\beta 3$ utilisée comme matrice. Nos résultats ont montré que le traitement par la macrovipectine seule ou combinée à la drogue a inhibé significativement l'expression de l'intégrine $\alpha\beta 3$ après 24h et 72h de traitement.

Par la suite, nous avons analysé la signification biologique de cette interaction par arrimage moléculaire (Docking). Dans un premier temps, nous avons étudié et caractérisé la structure tridimensionnelle (3D) de la macrovipectine par modélisation moléculaire. Cette analyse est un élément déterminant pour la compréhension de son mécanisme d'action et indispensable pour le développement d'approches thérapeutiques rationnelles. Dans un deuxième temps, l'étude *in silico* des interactions et des sites de fixation de cette protéine et son ligand par docking ont montré que la macrovipectine interagit avec l'intégrine $\alpha\beta 3$ via un site chevauchant le site de liaison du motif RGD.

La capacité des cellules tumorales à métastaser nécessite une prolifération cellulaire coordonnée, une survie cellulaire, une migration et invasion cellulaire (Friedl et Wolf, 2003). Dans le mélanome, la transition et la progression d'une hyperplasie bénigne des mélanocytes à une maladie dangereuse sont caractérisées par l'acquisition d'un comportement invasif

(Gaggioli et Sahai, 2007). Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à déterminer l'effet de la macrovipectine seule ou combinée au cisplatine sur l'inhibition de la migration et l'invasion des cellules SK-MEL-28 du mélanome. Un test de migration (Wound healing) a montré que la protéine seule ou combinée à la drogue a inhibé efficacement la migration des SK-MEL-28 après 24h et 72 de traitement.

Nous avons par la suite essayé d'étudier l'effet de la macrovipectine seule ou combinée au cisplatine sur la régulation de l'expression de plusieurs protéines impliquées dans l'inhibition de la migration et l'invasion des SK-MEL-28. D'une manière intéressante, la macrovipectine seule ou combinée à la drogue a été capable de réguler deux protéines connues comme marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et de l'invasivité dans le mélanome, l'E-cadhérine et la vimentine. Une augmentation de l'expression de l'E-cadhérine et l'inhibition de la vimentine ont été observées. De plus, notre traitement a bloqué la migration et l'invasion en inhibant l'expression des protéines β -caténine, c-Src et RhoA.

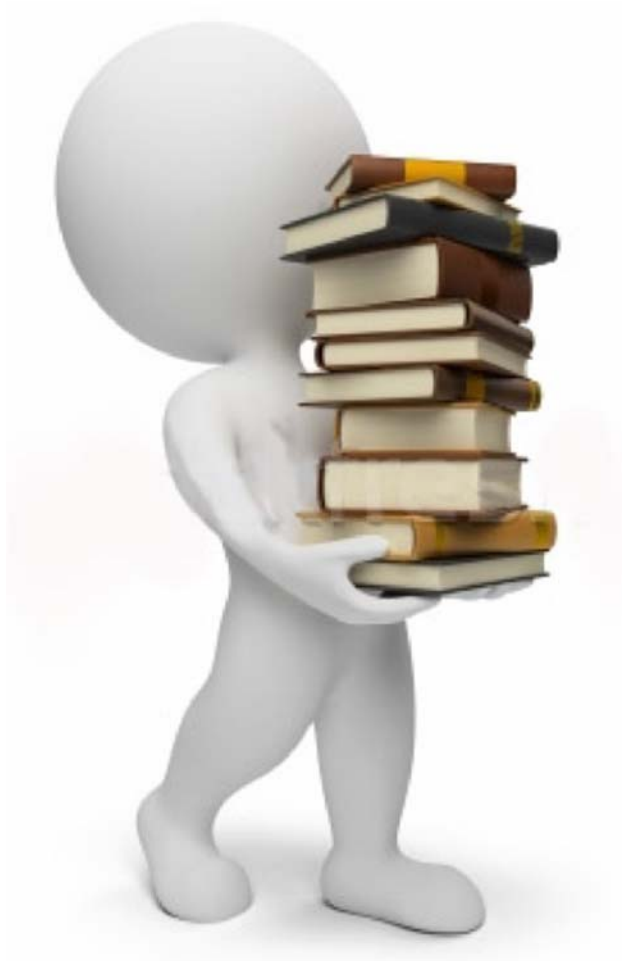
Ainsi, nos résultats suggèrent que la protéine Macrovipectine peut avoir un potentiel thérapeutique pour les mélanomes résistants à la chimiothérapie en tant que composé naturel qui pourrait être utilisé seul ou en association avec le médicament chimiothérapeutique, le cisplatine.

5.2. PERSPECTIVES

Bien que nos résultats soient encourageants, notre étude ne prend pas en considération le microenvironnement tumoral. L'étude du microenvironnement des tumeurs est importante et il est possible que de nouvelles interactions seraient impliquées dans la résistance des mélanomes. Il serait donc intéressant de valider cette activité anti-tumorale de la Lebein et de la macrovipectine dans un modèle de tumorigenèse in vivo sur des souris athymiques «nude».

Des études cliniques sur des patients présentant une résistance à une chimiothérapie à base de cisplatine est également prometteuse pour valider la capacité de la macrovipectine à reverser la résistance à cette drogue et identifier les acteurs de cette résistance qui constitueraient probablement des marqueurs prédictifs de l'échec thérapeutique.

CAPÍTULO 6/CHAPITRE 6



BIBLIOGRAFÍA/ REFERENCES

*La mente que se abre a una nueva idea
jamás volverá a su tamaño original*
Albert Einstien

*L'esprit qui s'ouvre à une nouvelle idée
Jamais ne reviens à sa taille d'origine*
Albert Einstien

6. BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

Abdelkafi-Koubaa, Z., Jebali, J., Othman, H., Morjen, M., Aissa, I., Zouari-Kesentini, R., Bazaa, A., Ellefi, A.A., Majdoub, H., Srairi-Abid, N., E. (2014) A thermoactive L-amino acid oxidase from *Cerastes cerastes* snake venom : purification, biochemical and molecular characterization. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 89, 32–44.

Adhami, V. M., Afaq, F., and Mukhtar, H. (2006) Insulin-Like Growth Factor-I Axis as a Pathway for Cancer Chemoprevention. *Clin. Cancer Res.* 12, 5611–5614.

Adhami, V. M., Siddiqui, I. A., Ahmad, N., Gupta, S., and Mukhtar, H. (2004) Oral Consumption of Green Tea Polyphenols Inhibits Insulin-Like Growth Factor-I-Induced Signaling in an Autochthonous Mouse Model of Prostate Cancer. *Cancer Res.* 64, 8715–8722.

Aguilar, A., Barron, E. M. (1998) Epidemiologia y factores de riesgo. En: Diaz-Rubio E, Escudero M, editors. *Cancer de mama. 1a ed Madrid Int. Mark. Commun.* SA 9–22.

Ahn, J., Sanz-Moreno, V., and Marshall, C. J. (2012) The metastasis gene NEDD9 product acts through integrin 3 and Src to promote mesenchymal motility and inhibit amoeboid motility. *J. Cell Sci.* 125, 1814–1826.

Aktas, O., Prozorovski, T., Smorodchenko, A., Savaskan, N. E., Lauster, R., Kloetzel, P.-M., Infante-Duarte, C., Brocke, S., and Zipp, F. (2004) Green tea epigallocatechin-3-gallate mediates T cellular NF-kappa B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 173, 5794–800.

Al Mahroos, M., Yaar, M., Phillips, T. J., Bhawan, J., and Gilchrest, B. A. (2002) Effect of sunscreen application on UV-induced thymine dimers. *Arch. Dermatol.* 138, 1480–5.

Alexander, M., and Bendas, G. (2011) The Role of Adhesion Receptors in Melanoma Metastasis and Therapeutic Intervention Thereof, in *Research on Melanoma - A Glimpse into Current Directions and Future Trends*. InTech.

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.

Alonso-Aperte, E., and Varela-Moreiras, G. (1996) Brain folates and DNA methylation in rats fed a choline deficient diet or treated with low doses of methotrexate. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 66, 232–6.

Anders, C. K., Johnson, R., Litton, J., Phillips, M., and Bleyer, A. (2009) Breast cancer before age 40 years. *Semin. Oncol.* 36, 237–49.

Anderson, R. A., and Polansky, M. M. (2002) Tea enhances insulin activity. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7182–6.

Appelman, Z. Blumberg, B. D. Golabi, M. Golbus, M. S. (1988) Nonimmune hydrops fetalis may be associated with an elevated delta AD450 in the amniotic. *Obstet* 71, 1005–1008.

Araújo, J. R., Gonçalves, P., Martel, F. (2011) Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*. 31, 77-87.

Arias-Salgado, E. G., Lizano, S., Sarkar, S., Brugge, J. S., Ginsberg, M. H., and Shattil, S. J. (2003) Src kinase activation by direct interaction with the integrin cytoplasmic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 13298–13302.

Arias-Salgado, E. G., Lizano, S., Shattil, S. J., and Ginsberg, M. H. (2005) Specification of the direction of adhesive signaling by the integrin beta cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 280, 29699–707.

Arlinghaus, F. T., and Eble, J. A. (2012) C-type lectin-like proteins from snake venoms. *Toxicon* 60, 512–519.

Arruda Macêdo, J. K., Fox, J. W., and de Souza Castro, M. (2015) Disintegrins from snake venoms and their applications in cancer research and therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 16, 532–48.

Ascierto, P. A., Streicher, H. Z., and Sznol, M. (2010) Melanoma: A model for testing new agents in combination therapies. *J. Transl. Med.* 8, 38.

Assaraf, Y.G. (2007). Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis. Rev.* 26, 153-181.

Assaraf, Y.G., Goldman, I.D. (1997) Loss of folic acid exporter function with markedly augmented folate accumulation in lipophilic antifolate-resistant mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry.* 272, 17460–17466.

Astill, C., Birch, M. R., Dacombe, C., Humphrey, P. G., and Martin, P. T. (2001) Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5340–7.

Avery-Kiejda, K. A., Bowden, N. A., Croft, A. J., Scurr, L. L., Kairupan, C. F., Ashton, K. A., Talseth-Palmer, B. A., Rizos, H., Zhang, X. D., Scott, R. J., and Hersey, P. (2011) P53 in human melanoma fails to regulate target genes associated with apoptosis and the cell cycle and may contribute to proliferation. *BMC Cancer.* 11, 203.

Avizienyte, E., Wyke, A. W., Jones, R. J., McLean, G. W., Westhoff, M. A., Brunton, V. G., and Frame, M. C. (2002) Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nat. Cell Biol.* 4, 632–8.

Bachmann, I. M., Straume, O., Puntervoll, H. E., Kalvenes, M. B., and Akslen, L. A. (2005) Importance of P-Cadherin, β -Catenin, and Wnt5a/Frizzled for Progression of Melanocytic Tumors and Prognosis in Cutaneous Melanoma. *Clin. Cancer Res.* 11, 8606–8614.

Badowska-Kozakiewicz, A. M., Patera, J., Sobol, M., and Przybylski, J. (2015) The role of oestrogen and progesterone receptors in breast cancer - immunohistochemical evaluation of

- oestrogen and progesterone receptor expression in invasive breast cancer in women. *Contemp. Oncol. (Poznan, Poland)* 19, 220–5.
- 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.
- Bakos, L., Wagner, M., Bakos, R. M., Leite, C. S. M., Sperhacke, C. L., Dzekaniak, K. S., and Gleisner, A. L. M. (2002) Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil. *Int. J. Dermatol.* 41, 557–562.
- Baliga, M. S., Meleth, S., and Katiyar, S. K. (2005) Growth Inhibitory and Antimetastatic Effect of Green Tea Polyphenols on Metastasis-Specific Mouse Mammary Carcinoma 4T1 Cells In vitro and In vivo Systems. *Clin. Cancer Res.* 11, 1918–1927.
- Bandyopadhyay, D., Chatterjee, T. K., Dasgupta, A., Lourduraja, J., and Dastidar, S. G. (2005) In vitro and in vivo antimicrobial action of tea: the commonest beverage of Asia. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 2125–7.
- Banerjee, S., Manna, S., Saha, P., Panda, C. K., and Das, S. (2005) Black tea polyphenols suppress cell proliferation and induce apoptosis during benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis. *Eur. J. Cancer Prev.* 14, 215–21.
- Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010) Integrins. *Cell Tissue Res.* 339, 269–280.
- Barrio, M. M. (2009) Chemoresistance to melanoma. *Acta bioquím. clín. latinoam.* 43, 1851–6114.
- Bastian, B. C., LeBoit, P. E., Hamm, H., Bröcker, E. B., and Pinkel, D. (1998) Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 58, 2170–5.
- Basu, S., Kolesnick, R. (1998) Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene.* 17 (25) 3277-3285.
- Bazaa, A., Marrakchi, N., El Ayeb, M., Sanz, L., and Calvete, J. J. (2005) Snake venomomics: Comparative analysis of the venom proteomes of the Tunisian snakes *Cerastes cerastes*, *Cerastes vipera* and *Macrovipera lebetina*. *Proteomics* 5, 4223–4235.
- Bazaa, A., Pasquier, E., Defilles, C., Limam, I., Kessentini-Zouari, R., Kallech-Ziri, O., Battari, A. El, Braguer, D., Ayeb, M. El, Marrakchi, N., and Luis, J. (2010) MVL-PLA2, a Snake Venom Phospholipase A2, Inhibits Angiogenesis through an Increase in Microtubule Dynamics and Disorganization of Focal Adhesions. *PLoS One* (Tailleux, L., Ed.) 5, e10124.
- Beecher, G. R. (2003) Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutr.* 133, 3248S–3254S.
- Belka, C., and Budach, W. (2002) Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. *Int. J. Radiat. Biol.* 78, 643–658.
- 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.

Ben Abdallah, M. (1997) Epidémiologie des cancers en Tunisie. *ATCC Tunis* 67–81.

Ben-Mabrouk, H., Zouari-Kessentini, R., Montassar, F., Koubaa, Z. A.-, Messaadi, E., Guillonneau, X., ElAyeb, M., Srairi-Abid, N., Luis, J., Micheau, O., and Marrakchi, N. (2016) CC5 and CC8, two homologous disintegrins from *Cerastes cerastes* venom, inhibit *in vitro* and *ex vivo* angiogenesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 86, 670–680.

Ben-Mabrouk, H., Zouari-Kessentini, R., Montassar, F., Koubaa, Z.A.-, Messaadi, E., Guillonneau, X., ElAyeb, M., Srairi-Abid, N., Luis, J., Micheau, O., et al. (2016). CC5 and CC8, two homologous disintegrins from *Cerastes cerastes* venom, inhibit *in vitro* and *ex vivo* angiogenesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 86, 670–680.

Berx, G., and van Roy, F. (2009) Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a003129–a003129.

Bettuzzi, S., Brausi, M., Rizzi, F., Castagnetti, G., Peracchia, G., and Corti, A. (2006) Chemoprevention of Human Prostate Cancer by Oral Administration of Green Tea Catechins in Volunteers with High-Grade Prostate Intraepithelial Neoplasia: A Preliminary Report from a One-Year Proof-of-Principle Study. *Cancer Res.* 66, 1234–1240.

Blakley, R.L. (1969). *The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines* (New York).

Bland, K. I. Chang, H. R. Copeland, I. (2000) Mastectomia radical modificada y mastectomia total (simple). En Bland, K. I. Copeland, III, E. M. editors. *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2a ed. Buenos Aires. Editor. Medica Paramericana SA* 895–927.

Blot, W. J., Li, J. Y., Taylor, P. R., Guo, W., Dawsey, S., Wang, G. Q., Yang, C. S., Zheng, S. F., Gail, M., and Li, G. Y. (1993) Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 1483–92.

Bouck, N., Stellmach, V., and Hsu, S. C. (1996) How tumors become angiogenic. *Adv. Cancer Res.* 69, 135–74.

Box, N. F., Vukmer, T. O., and Terzian, T. (2014) Targeting p53 in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27, 8–10.

BOYDEN S (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 115, 453–66.

Boyle, P., Smans. M. (2003) Cancer mortality atlas of European Union, 1993-1997. *Oxford Oxford Univ. Press.*

Bracke, M. E., Van Roy, F. M., and Mareel, M. M. (1996) The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 213 (Pt 1), 123–61.

- Brassard, D. L., Maxwell, E., Malkowski, M., Nagabhushan, T. L., Kumar, C. C., and Armstrong, L. (1999) Integrin $\alpha\beta 3$ -Mediated Activation of Apoptosis. *Exp. Cell Res.* 251, 33–45.
- Bravo, L. (2009) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* 56, 317–333.
- (41) Mu, L.-N., Lu, Q.-Y., Yu, S.-Z., Jiang, Q.-W., Cao, W., You, N.-C., Setiawan, V. W., Zhou, X.-F., Ding, B.-G., Wang, R.-H., Zhao, J., Cai, L., Rao, J.-Y., Heber, D., and Zhang, Z.-F. (2005) Green tea drinking and multigenetic index on the risk of stomach cancer in a Chinese population. *Int. J. Cancer* 116, 972–983.
- Breslow, R. A., Alberg, A. J., Helzlsouer, K. J., Bush, T. L., Norkus, E. P., Morris, J. S., Spate, V. E., and Comstock, G. W. (1995) Serological precursors of cancer: malignant melanoma, basal and squamous cell skin cancer, and prediagnostic levels of retinol, beta-carotene, lycopene, alpha-tocopherol, and selenium. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 4, 837–42.
- Bryan, T. M., and Cech, T. R. (1999) Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 318–324.
- Buchert, M., Burns, C. J., Ernst, M. (2016) Targeting JAK kinase in solid tumors: emerging opportunities and challenges. *Oncogene.* 35 (8) 939-951.
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M. E. J., and Crozier, A. (2002) Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3337–40.
- Busse, A., and Keilholz, U. (2011) Role of TGF- β in melanoma. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 2165–75.
- Byron, S. A., Gartside, M., Powell, M. A., Wellens, C. L., Gao, F., Mutch, D. G., Goodfellow, P. J., and Pollock, P. M. (2012) FGFR2 Point Mutations in 466 Endometrioid Endometrial Tumors: Relationship with MSI, KRAS, PIK3CA, CTNNB1 Mutations and Clinicopathological Features. *PLoS One* (Kato, M., Ed.) 7, e30801.
- 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.
- Bystryn, J. C. (1995) Clinical activity of a polyvalent melanoma antigen vaccine. *Recent Results Cancer Res.* 139, 337–48.
- Borst, P., and Elferink, R. O. (2002) Mammalian ABC Transporters in Health and Disease. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 537–592.
- Cabrera, C., Giménez, R., and López, M. C. (2003) Determination of Tea Components with Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4427–4435.

Cagnol. S., Boucher, M. J., Carrier, J. C., Rivard, N. (2012) Activation aberrante de la signalisation KRAS/BRAF/MAP Kinase dans les cancers pancréatiques et colorectaux. *Médecine Sciences Amérique*. 1 (4).

Calderon, L. A., Sobrinho, J. C., Zaqueo, K. D., de Moura, A. A., Grabner, A. N., Mazzi, M. V., Marcussi, S., Nomizo, A., Fernandes, C. F. C., Zuliani, J. P., Carvalho, B. M. A., da Silva, S. L., Stábeli, R. G., and Soares, A. M. (2014) Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–19.

Calero, F. (2003) Cáncer de mama IV. Tratamiento locorregional. Factores de pronostico. Ganglio centinela. Tratamiento Coadyudante. En: Cabero, L. editors. *Tratado de Ginecología, Obstetrica y Medicina de la reproduccion. 1a ed. Madrid. Editor. Médica Panam. SA 1716–1729.*

Calvete, J. J. (2005) Structure-function correlations of snake venom disintegrins. *Curr. Pharm. Des* 11, 829–835.

Calvete, J. J., Marcinkiewicz, C., Monleón, D., Esteve, V., Celda, B., Juárez, P., and Sanz, L. (2005) Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon* 45, 1063–1074.

Calvete, J.J., Fox, J.W., Agelan, A., Niewiarowski, S., and Marcinkiewicz, C. (2002). The presence of the WGD motif in CC8 heterodimeric disintegrin increases its inhibitory effect on alphaII(b)beta3, alpha(v)beta3, and alpha5beta1 integrins. *Biochemistry (Mosc.)* 41, 2014–2021.

Cambi, A., and Figdor, C. (2009) Necrosis: C-Type Lectins Sense Cell Death. *Curr. Biol.* 19, R375–R378.

Cannon, W.R., Garrison, B.J., and Benkovic, S.J. (1997). Electrostatic characterization of enzyme complexes: Evaluation of the mechanism of catalysis of dihydrofolate reductase. *J. Am. Chem. Soc.* 119 2386–2395.

Castellano, M., Pollock, P. M., Walters, M. K., Sparrow, L. E., Down, L. M., Gabrielli, B. G., Parsons, P. G., and Hayward, N. K. (1997) CDKN2A/p16 Is Inactivated in Most Melanoma Cell Lines. *Cancer Res.* 57.

CDC, Centers of Disease Control and Prevention. 2017.

Chacon, J. I. Alvarez, A. (2002) Tratamiento neoadyuvante. En: Lombardia, J. Rodriguez, I. Carreira, M. C. editors. *La mama paso a paso. 1a ed. Madrid. Ediciones Erg. SA 343–348.*

Chambers, A. F., and Matrisian, L. M. (1997) Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 89, 1260–1270.

Chan, F. K.-M., Shisler, J., Bixby, J. G., Felices, M., Zheng, L., Appel, M., Orenstein, J., Moss, B., and Lenardo, M. J. (2003) A Role for Tumor Necrosis Factor Receptor-2 and Receptor-

interacting Protein in Programmed Necrosis and Antiviral Responses. *J. Biol. Chem.* 278, 51613–51621.

Chantre, P., and Lairon, D. (2002) Recent findings of green tea extract AR25 (Exolise) and its activity for the treatment of obesity. *Phytomedicine* 9, 3–8.

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, Z.S., et al. (2002). Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Research.* 62, 3144–3150.

Chew, H. K. (2001) Adjuvant therapy for breast cancer: who should get what? *West. J. Med.* 174, 284–7.

Chien, A. J., Moore, E. C., Lonsdorf, A. S., Kulikauskas, R. M., Rothberg, B. G., Berger, A. J., Major, M. B., Hwang, S. T., Rimm, D. L., and Moon, R. T. (2009) Activated Wnt/ss-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1193–1198.

Christofori, G., and Semb, H. (1999) The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* 24, 73–76.

Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C.-I., Huang, Y.-W., and Lin, Y. (1998) Tannins and Human Health: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38, 421–464.

Ciocca, D. R., Gago, R. F. (2000) Factores pronosticos en el cancer de mama y lesiones relacionadas. En: Perez Lopez, F. R. editors. *Cancer de mama: biologia, diagnostico y tratamiento. 1a ed. Zaragoza. SEISGE* 155–174.

Clemetson K. J., Morita T., Kini R. M. (2009). Classification and nomenclature of snake venom C-type lectins and related proteins. *Toxicon.* 54 (1) 83.

Clemetson, K. J. (2010) Snaclecs (Snake C-Type Lectins) that Inhibit Platelet Receptors, in *Toxins and Hemostasis*, pp 359–368. Springer Netherlands, Dordrecht.

Clemetson, K. J., Lu, Q., Clemetsom, J. M. (2005). Snake C-type lectin-like proteins and platelet receptors. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, 34, 150-155.

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.

Cohen-Solal, K. A., Merrigan, K. T., Chan, J. L.-K., Goydos, J. S., Chen, W., Foran, D. J., Liu, F., Lasfar, A., and Reiss, M. (2011) Constitutive Smad linker phosphorylation in melanoma: a

mechanism of resistance to transforming growth factor- β -mediated growth inhibition. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 512–24.

Collisson, E. A., Carranza, D. C., Chen, I. Y., and Kolodney, M. S. (2002) Isoprenylation is Necessary for the Full Invasive Potential of RhoA Overexpression in Human Melanoma Cells. *J. Invest. Dermatol.* 119, 1172–1176.

Comeau, S.R., Gatchell, D.W., Vajda, S., Camacho, C.J. (2004) ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes., *Bioinformatics.*20, 45–50.

Conney, A. H., Lu, Y., Lou, Y., Xie, J., and Huang, M. (1999) Inhibitory effect of green and black tea on tumor growth. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 220, 229–33.

Coradini, D. Daidone, M. G. (2004) Biomolecular pronostic factors in breast cancer. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 16, 49–55.

Cortot, A., Armand, J. P., Soria, J. C. (2006) PI3K-AKT-mTOR pathway inhibitors. *Bull Cancer.* 93 (1): 19-26.

Coussens, L. M., and Werb, Z. (1996) Matrix metal loproteinases and the development of cancer. *Chem. Biol.* 3, 895–904.

Cristobal, I. Q. P. (1998) Diagnostico de Certeza. En: Diaz-Rubio, E. Escudero, M. editors. *Cáncer de mama. 1a ed. Madrid Int. Mark. Commun. SA* 95–130.

Cutolo, M., Sulli, A., Pizzorni, C., Serio, B., and Straub, R. H. (2001) Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 60, 729–35.

Cyr, A. W., Moulton, M. (2000) Terapia de reposicion hormonal y riesgo de cancer de mama. En: Bland, K. I. Copeland III E. M. editors. *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2a ed. Buenos Aires. Editor. Medica Paramericana SA* 1495–1508.

Da Costa, M., Rothenberg, S. P., and Kamen, B. (1972). DNA synthesis in chronic myelogenous leukemia cells: Comparison of results in cells containing folate binding factor to replicating cells without binder. *Blood*, 39, 621-627.

Dahiya, R. Deng, G. (1998) Molecular prognostic markers in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 52, 185–200.

Dai, D. L., Martinka, M., and Li, G. (2005) Prognostic Significance of Activated Akt Expression in Melanoma: A Clinicopathologic Study of 292 Cases. *J. Clin. Oncol.* 23, 1473–1482.

Daidone MG, Veneroni S, Benini E, Tomasic G, Coradini D, Mastore M, Brambilla C, F. L. and S. R. (1999) Biological markers as indicators of response to primary and adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 84, 580–586.

Damak, T., Ben Hassouna, J., Hadiji, A., Ariane, A., Chargui, R., Ben Dhieb, T., Gamoudi, A., Hechiche, M., Raha, I K. (2014) Mélanome cutané: à propos de 200 cas (Cutaneous melanoma : about 200 cases). *LA TUNISIE MEDICALE.* Vol 92 (n°08/09).

Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B. A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J. W. C., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Weber, B. L., Seigler, H. F., Darrow, T. L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C. J., Wooster, R., Stratton, M. R., and Futreal, P. A. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949–954.

de Carvalho D.D., Schmitmeier S., J.C. Novello J.C., M. F. S. (2001) Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu* on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. *Toxicon* 39, 1471–1476.

De la Cruz, M. A. Adell, A. Tripero, J. (2002) Tratamiento coadyudante. En: Lombardia, J. Rodriguez, I. Carreira M. C. editors. La mama paso a paso. 1a ed. Madrid. Ediciones Erg. SA 349–357.

de Roux, A., and Lode, H. (2003). Recent developments in antibiotic treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 17, 739-751.

De Silva, M., Senarath, U., Gunatilake, M., and Lokuhetty, D. (2010) Prolonged breastfeeding reduces risk of breast cancer in Sri Lankan women: A case–control study. *Cancer Epidemiol.* 34, 267–273.

Delavallée, L., Cabon, L., Galán-Malo, P., Lorenzo, H. K., and Susin, S. A. (2011) AIF-mediated caspase-independent necroptosis: A new chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life* 63, 221–232.

Demierre, M.-F., Higgins, P. D. R., Gruber, S. B., Hawk, E., and Lippman, S. M. (2005) Statins and cancer prevention. *Nat. Rev. Cancer* 5, 930–942.

Denkert, C., Köbel, M., Berger, S., Siegert, A., Leclere, A., Trefzer, U., and Hauptmann, S. (2001) Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 61, 303–8.

Dennis, L. K., Beane Freeman, L. E., and VanBeek, M. J. (2003) Sunscreen use and the risk for melanoma: a quantitative review. *Ann. Intern. Med.* 139, 966–78.

Desai, B. M., Villanueva, J., Nguyen, T.-T. K., Lioni, M., Xiao, M., Kong, J., Krepler, C., Vultur, A., Flaherty, K. T., Nathanson, K. L., Smalley, K. S. M., and Herlyn, M. (2013) The anti-melanoma activity of dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on p53 signaling. *PLoS One* 8, e59588.

Desgrosellier, J. S., and Cheresch, D. A. (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer.* 10, 9–22.

Dickson, R. B. Lippman, M. E. (1995) Growth factors in breast cancer. *Endocr. Rev.* 6, 559–589.

- Dickson, R. B. Lippman, M. E. (2000) Regulacion del crecimiento normal y maligno. En: Bland, KI. Copeland III EM editors. La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2a ed. Buens Aires. Editor. Médica Panam. SSA 529–575.
- Diepgen, T. L., and Mahler, V. (2002) The epidemiology of skin cancer. *Br. J. Dermatol.* 1–6.
- Doley, R., and Kini, R. M. (2009) Protein complexes in snake venom. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 2851–2871.
- Domin, B.A., Cheng, Y.C., Hakala, M.T. (1982). Properties of dihydrofolate reductase from a methotrexate-resistant subline of human KB cells and comparison with enzyme from KB parent cells and mouse S180 AT/3000 cells. *Molecular Pharmacology.* 21, 231–238.
- Domingues, M. J., Larue, L., and Bonaventure, J. (2013) Migration des cellules du lignage mélanocytaire. *Médecine /sciences* 29, 287–292.
- Dreyer, C., Raymond, E., Faivre, S. (2009) PI3K / AKT / mTOR signalling pathway. *Cancéro dig.* 1 (3) 187-189.
- Drickamer, K. (1999) C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 585–90.
- Du, X. Y., Navdaev, A., Clemetson, J. M., Magnenat, E., Wells, T. N., and Clemetson, K. J. (2001) Bilinexin, a snake C-type lectin from *Agkistrodon bilineatus* venom agglutinates platelets via GPIb and alpha2beta1. *Thromb. Haemost.* 86, 1277–83.
- Dulloo, A. G., Seydoux, J., Girardier, L., Chantre, P., and Vandermander, J. (2000) Green tea and thermogenesis: interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24, 252–8.
- Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K., Harlow, E. (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Scopus Rev.* 243, 934–937.
- Eble, J. A., Niland, S., Dennes, A., Schmidt-Hederich, A., Bruckner, P., and Brunner, G. (2002) Rhodocetin antagonizes stromal tumor invasion in vitro and other alpha2beta1 integrin-mediated cell functions. *Matrix Biol.* 21, 547–58.
- Eccles, S. A. (2001) The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 6, 393–406.
- Efferth, T. (2012) Signal transduction pathways of the epidermal growth factor receptor in colorectal cancer and their inhibition by small molecules. *Curr Med Chem.* 19 (33) 5735-5744.
- Eggermont, A. M., Spatz, A., and Robert, C. (2014) *Cutaneous melanoma.* *Lancet.* 383, 816–827.
- Elledge, R. M. Allred, D. C. (1998) Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 52, 79–98.
- Ellerhorst, J. A., Prieto, V. G., Ekmekcioglu, S., Broemeling, L., Yekell, S., Chada, S., and Grimm, E. A. (2002) Loss of MDA-7 Expression With Progression of Melanoma. *J. Clin. Oncol.* 20, 1069–1074.

- Ellis, J., Dodds, P., and Pryor, T. (2000) Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 278–84. (21)
- Elnakat, H., Ratnam, M. (2004). Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Advanced drug delivery reviews, Elsevier.*
- Eskandarpour, M., Hashemi, J., Kanter, L., Ringborg, U., Platz, A., and Hansson, J. (2003) Frequency of UV-inducible NRAS mutations in melanomas of patients with germline CDKN2A mutations. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 790–8.
- Espinha, G., Osaki, J. H., Costa, E. T., and Forti, F. L. (2016) Inhibition of the RhoA GTPase Activity Increases Sensitivity of Melanoma Cells to UV Radiation Effects. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 2696952.
- Esteva, F. J. Hortobagyi, G. N. (2004) Pronostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res.* 6, 109–118.
- Falcon, O., Falcon, O. (2002) Cáncer de mama. Generalidades. En: Lombardia J, Rodriguez I, Carreira MC, editors. La mama paso a paso. 1a ed. Madrid. Ediciones Erg. SA 253–258.
- Fallahi-Sichani, M., Moerke, N. J., Niepel, M., Zhang, T., Gray, N. S., and Sorger, P. K. (2015) Systematic analysis of BRAF(V600E) melanomas reveals a role for JNK/c-Jun pathway in adaptive resistance to drug-induced apoptosis. *Mol. Syst. Biol.* 11, 797.
- Fang, M.Z., Wang, Y., Ai, N., Hou, Z., Sun, Y., Lu, H., Welsh, W., and Yang, C.S. (2003) Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced gene in cancer cell lines. *Cancer Res.* 63,7563–7570.
- Farber, S., et al., 1948. Temporary remissions in acute leukemia produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroylglutamic acid (aminopterin). *New England Journal of Medicine* 238, 787–793.
- Fedi, S., Tola, E., Moënne-Loccoz, Y., Dowling, D. N., Smith, L. M., and O’Gara, F. (1997) Evidence for signaling between the phytopathogenic fungus *Pythium ultimum* and *Pseudomonas fluorescens* F113: *P. ultimum* represses the expression of genes in *P. fluorescens* F113, resulting in altered ecological fitness. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4261–6.
- 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., Bray, F., Pisani, P., et al. (2001) Globocan 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. version 1.0. IARC CancerBase No 5 Lyon, IARC Press.
- Fernandez, M. I. Lombardia, J. (2002) Influencia de la anticoncepcion hormonal en la mama. En: Lombardia, J. Rodriguez, I. Carreira, M. C. editors. La mama paso a paso. 1a ed. Madrid. Ediciones Erg. SA 213–219.
- Fidler, D. P. (1999) Facing the global challenges posed by biological weapons. *Microbes Infect.* 1, 1059–66.

- Fidler, I. J. (1970) Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl. Cancer Inst.* 45, 773–82.
- Fidler, I. J., and Talmadge, J. E. (1986) Evidence that intravenously derived murine pulmonary melanoma metastases can originate from the expansion of a single tumor cell. *Cancer Res.* 46, 5167–71.
- 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.
- Fischer, S.M., Lo, H.H., Gordon, G.B., Seibert, K., Kelloff, G., Lubet, R.A. et al. (1999) Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, and indomethacin against ultraviolet light-induced skin carcinogenesis. *Carcinog, Mol* 254, 231–240.
- Fishman, P., Bar-Yehuda, S., Barer, F., Madi, L., Multani, A. S., and Pathak, S. (2001) The A3 Adenosine Receptor as a New Target for Cancer Therapy and Chemoprotection. *Exp. Cell Res.* 269, 230–236.
- Flaherty, L. E., Othus, M., Atkins, M. B., Tuthill, R. J., Thompson, J. A., Vetto, J. T., Haluska, F. G., Pappo, A. S., Sosman, J. A., Redman, B. G., Moon, J., Ribas, A., Kirkwood, J. M., and Sondak, V. K. (2014) Southwest Oncology Group S0008: A Phase III Trial of High-Dose Interferon Alfa-2b Versus Cisplatin, Vinblastine, and Dacarbazine, Plus Interleukin-2 and Interferon in Patients With High-Risk Melanoma—An Intergroup Study of Cancer and Leukemia Group B, Chi. *J. Clin. Oncol.* 32, 3771–3778.
- Folkman, S. (1997) Positive psychological states and coping with severe stress. *Soc. Sci. Med.* 45, 1207–21.
- Fountain, J. W., Karayiorgou, M., Ernstoff, M. S. Kirkwood., J. M., Vlock, D. R., Titus-Ernstoff, L., Bouchard, B., Vijayasaradhi, S., Houghton, A. N., Lahti, J. Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10557–10561.
- Fowble, B. Roser, C. Hanlon, A. (2000) Cirugia conservadora y radioterapia para el cancer de mama estadio I y II. En: Bland, K. I. Copeland III EM editors. La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2a ed. Buenos Aires. Editor. Médica Paramericana SA 1190–1197.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 362–374.
- Friedman, R. J., Rigel, D. S., and Kopf, A. W. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA. Cancer J. Clin.* 35, 130–51.
- Fujioka, S., Schmidt, C., Sclabas, G. M., Li, Z., Pelicano, H., Peng, B., Yao, A., Niu, J., Zhang, W., Evans, D. B., Abbruzzese, J. L., Huang, P., and Chiao, P. J. (2004) Stabilization of p53 Is a Novel Mechanism for Proapoptotic Function of NF- B. *J. Biol. Chem.* 279, 27549–27559.
- FURUYASHIKI, T., NAGAYASU, H., AOKI, Y., BESSHO, H., HASHIMOTO, T., KANAZAWA, K., and ASHIDA, H. (2004) Tea Catechin Suppresses Adipocyte Differentiation Accompanied

by Down-regulation of PPAR γ 2 and C/EBP α in 3T3-L1 Cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 2353–2359.

Fynan, T. M., and Reiss, M. (1993) Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis. *Crit. Rev. Oncog.* 4, 493–540.

Gaggioli, C., and Sahai, E. (2007) Melanoma invasion? current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res.* 20, 161–172.

Galimberti, V., Farante, G., Gennari, R., Monti, S., Capurso, M. (2000) Biopsia del ganglio centinela. En: Pérez Lopez FR, editors. *Cáncer de mama: biología, diagnóstico y tratamiento. 1a ed. Zaragoza. SEISGE* 187–194.

Gallagher, S. J., Rambow, F., Kumasaka, M., Champeval, D., Bellacosa, A., Delmas, V., and Larue, L. (2013) Beta-catenin inhibits melanocyte migration but induces melanoma metastasis. *Oncogene* 32, 2230–8.

Ganapathy, V., Smith, S.B., and Prasad, P.D. (2004). SLC19: the folate/thiamine transporter family. *Pflugers Arch.* 447, 641-646.

Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M. S., Pasquini, P., Picconi, O., Boyle, P., and Melchi, C. F. (2005) Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur. J. Cancer* 41, 45–60.

Ganguly, K. K., Pal, S., Moulik, S., and Chatterjee, A. (2013) Integrins and metastasis. *Cell Adh. Migr.* 7, 251–261.

Garbe, C., Blue, A. (2001) Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Ski. Pharmacol Appl Ski. Physiol.* 14, 280–90.

García Ramírez, B. (28 de 01 de 2005). Tesis Doctorales en Red. Recuperado el 25 de 01 de 2015, de www.tdx.cat.com: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8652/TESIS.pdf?sequence=1>

Garraway, L. A., Widlund, H. R., Rubin, M. A., Getz, G., Berger, A. J., Ramaswamy, S., Beroukhim, R., Milner, D. A., Granter, S. R., Du, J., Lee, C., Wagner, S. N., Li, C., Golub, T. R., Rimm, D. L., Meyerson, M. L., Fisher, D. E., and Sellers, W. R. (2005) Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 436, 117–122.

Garrido, F. Lopez, M. A. (2000) Inmunología e inmunoterapia para ginecólogos oncólogos. 1a ed. Madrid. *SEGO* 59–132.

Gasmi, A., Srairi, N., Guermazi, S., Dekhil, H., Dkhil, H., Karoui, H., and El Ayeb, M. (2001) Amino acid structure and characterization of a heterodimeric disintegrin from *Vipera lebetina* venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1547, 51–6.

Gasparino, G. (2005) Cdk1 and Cdk2 complexes (cyclin dependent kinases) in apoptosis: a role beyond the cell cycle. *Cancer Lett.* 217, 129–138.

- Gezgin, S., Özcan, M. M., and Atalay, E. (2006) Determination of Minerals Extracted from Several Commercial Teas (*Camellia sinensis*) to Hot Water (Infusion). *J. Med. Food* 9, 123–127.
- Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Y. M. (1999) The Pathogenesis of Melanoma Induced by Ultraviolet Radiation. *N. Engl. J. Med.* 340, 1341–1348.
- Godwin, P., Baird, A. M., Heavey, S., Barr, M. P., O'Byrne, K. J., and Gately, K. (2013) Targeting nuclear factor-kappa B to overcome resistance to chemotherapy. *Front. Oncol.* 3, 120.
- 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.
- Gonzalez, J. (2000) Bases del tratamiento hormonal. En: Herruzo AJ, Menjon S, Rodriguez-Escudero FJ, editors. *Avances y controversias en Ginecología Oncológica. 1a ed. Granada. Proy. Sur Ediciones SL* 215–241.
- Graham, H. N. (1992) Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev. Med. (Baltim).* 21, 334–50.
- Grases, P. J. (2003) *Patología Ginecología: bases para el diagnóstico morfológico. 1a ed. Barcelona MASSON SA.*
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., and Marais, R. (2007) Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445, 851–857.
- Gregory, R. P., and Bendall, D. S. (1966) The purification and some properties of the polyphenol oxidase from tea (*Camellia sinensis* L.). *Biochem. J.* 101, 569–81.
- Guinee, V. F. (2000) Epidemiología del cáncer de mama: En la mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. *2a. Buenos Aires. Editor. Medica Panam. SA* 345–357.
- Guldberg, P., Zschocke, J., Dagbjartsson, A., Henriksen, K. F., and Güttler, F. (1997) A molecular survey of phenylketonuria in Iceland: identification of a founding mutation and evidence of predominant Norse settlement. *Eur. J. Hum. Genet.* 5, 376–81.
- Gupta, S., Hastak, K., Ahmad, N., Lewin, J. S., and Mukhtar, H. (2001) Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10350–5.
- Haas, D. W., Ribaldo, H. J., Kim, R. B., Tierney, C., Wilkinson, G. R., Gulick, R. M., Clifford, D. B., Hulgán, T., Marzolini, C., and Acosta, E. P. (2004) Pharmacogenetics of efavirenz and central nervous system side effects: an Adult AIDS Clinical Trials Group study. *AIDS* 18, 2391–400.
- Hagan, M. P. Mendenhall, N. P. (2000) Radioterapia adyuvante después de la mastectomía. En: Bland, Kl., Copeland, III EM editors. *La mama. Manejo multidisciplinario de las*

enfermedades benignas y malignas. 2a ed. Buenos Aires. Editor. Médica Panam. SA 1777–1189.

Hakim, I. A., and Harris, R. B. (2001) Joint effects of citrus peel use and black tea intake on the risk of squamous cell carcinoma of the skin. *BMC Dermatol.* 1, 3.

Hammouda, M., Montenegro, M., Sánchez-del-Campo, L., Zakraoui, O., Aloui, Z., Riahi-Chebbi, I., Karoui, H., Rodríguez-López, J., and Essafi-Benkhadir, K. (2016) Lebein, a Snake Venom Disintegrin, Induces Apoptosis in Human Melanoma Cells. *Toxins (Basel).* 8, 206.

Han, Y. (2007) Synergic anticandidal effect of epigallocatechin-O-gallate combined with amphotericin B in a murine model of disseminated candidiasis and its anticandidal mechanism. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1693–6.

Hanahan, D., and Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353–64.

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.

Hannewald, P., Maunit, B., and Muller, J.F. (2008) Screening of DHFR-binding drugs by MALDI-TOFMS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 392 (7-8) 1335- 1344.

Haqqi, T. M., Anthony, D. D., Gupta, S., Ahmad, N., Lee, M. S., Kumar, G. K., and Mukhtar, H. (1999) Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4524–9.

Haque, A. M., Hashimoto, M., Katakura, M., Tanabe, Y., Hara, Y., and Shido, O. (2006) Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *J. Nutr.* 136, 1043–7.

HARMAN, D. (1994) Free-Radical Theory of Aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 717, 1–15.

Harris, C. C. (1996) Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1442–55.

Harris, N., Bachler, M., Costa, V., Mollapour, M., Moradas-Ferreira, P., and Piper, P. W. (2005) Overexpressed Sod1p acts either to reduce or to increase the lifespans and stress resistance of yeast, depending on whether it is Cu(2+)-deficient or an active Cu,Zn-superoxide dismutase. *Aging Cell* 4, 41–52.

Hartman, M. L., Czyz, M. (2015) Pro-Survival Role of MITF in Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 135, 352–358.

Hase T, Komine Y, Meguro S, Takeda Y, Takahasci H, Matsui Y, Inaoka S, Katsuragi Y, Tokimitsu I, Shimasaki H, Itakura H. (2001). Anti-obesity effects of tea catechins in humans. *J Oleo Sci.* 50, 599-605.

Hayflick, L. (1997) Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry. (Mosc).* 62, 1180–90.

Hayward, N. K. (2003) Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene* 22, 3053–3062.

- Helmbach, H., Kern, M. A., Rossmann, E., Renz, K., Kissel, C., Gschwendt, B., and Schadendorf, D. (2002) Drug Resistance Towards Etoposide and Cisplatin in Human Melanoma Cells is Associated with Drug-Dependent Apoptosis Deficiency. *J. Invest. Dermatol.* 118, 923–932.
- Hemachandran, M., Nijhawan, R. J. K. (2002) Cytological grading, apoptosis, and bcl-2 protein expression in breast cancer. *Diagn. Cytopathol.* 26, 356–359.
- Hemann, M. T., and Lowe, S. W. (2006) The p53–Bcl-2 connection. *Cell Death Differ.* 13, 1256–1259.
- Herlyn, M., and Satyamoorthy, K. (1996) Activated ras. Yet another player in melanoma? *Am. J. Pathol.* 149, 739–44.(134) Shields, J. M., Pruitt, K., McFall, A., Shaub, A., and Der, C. J. (2000) Understanding Ras: “it ain’t over ‘til it’s over”. *Trends Cell Biol.* 10, 147–54.
- Herr, I., Debatin, K. M. (2001) Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood.* 98 (9) 2603-2614.
- Hersey, P., and Zhang, X. D. (2001) How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat. Rev. Cancer.* 1, 142–150.
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B., and Kromhout, D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet (London, England)* 342, 1007–11.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., and Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology. (N. Y).* 10, 413–7.
- Hirasawa, M., Takada, K., and Otake, S. (2006) Inhibition of Acid Production in Dental Plaque Bacteria by Green Tea Catechins. *Caries Res.* 40, 265–270.
- Hirose, M., Hasegawa, R., Kimura, J., Akagi, K., Yoshida, Y., Tanaka, H., Miki, T., Satoh, T., Wakabayashi, K., and Ito, N. (1995) Inhibitory effects of 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ), green tea catechins and other antioxidants on 2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-1)-induced rat hepatocarcinogenesis and dose-dependent inhibition by HTHQ of lesion induction by Glu-P-1 or 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx). *Carcinogenesis* 16, 3049–55.
- Hiura, A., Tsutsumi, M., and Satake, K. (1997) Inhibitory effect of green tea extract on the process of pancreatic carcinogenesis induced by N-nitrosobis-(2-oxypropyl)amine (BOP) and on tumor promotion after transplantation of N-nitrosobis-(2-hydroxypropyl)amine (BHP)-induced pancreatic cancer in Syrian hamsters. *Pancreas* 15, 272–7.
- Hocker, T. L., Singh, M. K., Tsao, H. (2008) Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. *J Invest Dermatol.* 128, 2575-2595.

- Hodgson, J.M., Devine, A., Puddey, I.B., Beilby, J., Prince, R.L., (2006). Drinking tea is associated with lower plasma total homocysteine in older women. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 15, 253–258.
- Holbro, T., Civenni, G., Hynes, N. E. (2003) The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp. Cell Res.* 284, 99–110.
- Holland, E. F., Studd, J. W., Mansell, J. P., Leather, A. T., and Bailey, A. J. (1994) Changes in collagen composition and cross-links in bone and skin of osteoporotic postmenopausal women treated with percutaneous estradiol implants. *Obstet. Gynecol.* 83, 180–3.
- 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.
- Hou, Z., Lambert, J. D., Chin, K.-V., and Yang, C. S. (2004) Effects of tea polyphenols on signal transduction pathways related to cancer chemoprevention. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 555, 3–19.
- 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.
- Hsan, K. M., Chen, C.-C., and Shyur, L.-F. (2010) Current research and development of chemotherapeutic agents for melanoma. *Cancers (Basel).* 2, 397–419.
- Hsu, S. D., Dickinson, D. P., Qin, H., Borke, J., Ogbureke, K. U. E., Winger, J. N., Camba, A. M., Bollag, W. B., Stöppler, H. J., Sharawy, M. M., and Schuster, G. S. (2007) Green tea polyphenols reduce autoimmune symptoms in a murine model for human Sjogren's syndrome and protect human salivary acinar cells from TNF- α -induced cytotoxicity. *Autoimmunity* 40, 138–147.
- Hsu, S., and Dickinson, D. (2006) A new approach to managing oral manifestations of Sjogren's syndrome and skin manifestations of lupus. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39, 229–39.
- Hulka, B. S., Liv, E. T., Lininger, R. A. (1994) Steroid hormones and risk of breast cancer. *Cancer* 74, 111–124.
- Hulpiau, P., and van Roy, F. (2009) Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 349–369.
- Huveneers, S., and Danen, E. H. J. (2009) Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J. Cell Sci.* 122, 1059–69.
- Hwang, S.-A., Wilk, K. M., Budnicka, M., Olsen, M., Bangale, Y. A., Hunter, R. L., Kruzel, M. L., and Actor, J. K. (2007) Lactoferrin enhanced efficacy of the BCG vaccine to generate host protective responses against challenge with virulent Mycobacterium tuberculosis. *Vaccine* 25, 6730–43.
- Ifigeneia, M., Dimitrios G, K., and Evangelos, M. (2015) Snake Venom Disintegrins: Natural Products with Antitumor Effect. *J. Sci. Res. Rep.* 146–153.

- Iglesias, J. Veiras, C. (2000) Alteraciones bioquímicas de las neoplasias. *1a ed. A coruña Diput. A Coruña* 11–18.
- Ikeda, K., Pant, B., Mishiro, A., Ozawa, K., Masujima, T., Sugiyama, M. (2000) A convenient method for the evaluation of anti-tumor agents affecting the cell cycle. *J. Biosci. Bioeng.* *90*, 574–576.
- Inamdar, G. S., Madhunapantula, S. V, and Robertson, G. P. (2010) Targeting the MAPK pathway in melanoma: why some approaches succeed and other fail. *Biochem. Pharmacol.* *80*, 624–37.
- Ivanov, V. N., and Ronai, Z. (2000) p38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF- κ B activity and Fas expression. *Oncogene.* *19*, 3003–3012.
- Jackman, A.L., Theti, D.S., Gibbs, D.D., (2004). Antifolates targeted specifically to the folate receptor. *Advance Drug Delivery Reviews.* *56*, 1111–1125.
- Jackson, R. C., and Harrap, K. R. (1973) Studies with a mathematical model of folate metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* *158*, 827–41.
- 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*, 1991–7.
- Jackson, R. C., Niethammer, D., and Hart, L. I. (1977) Reactivation of dihydrofolate reductase inhibited by methotrexate or aminopterin. *Arch. Biochem. Biophys.* *182*, 646–656.
- Jackson, R.C., et al., 1984. Biochemical pharmacology of the lipophilic antifolate, trimetrexate. *Advances in Enzyme Regulation.* *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.
- Jager, J. J. Jansen, R. L. H. Arends, J. W. (2002) Clinical relevance of apoptotic markers in breast cancer not yet clear. *Apoptosis* *7*, 361–365.
- Jakubowski, P., Calvete, J. J., Eble, J. A., Lazarovici, P., and Marcinkiewicz, C. (2013) Identification of inhibitors of $\alpha 2\beta 1$ integrin, members of C-lectin type proteins, in *Echis sochureki* venom. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *269*, 34–42.
- Jani, J. P., Specht, S., Stemmler, N., Blanock, K., Singh, S. V, Gupta, V., and Katoh, A. (1993) Metastasis of B16F10 mouse melanoma inhibited by lovastatin, an inhibitor of cholesterol biosynthesis. *Invasion Metastasis* *13*, 314–24.
- Jebali, J., Fakhfekh, E., Morgen, M., Srairi-Abid, N., Majdoub, H., Gargouri, A., El Ayeb, M., Luis, J., Marrakchi, N., and Sarray, S. (2014) Lebecin, a new C-type lectin like protein from *Macrovipera lebetina* venom with anti-tumor activity against the breast cancer cell line MDA-MB231. *Toxicol* *86*, 16–27.

- Jefferey, R., Gerald, L. James, S., Edwin, C., Mark, A. N. L. et al. (2003) Breast cancer biomarkers and molecular medicine. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 3, 573–585.
- Ji, B. T., Chow, W. H., Hsing, A. W., McLaughlin, J. K., Dai, Q., Gao, Y. T., Blot, W. J., and Fraumeni, J. F. (1997) Green tea consumption and the risk of pancreatic and colorectal cancers. *Int. J. cancer* 70, 255–8.
- Jiang, C. C., Yang, F., Thorne, R. F., Zhu, B. K., Hersey, P., and Zhang, X. D. (2009) Human melanoma cells under endoplasmic reticulum stress acquire resistance to microtubule-targeting drugs through XBP-1-mediated activation of Akt. *Neoplasia* 11, 436–47.
- Jiang, L., Campagne, C., Sundström, E., Sousa, P., Imran, S., Seltenhammer, M., Pielberg, G., Olsson, M. J., Egidy, G., Andersson, L., and Golovko, A. (2014) Constitutive activation of the ERK pathway in melanoma and skin melanocytes in Grey horses. *BMC Cancer.* 14, 857.
- Jones, P. A., and Laird, P. W. (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.* 21, 163–167.
- Ju, J., Hong, J., Zhou, J., Pan, Z., Bose, M., Liao, J., Yang, G., Liu, Y. Y., Hou, Z., Lin, Y., Ma, J., Shih, W. J., Carothers, A. M., and Yang, C. S. (2005) Inhibition of Intestinal Tumorigenesis in Apcmin/+ Mice by (-)-Epigallocatechin-3-Gallate, the Major Catechin in Green Tea. *Cancer Res.* 65, 10623–10631.
- Juhel, C., Armand, M., Pafumi, Y., Rosier, C., Vandermander, J., and Lairon, D. (2000) Green tea extract (AR25) inhibits lipolysis of triglycerides in gastric and duodenal medium in vitro. *J. Nutr. Biochem.* 11, 45–51.
- Jung, B., Staudacher, J. J., Beauchamp, D. (2016). Transforming Growth Factor Beta Super Family Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, pii: S0016-5085 (16) 35239-352398.
- Kallech-Ziri, O., Luis, J., Ayeb, M.E., and Marrakchi, N. (2007) Potential, Snake venom disintegrins: classification and therapeutic. *ResearchGate* 84, 29–37.
- Kamb, A., Gruis, N. A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavtigian, S. V, Stockert, E., Day, R. S., Johnson, B. E., and Skolnick, M. H. (1994) A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264, 436–40.
- Kao, Y.-H., Chang, H.-H., Lee, M.-J., and Chen, C.-L. (2006) Tea, obesity, and diabetes. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 188–210.
- Kao, Y.-H., Hiipakka, R. A., and Liao, S. (2000) Modulation of Endocrine Systems and Food Intake by Green Tea Epigallocatechin Gallate ¹. *Endocrinology* 141, 980–987.
- Katiyar, S. K., Mohan, R. R., Agarwal, R., and Mukhtar, H. (1997) Protection against induction of mouse skin papillomas with low and high risk of conversion to malignancy by green tea polyphenols. *Carcinogenesis* 18, 497–502.
- Kavanagh, K. T., Hafer, L. J., Kim, D. W., Mann, K. K., Sherr, D. H., Rogers, A. E., and Sonenshein, G. E. (2001) Green tea extracts decrease carcinogen-induced mammary tumor burden in rats and rate of breast cancer cell proliferation in culture. *J. Cell. Biochem.* 82, 387–98.

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, 951–7.

Kelemen, L.E., (2006). The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? *International Journal of Cancer.* 119, 243–250.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–57.

Kessentini-Zouari, R., Jebali, J., Taboubi, S., Srairi-Abid, N., Morjen, M., Kallech-Ziri, O., Bezzine, S., Marvaldi, J., Ayeb, M. E. I, Marrakchi, N., and Luis, J. (2010) CC-PLA2-1 and CC-PLA2-2, two *Cerastes cerastes* venom-derived phospholipases A2, inhibit angiogenesis both in vitro and in vivo. *Lab. Investig.* 90, 510–519.

Khanna, P., Yunkunis, T., Muddana, H. S., Peng, H. H., August, A., and Dong, C. (2010) p38 MAP kinase is necessary for melanoma-mediated regulation of VE-cadherin disassembly. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298, C1140-50.

Khokhar, S., and Magnusdottir, S. G. M. (2002) Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *J. Agric. Food Chem.* 50, 565–70.

Khosravi, H., Akabane, A. L., Alloo, A., Nazarian, R. M., Boland, G. M. (2016) Metastatic melanoma with spontaneous complete regression of a thick primary lesion. *Case Rep.*

Kim M., Masuda M. (1997). Cancer chemoprevention by green tea polyphenols. in: Chemistry and Applications of Green Tea (eds. T. Yamamoto, L.R. Juneja, D.C. Chu, M. Kim). *CRC, New York.* 61–73.

Kim, S. I., Kim, K. S., Kim, H. S., Choi, M. M., Kim, D. S., Chung, K. H., and Park, Y. S. (2003) Inhibition of Angiogenesis by Salmosin Expressed In Vitro. *Oncol. Res.* 14, 227–233.

Kim, S. P., Nam, S. H., Friedman, M. (2015) The Tomato Glycoalkaloid α -Tomatine Induces Caspase-Independent Cell Death in Mouse Colon Cancer CT-26 Cells and Transplanted Tumors in Mice. *J Agric Food Chem.*

Kim, S., Merrill, B. M., Rajpurohit, R., Kumar, A., Stone, K. L., Papov, V. V, Schneiders, J. M., Szer, W., Wilson, S. H., Paik, W. K., and Williams, K. R. (1997) Identification of N(G)-methylarginine residues in human heterogeneous RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif. *Biochemistry* 36, 5185–92.

Kim, S.-H., Yeo, G.-S., Lim, Y.-S., Kang, C.-D., Kim, C.-M., and Chung, B.-S. (1998) Suppression of multidrug resistance via inhibition of heat shock factor by quercetin in MDR cells. *Exp. Mol. Med.* 30, 87–92.

Kim, W., Jeong, M. H., Cho, S. H., Yun, J. H., Chae, H. J., Ahn, Y. K., Lee, M. C., Cheng, X., Kondo, T., Murohara, T., and Kang, J. C. (2006) Effect of green tea consumption on endothelial function and circulating endothelial progenitor cells in chronic smokers. *Circ. J.* 70, 1052–7.

- Kim, Y. I. (2003) Role of folate in colon cancer development and progression. *J. Nutr.* 133, 3731S–3739S.
- Kioka, N., Yamano, Y., Komano, T., and Ueda, K. (1992) Heat-shock responsive elements in the induction of the multidrug resistance gene (MDR1). *FEBS Lett.* 301, 37–40.
- KITANI, K., YOKOZAWA, T., and OSAWA, T. (2004) Interventions in Aging and Age-Associated Pathologies by Means of Nutritional Approaches. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019, 424–426.
- Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., Smyth, M. J., Schreiber, R. D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature.* 450 (7171) 903-907.
- Koehler, B. C., Jäger, D., Schulze-Bergkamen, H. (2014) Targeting cell death signaling in colorectal cancer: current strategies and future perspectives. *World J Gastroenterol.* 20(8) 1923-1934.
- Koh, D.C.I., Armugam, A., and Jeyaseelan, K. (2006) Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* 63, 3030–3041.
- Koh, S.H., Lee, S.M., Kim, H.Y., Lee, K.Y., Lee, Y.J., Kim, H.T., Kim, J., Kim, M.H., Hwang, M.S., Song, C., Yang, K.W., Lee, K.W., Kim, S.H., Kim, O.H. (2006). The effect of epigallocatechin gallate on suppressing disease progression of ALS model mice. *Neuroscience Letters.* 395, 103–107.
- Kovacs, D., Migliano, E., Muscardin, L., Silipo, V., Catricalà, C., Picardo, M., and Bellei, B. (2016) The role of Wnt/ β -catenin signaling pathway in melanoma epithelial-to-mesenchymal-like switching: evidences from patients-derived cell lines. *Oncotarget* 7, 43295–43314.
- Kovacs, E. M. R., Lejeune, M. P. G. M., Nijs, I., and Westerterp-Plantenga, M. S. (2004) Effects of green tea on weight maintenance after body-weight loss. *Br. J. Nutr.* 91, 431.
- Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., Vajda, S. (2017) The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat. Protoc.* 12, 255–278.
- Kreizenbeck, G. M., Berger, A. J., Subtil, A., Rimm, D. L., and Gould Rothberg, B. E. (2008) Prognostic Significance of Cadherin-Based Adhesion Molecules in Cutaneous Malignant Melanoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17, 949–958.
- Kruger, S. Stahlhut, M. Muller, H. (2000) Cell cycle-dependent AgNOR analysis in invasive breast cancer. *Anal Quant Cytol Histol* 22, 358–363.
- Kubík, A. K., Zatloukal, P., Tomásek, L., Pauk, N., Havel, L., Krepela, E., and Petruzelka, L. (2004) Dietary habits and lung cancer risk among non-smoking women. *Eur. J. Cancer Prev.* 13, 471–80.
- Kuriyama, S., Hozawa, A., Ohmori, K., Shimazu, T., Matsui, T., Ebihara, S., Awata, S., Nagatomi, R., Arai, H., and Tsuji, I. (2006) Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project 1. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 355–61.

- Kusuma, N., Denoyer, D., Eble, J.A., Redvers, R.P., Parker, B.S., Pelzer, R., Anderson, R.L., and Pouliot, N. (2012). Integrin-dependent response to laminin-511 regulates breast tumor cell invasion and metastasis. *Int. J. Cancer* 130, 555–566.
- Kuzu, O. F., Noory, M. A., and Robertson, G. P. (2016) The Role of Cholesterol in Cancer. *Cancer Res.* 76, 2063–70.
- La Porta, C. A. M. (2007) Drug resistance in melanoma: new perspectives. *Curr. Med. Chem.* 14, 387–91.
- Laemmli, U. K. (1970) No Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lambert, J.D., and Yang, C.S. (2003a) Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutat Res.* 523–524:201–208.
- Lambert, J.D., and Yang, C.S. (2003b). Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J Nutr* 133:3262S–3267S.
- Landau, J. M., Wang, Z. Y., Yang, G. Y., Ding, W., and Yang, C. S. (1998) Inhibition of spontaneous formation of lung tumors and rhabdomyosarcomas in A/J mice by black and green tea. *Carcinogenesis* 19, 501–7.
- Lanzos, E. (1998) Papel de la radioterapia. En: Diaz-Rubio, E. Escudero, M. editors. *Cancer de mama. 1a ed. Madrid Int. Mark. Commun. SA.*
- LARIVIERE, J. Y. (1979) Ulcères phagedéniques cancérisés. *Med. Trop.* 39, 285–291.
- Larrad, A., Louredo, A. (2002) Marcadores tumorales e inmunohistoquímicos. En: Lombardia J, Rodriguez I Carreira MC, editors, *La mama paso a paso. 1a ed. Madrid. Ediciones Erg. SA* 129–134.
- Leamon, C. P., and Low, P. S. (1992) Cytotoxicity of momordin-folate conjugates in cultured human cells. *J Biol Chem.* 267:24966 –24971.
- Leamon, C. P., and Low, P. S. (1993) Membrane folate-binding proteins are responsible for folate-protein conjugate endocytosis into cultured cells. *Biochem. J.* 855–60.
- Leamon, C. P., Parker M.A., Vlahov, I.R., Xu, L.C., Reddy, J.A., Vetzal, M., and Douglas, N. (2002) Synthesis and biological evaluation of EC20: a new folate-derived, 99mTc based radiopharmaceutical. *Bioconjug Chem.* 13:1200 –1210.
- 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 SR, Suh SI, Kim SP. (2000). Protective effects of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate against hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in gerbils. *Neurosci Lett.* 287:191–194.
- Lee, M.-Y., Chou, C.-Y., Tang, M.-J., and Shen, M.-R. (2008) Epithelial-Mesenchymal Transition in Cervical Cancer: Correlation with Tumor Progression, Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression, and Snail Up-Regulation. *Clin. Cancer Res.* 14, 4743–4750.

- Lee, S., and Murthy, N. (2007) Targeted delivery of catalase and superoxide dismutase to macrophages using folate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 275–279.
- Lenner, P., Wiklund, F., Emdin, S. O., Arnerlöv, C., Eklund, C., Hallmans, G. et al. (1999) Serum antibodies against p53 in relation to cancer risk and prognosis in breast cancer: a population-based epidemiological study. *Br. J. Cancer* 79, 927–932.
- Lenz, E. R., Pugh, L. C., Milligan, R. A., Gift, A., and Suppe, F. (1997) The middle-range theory of unpleasant symptoms: an update. *ANS. Adv. Nurs. Sci.* 19, 14–27.
- Lesuffleur, T., Kornowski, A., Luccioni, C., Muleris, M., Barbat, A., Beaumatin, J., Dussaulx, E., Dutrillaux, B. and Zweibaum, A. (1991) Adaptation to 5-fluorouracil of the heterogeneous human colon tumor cell line HT-29 results in the selection of cells committed to differentiation. *Int. J. Cancer* 49, 721-730
- Levine, A. J. (1997) P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323–331.
- Levites Y, Weinreb O, Maor G, Youdim MB, Mandel S. (2001). Green tea polyphenol (-) - epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *J Neurochem.* 78:1073–1082.
- 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, N., Han, C., and Chen, J. (1999) Tea Preparations Protect Against DMBA-Induced Oral Carcinogenesis in Hamsters. *Nutr. Cancer* 35, 73–79.
- Li, W., Sanki, A., Karim, R. Z., Thompson, J. F., Soon Lee, C., Zhuang, L., McCarthy, S. W., and Scolyer, R. A. (2006) The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology* 38, 287–301.
- Li, X.-L., Zhou, J., Chen, Z.-R., and Chng, W.-J. (2015) P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J. Gastroenterol.* 21, 84–93.
- Li, Y., Tian, B., Yang, J., Zhao, L., Wu, X., Ye, S.-L., Liu, Y.-K., and Tang, Z.-Y. (2004) Stepwise metastatic human hepatocellular carcinoma cell model system with multiple metastatic potentials established through consecutive in vivo selection and studies on metastatic characteristics. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 130, 460–468.
- Lim, S., and Kaldis, P. (2013) Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development.* 140, 3079–93.
- Limam, I., Bazaa, A., Srairi-Abid, N., Taboubi, S., Jebali, J., Zouari-Kessentini, R., Kallech-Ziri, O., Mejdoub, H., Hammami, A., El Ayeb, M., Luis, J., and Marrakchi, N. (2010) Leberagin-C, A disintegrin-like/cysteine-rich protein from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits alphavbeta3 integrin-mediated cell adhesion. *Matrix Biol.* 29, 117–126.
- Lin TN, He YY, Wu G, Khan M, Hsu CY. (1993). Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke.* 24:117–121.

Lin, J. Y., and Fisher, D. E. (2007) Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445, 843–850.

Linjawi, S., Li, T. C., Tuckerman, E. M., Blakemore, A. I. F., and Laird, S. M. (2004) Expression of interleukin-11 receptor α and interleukin-11 protein in the endometrium of normal fertile women and women with recurrent miscarriage. *J. Reprod. Immunol.* 64, 145–155.

Liotta, L. A., and Kohn, E. C. (2001) The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411, 375–379.

Lippens, S., Hoste, E., Vandenabeele, P., Agostinis, P., and Declercq, W. (2009) Cell death in the skin. *Apoptosis.* 14, 549–569.

Lipponen, P. (1999) Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. *Endocr. Relat. Cancer* 6, 13–6.

Liu, T. T., Liang, N.-S., Li, Y., Yang, F., Lu, Y., Meng, Z. Q., and Zhang, L. S. (2003) Effects of long-term tea polyphenols consumption on hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes and liver function in Wistar rats. *World J. Gastroenterol.* 9, 2742–4.

Liu, X., Ji, Q., Fan, Z., Li, Q. (2015) Cellular signaling pathways implicated in metastasis of colorectal cancer and the associated targeted agents. *Future Oncol* 11 (21) 2911-2922.

Lohrish, C., Piccart, M., (2001) Her2/neu as a predictive factor in breast cancer. *Clin. Breast Cancer* 2, 129–135.

Lopez F, R. J. (2002) Diagnostico precoz del cancer de mama. Papel del médico de atención primaria. En: Lombardia, J. Rodriguez, I. Carreira, M. C. editors. *La mama paso a paso. 1a ed. Madrid. Ediciones Erg. SA* 267–276.

Lopez, LJ. Roldan, M. (2002) Factores pronostico. En: Lombardia J., Rodriguez I., Carreira MC., *La mama paso a paso. 1a ed. Madrid. Ediciones Erg. SA* 315–320.

Lu, Q., Navdaev, A., Clemetson, J. M., and Clemetson, K. J. (2005) Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structure–function relationships and effects on haemostasis. *Toxicon* 45, 1089–1098.

Lu, Y. P., Lou, Y. R., Xie, J. G., Yen, P., Huang, M. T., and Conney, A. H. (1997) Inhibitory effect of black tea on the growth of established skin tumors in mice: effects on tumor size, apoptosis, mitosis and bromodeoxyuridine incorporation into DNA. *Carcinogenesis* 18, 2163–9.

Łuczaj, W., and Skrzydlewska, E. (2004) Antioxidant properties of black tea in alcohol intoxication. *Food Chem. Toxicol.* 42, 2045–2051.

Lukashev, M. E., and Werb, Z. (1998) ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* 8, 437–41.

Lynch, H. T. Lemon, S. J. Marcus, J. N. Lerman, C. Lynch, J. Narod, S. (2000) Genetica del cáncer de mama: heterogeneidad, genética molecular, diagnostico de síndromes y asesoramiento genético. En Bland, K. I. Copeland III EM editors. *La mama. Manejo*

multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2a ed. Buenos Aires. Editor. Médica Panam. SZ.

Maalej, M. Frikha, H. Ben Salem, S. Daouad, J. Bouaouina, N. Ben Abdallah, M. Ben Romdhane, K. (1999) Le cancer du sein en Tunisie : étude clinique et épidémiologique. *Bull Cancer* 12, 141–8.

Madonna, G., Ullman, C., Gentilcore, G., Palmieri, G., and Ascierto, P. (2012) NF- κ B as potential target in the treatment of melanoma. *J. Transl. Med.* 10, 53.

Majima, T., Tsutsumi, M., Nishino, H., Tsunoda, T., and Konishi, Y. (1998) Inhibitory effects of beta-carotene, palm carotene, and green tea polyphenols on pancreatic carcinogenesis initiated by N-nitrosobis(2-oxopropyl) amine in Syrian golden hamsters. *Pancreas* 16, 13–8.

Majumdar, S., and Aggarwal, B. B. (2001) Methotrexate suppresses NF-kappaB activation through inhibition of IkappaBalpha phosphorylation and degradation. *J. Immunol.* 167, 2911–20.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer.* 9, 153–166.

Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., and Weinberg, R. A. (2008) The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* 133, 704–715.

Mantena, S. K., Meeran, S. M., Elmets, C. A., and Katiyar, S. K. (2005) Orally administered green tea polyphenols prevent ultraviolet radiation-induced skin cancer in mice through activation of cytotoxic T cells and inhibition of angiogenesis in tumors. *J. Nutr.* 135, 2871–7.

Marcinkiewicz, C. Calvete, J.J., Vijay-Kumar, S., Marcinkiewicz, M.M., Raida, M. Schick, P., Lobb, R.R., Niewiarowski, S. (1999) *Biochemistry.* 38, 13302-13309.

Marcinkiewicz, C. (2005) Functional characteristic of snake venom disintegrins: Potential therapeutic implication. *Curr. Pharm. Des* 11, 815–827

Marcinkiewicz, C. (2013) Applications of snake venom components to modulate integrin activities in cell-matrix interactions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 1974–86.

Marcinkiewicz, C., Calvete, J.J., Marcinkiewicz, M. M., Raida, M., Lobb, R.R., Vijay-Kumar, S., Huang, Z., Niewiarowski, S. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 12468-12473.

Marcinkiewicz, C., Lobb, R. R., Marcinkiewicz, M. M., Daniel, J. L., Smith, J. B., Dangelmaier, C., Weinreb, P. H., Beacham, D. A., and Niewiarowski, S. (2000) Isolation and characterization of EMS16, a C-lectin type protein from *Echis multisquamatus* venom, a potent and selective inhibitor of the alpha2beta1 integrin. *Biochemistry.* 39, 9859–67.

Marcinkiewicz, C., Vijay-Kumar, S., McLane, M. A., and Niewiarowski, S. (1997) Significance of RGD loop and C-terminal domain of echistatin for recognition of alpha11b beta3 and alpha(v) beta3 integrins and expression of ligand-induced binding site. *Blood* 90, 1565–75.

- Markland, F. S., Shieh, K., Zhou, Q., Golubkov, V., Sherwin, R. P., Richters, V., and Sposto, R. A novel snake venom disintegrin that inhibits human ovarian cancer dissemination and angiogenesis in an orthotopic nude mouse model. *Haemostasis* 31, 183–91.
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1995) Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268, 1336–8.
- Marquez, A. Alba, E. (1998) Cancer de mama avanzado: tratamiento quimoterapico En: Diaz-Rubio, E. Escudero, M. editors. Cancer de mama. 1a ed. Madrid Int. Mark. Commun. SA 201–214.
- Mason, R. (2001). 200 mg of Zen. *Alternative & Complementary Therapies*.
- Massagué, J., and Gomis, R. R. (2006) The logic of TGFβ signaling. *FEBS Lett.* 580, 2811–2820.
- Masuda S, Saito H, and Inui KI (1997). Interactions of nonsteroidal antiinflammatory drugs with rat renal organic anion transporter, OAT-K1. *J Pharmacol Exp Ther.* 283:1039–1042.
- Mazzon, E., Muia, C., Paola, R.D., Genovese, T., Menegazzi, M., De Sarro, A., Suzuki, H., Cuzzocrea, S., (2005). Green tea polyphenol extract attenuates colon injury induced by experimental colitis. *Free Radic. Res.* 39, 1017–1025.
- McGary, E. C. Lev, D. C. Bar-Eli, M. (2002) Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. *Cancer Biol. Ther.* 1, 459–65.
- McGuire, J.J. (2003). Anticancer antifolates: current status and future directions. *Curr Pharm Des.* 9, 2593-2613.
- McLane, M. A., Sanchez, E. E., Wong, A., Paquette-Straub, C., and Perez, J. C. (2004) Disintegrins. *Curr. Drug Targets. Cardiovasc. Haematol. Disord.* 4, 327–55.
- McNulty, S. E., Rosario, R. del, Cen, D., Meyskens, F. L., and Yang, S. (2004) Comparative Expression of NFkappaB Proteins in Melanocytes of Normal Skin vs. Benign Intradermal Naevus and Human Metastatic Melanoma Biopsies. *Pigment Cell Res.* 17, 173–180.
- Megahed, A. I., and Koon, H. B. (2014) What Is the Role of Chemotherapy in the Treatment of Melanoma? *Curr. Treat. Options Oncol.* 15, 321–335.
- Meijer, L. (2003) Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie.* 5, 311-326.
- Mendilaharsu, M., De Stefani, E., Deneo-Pellegrini, H., Carzoglio, J. C., and Ronco, A. (1998) Consumption of tea and coffee and the risk of lung cancer in cigarette-smoking men: a case-control study in Uruguay. *Lung Cancer* 19, 101–7.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., and Tschopp, J. (2001) NF- B Signals Induce the Expression of c-FLIP. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5299–5305.

- Millan, A., Huerta, S. (2009) Apoptosis-inducing factor and colon cancer. *J Surg Res.* 151 (1) 163-170.
- Miura, T., Muraoka, S., T. Ogiso, T. (1995). Protective effect of p-blockers against 2,2'-azobis(2-amidinopropane)-dihydrochloride-induced damage. *Chern. -Biol. Inreruction.* 97, 25-35.
- MOCHIZUKI, M., YOO, Y., MATSUZAWA, K., SATO, K., SAIKI, I., TONOOKA, S., SAMUKAWA, K., and AZUMA, I. (1995) Inhibitory Effect of Tumor Metastasis in Mice by Saponins, Ginsenoside-Rb2, 20(R)- and 20(S)-Ginsenoside-Rg3, of Red ginseng. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 1197–1202.
- Molinari, F., Frattini, M. (2014) Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 3: 326.
- Moloney, F. J., Lyons, J. G., Bock, V. L., Huang, X. X., Bugeja, M. J., and Halliday, G. M. (2009) Hotspot Mutation of Brahma in Non-Melanoma Skin Cancer. *J. Invest. Dermatol.* 129, 1012–1015.
- Momic, T., Arlinghaus, F.T., Arien-Zakay, H., Katzhendler, J., Eble, J.A., Marcinkiewicz, C., Lazarovici, P. (2011) Pharmacological aspects of *Vipera xantina palestinae* venom. *Toxins* 3, 1420–1432.
- Montassar, F., Darche, M., Blaizot, A., Augustin, S., Conart, J.-B., Millet, A., Elayeb, M., Sahel, J.-A., Réaux-Le Goazigo, A., Sennlaub, F., Marrakchi, N., Messadi, E., and Guillonneau, X. (2017) Lebecetin, a C-type lectin, inhibits choroidal and retinal neovascularization. *FASEB J.* 31, 1107–1119.
- Monteiro, A. C., Toricelli, M., and Jasiulionis, M. G. (2015) Signaling Pathways Altered During the Metastatic Progression of Melanoma. *Melanoma - Current Clinical Management and Future Therapeutics. Intech.* DOI, 10.5772/59747.
- Moorchung, N., Kunwar, S., and Ahmed, K. W. (2014) An evaluation of nuclear factor kappa B expression in colorectal carcinoma: an analysis of 50 cases. *J. Cancer Res. Ther.* 10, 631–5.
- Moran, R.G., Werkheiser, W.C., Zakrzewski, S.F., 1976. Folate metabolism in mammalian cells in culture. I Partial characterization of the folate derivatives present in L1210 mouse leukemia cells. *Journal of Biological Chemistry.* 251, 3569–3575.
- Moreno, J. Rodriguez-Escudero, F. J. (2003) Otras terapeuticas oncologicas: Citostaticos, radioterapia, otras radiaciones ionisantes. En: Cabero, L. editors. *Tratado de Ginecologia, Obstetrica y Medicina de la reproduccion. 1a ed. Madrid Editor. Médica Panam. SA* 1825–1834.
- 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, 441–6.

- Morjen, M., Honoré, S., Bazaa, A., Abdelkafi-Koubaa, Z., Ellafi, A., Mabrouk, K., Kovacic, H., El Ayeb, M., Marrakchi, N., and Luis, J. (2014) PIVL, a snake venom Kunitz-type serine protease inhibitor, inhibits in vitro and in vivo angiogenesis. *Microvasc. Res.* *95*, 149–156.
- Mu, L., Zhou, X., Ding, B., Wang, R., Zhang, Z., Chen, C., Wei, G., Zhou, X., Jiang, Q., and Yu, S. (2003) [A case-control study on drinking green tea and decreasing risk of cancers in the alimentary canal among cigarette smokers and alcohol drinkers]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* *24*, 192–5.
- Mukhtar, H., and Ahmad, N. (2000) Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am. J. Clin. Nutr.* *71*, 1698S–702S; discussion 1703S–4S.
- Nagao, T., Komine, Y., Soga, S., Meguro, S., Hase, T., Tanaka, Y., and Tokimitsu, I. (2005) Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. *Am. J. Clin. Nutr.* *81*, 122–9.
- Nakachi, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suganuma, M., and Imai, K. (2000) Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: Epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *BioFactors* *13*, 49–54.
- Nakachi, K., Suemasu, K., Suga, K., Takeo, T., Imai, K., and Higashi, Y. (1998) Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients. *Jpn. J. Cancer Res.* *89*, 254–61.
- Naldi, L., Gallus, S., Tavani, A., Imberti, G. L., La Vecchia, C., and Oncology Study Group of the Italian Group for Epidemiologic Research in Dermatology. (2004) Risk of melanoma and vitamin A, coffee and alcohol: a case-control study from Italy. *Eur. J. Cancer Prev.* *13*, 503–8.
- Naldi, L., Gallus, S., Tavani, A., Imberti, G. L., La Vecchia, C., and Oncology Study Group of the Italian Group for Epidemiologic Research in Dermatology. (2004) Risk of melanoma and vitamin A, coffee and alcohol: a case-control study from Italy. *Eur. J. Cancer Prev.* *13*, 503–8.
- Naldi, L., Gallus, S., Tavani, A., Imberti, G. L., La Vecchia, C., and Oncology Study Group of the Italian Group for Epidemiologic Research in Dermatology. (2004) Risk of melanoma and vitamin A, coffee and alcohol: a case-control study from Italy. *Eur. J. Cancer Prev.* *13*, 503–8.
- Nam, N.-H. (2006) Naturally occurring NF-kappaB inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.* *6*, 945–51.
- Navarrete, S. (2000) Tratamiento radioterapico del cancer de mama. En: Perez Lopez, F. R. editors. *Cancer de mama: biologia, diagnostico y tratamiento. 1a ed. Zaragoza. SEISGE* 227–237.
- Navarro-Perán, E., Cabezas-Herrera, J., Campo, L. S. del, and Rodríguez-López, J. N. (2007) Effects of folate cycle disruption by the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *39*, 2215–2225.
- 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.

Navarro-Perán, E., Cabezas-Herrera, J., Sánchez-del-Campo, L., García-Cánovas, F., and Rodríguez-López, J. N. (2008) The anti-inflammatory and anti-cancer properties of epigallocatechin-3-gallate are mediated by folate cycle disruption, adenosine release and NF- κ B suppression. *Inflamm. Res.* 57, 472–478.

Neufeld, G., Tessler, S., Gitay-Goren, H., Cohen, T., and Levi, B. Z. (1994) Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog. Growth Factor Res.* 5, 89–97.

Niculescu, M. D., and Zeisel, S. H. (2002) Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J. Nutr.* 132, 2333S–2335S.

Nihal, M., Ahmad, N., Mukhtar, H., and Wood, G. S. (2005) Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: Possible implications for the chemoprevention of melanoma. *Int. J. Cancer* 114, 513–521.

Nihal, M., Ahmad, N., Mukhtar, H., and Wood, G. S. (2005) Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: Possible implications for the chemoprevention of melanoma. *Int. J. Cancer* 114, 513–521.

Niles, R. M., McFarland, M., Weimer, M. B., Redkar, A., Fu, Y. M., and Meadows, G. G. (2003) Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Lett.* 190, 157–63.

Nkondjock, A., Ghadirian, P., Johnson, K. C., Krewski, D., and Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group, the C. C. R. E. R. (2005) Dietary intake of lycopene is associated with reduced pancreatic cancer risk. *J. Nutr.* 135, 592–7.

Nolte, S., de Castro Damasio, D., Baréa, A. C., Gomes, J., Magalhães, A., Mello Zischler, L. F. C., Stuelp-Campelo, P. M., Elffio-Esposito, S. L., Roque-Barreira, M. C., Reis, C. A., and Moreno-Amaral, A. N. (2012) BJcuL, a lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. *Toxicon* 59, 81–85.

Newshean, S., and Yang, E. S. (2012) The intersection between DNA damage response and cell death pathways. *Exp. Oncol.* 34, 243–54.

Nunes, E. S., Souza, M. A. A., Vaz, A. F. M., Silva, T. G., Aguiar, J. S., Batista, A. M., Guerra, M. M. P., Guarnieri, M. C., Coelho, L. C. B. B., and Correia, M. T. S. (2012) Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. *Toxicon* 59, 667–671.

Ochaion, A., Bar-Yehuda, S., Cohn, S., Del Valle, L., Perez-Liz, G., Madi, L., Barer, F., Farbstein, M., Fishman-Furman, S., Reitblat, T., Reitblat, A., Amital, H., Levi, Y., Molad, Y., Mader, R., Tishler, M., Langevitz, P., Zabutti, A., and Fishman, P. (2006) Methotrexate enhances the anti-inflammatory effect of CF101 via up-regulation of the A3 adenosine receptor expression. *Arthritis Res. Ther.* 8, R169.

Ogawa, T., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., and Ohno, M. (2005) Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. *Toxicon* 45, 1–14.

- Okegawa, T., Pong, R.-C., Li, Y., and Hsieh, J.-T. (2004) The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim. Pol.* 51, 445–57.
- Okubo, S., Toda, M., Hara, Y., and Shimamura, T. (1991) [Antifungal and fungicidal activities of tea extract and catechin against Trichophyton]. *Nihon Saikingaku Zasshi.* 46, 509–14.
- Olfa, K.-Z., José, L., Salma, D., Amine, B., Najet, S. A., Nicolas, A., Maxime, L., Raoudha, Z., Kamel, M., Jacques, M., Jean-Marc, S., Mohamed, E. A., and Naziha, M. (2005) Lebestatin, a disintegrin from *Macrovipera* venom, inhibits integrin-mediated cell adhesion, migration and angiogenesis. *Lab. Investig.* 85, 1507–16.
- Onder, T. T., Gupta, P. B., Mani, S. A., Yang, J., Lander, E. S., and Weinberg, R. A. (2008) Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways. *Cancer Res.* 68, 3645–3654.
- Oratz, R., Cockerall, C., Speyer, J., Hams, M.N., Roses, D.F, B., and Bystry, J.C. (1989) Induction of lymphocytic cell infiltrate in malignant melanoma metastases by immunization to melanoma antigen vaccine. *Biol Response Mod* 8, 355–358.
- Osin, P. P. L. S. R. (1999) The pathology of familial breast cancer: immunohistochemistry and molecular analysis. *Breast Cancer Res.* 1, 36–40.
- Pacheco, C. Tejada, A. M. L. et al. (2000) Nuestra experiencia con el tratamiento conservador del cancer de mama. En: Perez Lopez, F. R. editors. Cancer de mama: biologia, diagnostico y tratamiento. 1a ed. Zaragoza. SEISGE 175–186.
- Palacios, S. (2002) Salud y medicina de la mujer. 1a ad. Madrid MM ediciones Harcourt SA. (71)
- Russo, I. H. Russo, J. (2000) Hormonal approach to breast cancer prevention. *J. Biochesitry Suppl.* 34, 1–6.
- Parkin, D. M., Pisani, P., and Ferlay, J. (1999) Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 49, 33–64.
- Pathan, J., Mondal, S., Sarkar, A., and Chakrabarty, D. (2017) Daboialectin, a C-type lectin from Russell's viper venom induces cytoskeletal damage and apoptosis in human lung cancer cells in vitro. *Toxicon* 127, 11–21.
- Peddareddigari, V. G., Wang, D., Dubois, R. N. (2010) The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. *Cancer Microenviron.* 3 (1) 149-166.
- Peng, Y., Chen, L., Li, C., Lu, W., and Chen, J. (2001) Inhibition of MDM2 by hsp90 Contributes to Mutant p53 Stabilization. *J. Biol. Chem.* 276, 40583–40590.
- Pereira-Bittencourt, M., Carvalho, D. D., Gagliardi, A. R., and Collins, D. C. (1999) The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. *Anticancer Res.* 19, 4023–5.
- Perez, P. Matin, M. (1998) Tratamiento sistematico adyuvante en cancer de mama precoz. En: Diaz-Rubio, E. Escudero, M. editors. Cancer de mama. 1a ed. Madrid Int. Mark. Commun. SA 141–155.

- Peyressatre, M., Prével, C., Pellerano, M., and Morris, M. C. (2015) Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to Peptide inhibitors. *Cancers (Basel)*. 7, 179–237.
- Piccart, M., Hamilton, A. (2000) The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer : A review of the literature on HER-2, p53 and Bcl-2. *Ann. Oncol.* 11, 647–663.
- Piera, J. (1998) Cancer de mama avanzado: tratamiento hormonoterapico. En: Diaz-Rubio, E. Escudero, M. editors. *Cancer de mama. 1a ed. Madrid Int. Mark. Commun.* SA 189–200.
- Pilorget, A., Conesa, M., Sarray, S., Michaud-Levesque, J., Daoud, S., Kim, K. S., Demeule, M., Marvaldi, J., El Ayeb, M., Marrakchi, N., Béliveau, R., and Luis, J. (2007) Lebectin, a Macrovipera lebetina venom-derived C-type lectin, inhibits angiogenesis both in vitro and in vivo. *J. Cell. Physiol.* 211, 307–315.
- Pollán, M., Michelena, M. J., Ardanaz, E., Izquierdo, A., Sá Nchez-Pé Rez, M. J., and Torrella, A. (2010) Breast cancer incidence in Spain before, during and after the implementation of screening programmes. *Ann. Oncol.* 21, 97–102.
- Pollock, P. M., Cohen-Solal, K., Sood, R., Namkoong, J., Martino, J. J., Koganti, A., Zhu, H., Robbins, C., Makalowska, I., Shin, S.-S., Marin, Y., Roberts, K. G., Yudt, L. M., Chen, A., Cheng, J., Incao, A., Pinkett, H. W., Graham, C. L., Dunn, K., Crespo-Carbone, S. M., Mackason, K. R., Ryan, K. B., Sinsimer, D., Goydos, J., Reuhl, K. R., Eckhaus, M., Meltzer, P. S., Pavan, W. J., Trent, J. M., and Chen, S. (2003) Melanoma mouse model implicates metabotropic glutamate signaling in melanocytic neoplasia. *Nat. Genet.* 34, 108–112.
- Pollock, P.M., Trent, J. M. (2000) The genetics of cutaneous melanoma. *Clin Lab Med* 20, 667–690.
- Pommier. Y., Kohn, K. W. (2003) Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie : nouvelles cibles thérapeutiques. *MEDECINE/SCIENCES*. 19, 173-186.
- Potrony, M., Badenas, C., Aguilera, P., Puig-Butille, J. A., Carrera, C., Malveyh, J., and Puig, S. (2015) Update in genetic susceptibility in melanoma. *Ann. Transl. Med.* 3, 210.
- 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.
- Putnam, A. J., Schulz, V. V, Freiter, E. M., Bill, H. M., and Miranti, C. K. (2009) Src, PKCalpha, and PKCdelta are required for alphavbeta3 integrin-mediated metastatic melanoma invasion. *Cell Commun. Signal.* 7, 10.
- Qanungo, S., Das, M., Haldar, S., and Basu, A. (2004) Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* 26, 958–967.

- Qi, J., Chen, N., Wang, J., and Siu, C.-H. (2005) Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway. *Mol. Biol. Cell* 16, 4386–97.
- Raab-Westphal, S., Marshall, J., and Goodman, S. (2017) Integrins as Therapeutic Targets: Successes and Cancers. *Cancers (Basel)*. 9, 110.
- Raisova, M., Hossini, A. M., Eberle, J., Riebeling, C., Orfanos, C. E., Geilen, C. C., Wieder, T., Sturm, I., and Daniel, P. T. (2001) The Bax/Bcl-2 Ratio Determines the Susceptibility of Human Melanoma Cells to CD95/Fas-Mediated Apoptosis. *J. Invest. Dermatol.* 117, 333–340.
- Rajabi, P., Neshat, A., Mokhtari, M., Rajabi, M. A., Eftekhari Dr., M., and Tavakkoli, P. (2012) The role of VEGF in melanoma progression. *J. Res. Med. Sci.* 17, 534–539.
- Ramakrishnan, P.S., Saxena, K.G. and Rao, K.S., (2006). Shifting Agriculture and Sustainable Development of North-East India: Tradition in Transition. *UNESCO and Oxford & IBH, New Delhi*. 495.
- Ramirez, R. D., Morales, C. P., Herbert, B. S., Rohde, J. M., Passons, C., Shay, J. W., and Wright, W. E. (2001) Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev.* 15, 398–403.
- Ratnayake, W. S., Apostolatos, A. H., Ostrov, D. A., and Acevedo-Duncan, M. (2017) Two novel atypical PKC inhibitors; ACPD and DNDA effectively mitigate cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition of metastatic melanoma while inducing apoptosis. *Int. J. Oncol.*
- Ratnayake, W. S., Apostolatos, A. H., Ostrov, D. A., and Acevedo-Duncan, M. (2017) Two novel atypical PKC inhibitors; ACPD and DNDA effectively mitigate cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition of metastatic melanoma while inducing apoptosis. *Int. J. Oncol.*
- Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S. A., Maisee, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jäättelä, M., Penninger, J. M., Garrido, C., and Kroemer, G. (2001) Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol.* 3, 839–843.
- Ravaud, A. (2007) Le mécanisme de l'angiogénèse tumorale. *Progrès en Urologie* 17, 144-147.
- Rezai-Zadeh, K., Shytle, D., Sun, N., Mori, T., Hou, H., Jeanniton, D., Ehrhart, J., Townsend, K., Zeng, J., Morgan, D., Hardy, J., Town, T., and Tan, J. (2005) Green Tea Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Modulates Amyloid Precursor Protein Cleavage and Reduces Cerebral Amyloidosis in Alzheimer Transgenic Mice. *J. Neurosci.* 25, 8807–8814.
- Robertson, N. G., Lu, L., Heller, S., Merchant, S.N., Eavey, R.D., McKenna, M., Nadol, J.B. Jr., Miyamoto, R.T., Linthicum, F.H. Jr., Lubianca Neto, J.F., Hudspeth, A.J., Seidman, C.E., Morton, C.C. S. J. (1998) Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat. Genet.* 20, 299–303.

- Rod, T. H., and Brooks, C. L. (2003) How Dihydrofolate Reductase Facilitates Protonation of Dihydrofolate. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8718–8719.
- Rodenas, J. M., Delgado-Rodriguez, M., Herranz, M. T., Tercedor, J., and Serrano, S. (1996) Sun exposure, pigmentary traits, and risk of cutaneous malignant melanoma: a case-control study in a Mediterranean population. *Cancer Causes Control* 7, 275–283.
- Rodriguez, J. R., Rodriguez, J. R. (2000) Ciclo celular. Bases de quimioterapia. En: Herruzo, A. J. Menjon, S. Rodriguez-Escudero, F. J. Avances y controversias en Ginecología oncología en. 1a ed. Granada. Proy. Sur Ediciones SL 21–68.
- Roman, J. M. (1998) La cirugía en el cancer de mama: desde la mastectomia hasta el tratamiento conservador. En: Diaz-Rubio, E. Escudero, M. editors. Cancer de mama. 1a ed. Madrid Int. Mark. Commun. SA 121–130.
- Román, J. M. (1998) La cirugía en el cancer de mama: desde la mastectomia hasta el tratamiento consevador. En: Diaz-Rubio, E. Escudero, M. editors. Cancer de mama. 1a ed. Madrid Int. Mark. Commun. 121–130.
- Román, J. M., Barron, E. M., Martinez, P. (1998) Diagnostico precoz y screening. En Diaz-Rubio E, Escudero M, editors. Cáncer de mama. 1a ed. Madrid Int. Mark. Commun. SA 39–61.
- Roomi, M. W., Roomi, N. W., Ivanov, V., Kalinovsky, T., Niedzwiecki, A., and Rath, M. (2005) Modulation of N-methyl-N-nitrosourea induced mammary tumors in Sprague-Dawley rats by combination of lysine, proline, arginine, ascorbic acid and green tea extract. *Breast Cancer Res.* 7, R291-5.
- Rosenow, F., Ossig, R., Thormeyer, D., Gasmann, P., Schlüter, K., Brunner, G., Haier, J., Eble J. A. (2008) Antimetastatic Integrin as Inhibitors of Snake Venoms. *Neoplasia* 10, 168–176.
- Rosowsky, A., Wright, J. E., Vaidya, C. M., Forsch, R. A., and Bader, H. (2000) Analogues of the potent nonpolyglutamatable antifolate N(alpha)-(4-amino-4-deoxypteroyl)-N(delta)-hemiphthaloyl-L-ornithine (PT523) with modifications in the side chain, p-aminobenzoyl moiety, or 9,10-bridge: synthesis and in vitro antitumor activity. *J. Med. Chem.* 43, 1620–34.
- 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.
- Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E., and Polakis, P. (1997) Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275, 1790–2.
- Ruiter, D. J., and Van Muijen, G. N. P. (1998) Markers of melanocytic tumour progression. *J. Pathol.* 186, 340–342.
- Russo, A., Bazan, V., Morello, V., Tralongo, V., Nagar, C., Nuara, R. et al. (1994) Vimentin expression, proliferating cell nuclear antigen and flow cytometric factors. Pronostic role in breast cancer. *Anal Quant Cytol Histol* 16, 365–374.

- Russo, I. H., Russo, I. H. (2000) Desarrollo y aspectos patogeneticos del cancer de mama humano. En: Perez Lopez FR, editors. Cancer de mama: biologia, diagnostico y tratamiento. 1A ed. Zaragoza. SEISGE 7–16.
- Russo, P., Catassi, A., Cesario, A., and Servent, D. (2006) Development of novel therapeutic strategies for lung cancer: targeting the cholinergic system. *Curr. Med. Chem.* 13, 3493–512.
- Sabharanjak, S., and Mayor, S. (2004) Folate receptor endocytosis and trafficking. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1099–1109.
- Sablina, A. A., Budanov, A. V, Ilyinskaya, G. V, Agapova, L. S., Kravchenko, J. E., and Chumakov, P. M. (2005) The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med.* 11, 1306–1313.
- Sadzuka, Y., Sugiyama, T., and Sonobe, T. (2000) Efficacies of tea components on doxorubicin induced antitumor activity and reversal of multidrug resistance. *Toxicol. Lett.* 114, 155–62.
- Sáenz, S., Conejo-Mir, J., and Cayuela, A. (2005) Epidemiología del melanoma en España. *Actas Dermosifiliogr.* 96, 411–418.
- Saleem, M., Adhami, V. M., Ahmad, N., Gupta, S., and Mukhtar, H. (2005) Prognostic significance of metastasis-associated protein S100A4 (Mts1) in prostate cancer progression and chemoprevention regimens in an autochthonous mouse model. *Clin. Cancer Res.* 11, 147–53.
- Sánchez-Martínez, C., Gelbert, L. M., Lallena, M. J., de Dios, A. (2015) Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. *Bioorg Med Chem Lett.* 25 (17) 3420-3435.
- Sano, M., Takahashi, Y., Yoshino, K., Shimoi, K., Nakamura, Y., Tomita, I., Oguni, I., and Konomoto, H. (1995) Effect of tea (*Camellia sinensis* L.) on lipid peroxidation in rat liver and kidney: a comparison of green and black tea feeding. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 1006–8.
- Sarray S., Luis J., El ayeb M., M. N. (2008) Les lectines de type C de venins de serpents et leurs récepteurs sur les plaquettes et les cellules cancéreuses. *Archs. Inst. Pasteur Tunis.* 85, 1–4
- Sarray, S., Berthet, V., Calvete, J. J., Secchi, J., Marvaldi, J., Ayeb, M. El, Marrakchi, N., and Luis, J. (2004) Lebectin, a novel C-type lectin from *Macrovipera lebetina* venom, inhibits integrin-mediated adhesion, migration and invasion of human tumour cells. *Lab. Investig.* 84, 573–581.
- Sarray, S., Delamarre, E., Marvaldi, J., Ayeb, M. El, Marrakchi, N., and Luis, J. (2007) Lebectin and lebecetin, two C-type lectins from snake venom, inhibit $\alpha 5\beta 1$ and αv -containing integrins. *Matrix Biol.* 26, 306–313.
- Sarray, S., Srairi, N., Hatmi, M., Luis, J., Louzir, H., Regaya, I., Slema, H., Marvaldi, J., El Ayeb, M., and Marrakchi, N. (2003) Lebecetin, a potent antiplatelet C-type lectin from *Macrovipera lebetina* venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1651, 30–40.

- Sarray, S., Srairi, N., Luis, J., Marvaldi, J., El Ayeb, M., and Marrakchi, N. (2001) Lebecetin, a C-lectin protein from the venom of *Macrovipera lebetina* that inhibits platelet aggregation and adhesion of cancerous cells. *Haemostasis* 31, 173–6.
- 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.
- Sayama, K., Lin, S.X., Zheng, G.D., Oguni, I. (2003). Antiobee effects of green tea powder and its components. International Symposium on Green tea; *KFN Conference*. 55–62.
- Scarborough, R.M., Rose, J.W., Hsu, M.A., Phillips, D.R., Fried, V.A., Campbell, A.M., Nannizzi, L., and Charo, I.F. (1991). Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. barbouri*. *J. Biol. Chem.* 266, 9359–9362.
- Schepsky, A., Bruser, K., Gunnarsson, G. J., Goodall, J., Hallsson, J. H., Goding, C. R., Steingrímsson, E., and Hecht, A. (2006) The Microphthalmia-Associated Transcription Factor Mitf Interacts with beta-Catenin To Determine Target Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* 26, 8914–8927.
- Schimke, R. T. (1988) Gene amplification in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 263, 5989–92.
- Schirch, V., and Strong, W. B. (1989) Interaction of folylpolyglutamates with enzymes in one-carbon metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 269, 371–80.
- 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.
- 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.
- SCHULER, M., and GREEN, D. (2005) Transcription, apoptosis and p53: catch-22. *Trends Genet.* 21, 182–187.
- Schweitzer, B. I., Dicker, A. P., Bertino, J. R. (1990) Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. *FASEB J.* 4, 2441-2452.
- KG (1986) Biosynthesis of polyglutamates of folates. 139-149
- Scott, J.M. (1999). Folate and vitamin B12. *Proc Nutr Soc.* 58, 441-448.
- Selistre-de-Araujo, H. S., Pontes, C. L. S., Montenegro, C. F., and Martin, A. C. B. M. (2010) Snake Venom Disintegrins and Cell Migration. *Toxins (Basel).* 2, 2606–2621.
- Shahid, F. Naczki, M. (1995) Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. *Lancaster, PA, Technomic Publ. CO. Inc.*
- Shattuck-Brandt, R. L., and Richmond, A. (1997) Enhanced degradation of I-kappaB alpha contributes to endogenous activation of NF-kappaB in Hs294T melanoma cells. *Cancer Res.* 57, 3032–9.

Shaw, G.M., Schaffer, D., Velie, E.M., Morland, K., and Harris, J.A. (1995). Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology*. 6, 219-226.

Shay, J.W., Bacchetti, S. A. (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer* 33A, 787–791.

Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–12.

Sheu, J. R., Lin, C. H., and Huang, T. F. (1994) Triflavin, an antiplatelet peptide, inhibits tumor cell-extracellular matrix adhesion through an arginine-glycine-aspartic acid-dependent mechanism. *J. Lab. Clin. Med.* 123, 256–63.

Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H., and Mann, M. (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 14440–14445.

Shimi, A., Berdai, A. M., Bahra, I., Messoudi, F., and Khatouf, M. (2011) [Fatal envenomation by snakebite in a pregnant woman]. *Pan Afr. Med. J.* 8, 9.

Shimizu, M., Kobayashi, Y., Suzuki, M., Satsu, H., and Miyamoto, Y. (2000). Regulation of intestinal glucose transport by tea catechins. *Biofactor*. 13, 61–65.

Shishido, S., Bönig, H., and Kim, Y.-M. (2014) Role of integrin alpha4 in drug resistance of leukemia. *Front. Oncol.* 4, 99.

Shoji, Y. Nakashima, H. (2006) Glucose-lowering effects of powder formulation of African black tea extract in (KK-Acy) TaJCL diabetic mouse. *Arch Pharma Res* 29, 786–794.

Shull, A. Y., Latham-Schwark, A., Ramasamy, P., Leskoske, K., Oroian, D., Birtwistle, M. R., and Buckhaults, P. J. (2012) Novel Somatic Mutations to PI3K Pathway Genes in Metastatic Melanoma. *PLoS One* (Chammas, R., Ed.) 7, e43369.

Siddiqui, I. A., Zaman, N., Aziz, M. H., Reagan-Shaw, S. R., Sarfaraz, S., Adhami, V. M., Ahmad, N., Raisuddin, S., and Mukhtar, H. (2005) Inhibition of CWR22R 1 tumor growth and PSA secretion in athymic nude mice by green and black teas. *Carcinogenesis* 27, 833–839.

Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2012) Cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* 62, 10–29.

Sierra, E.E., et al., 1997. pH dependence of methotrexate transport by the reduced folate carrier and the folate receptor in L1210 leukemia cells. Further evidence for a third route mediated at low pH. *Biochemical Pharmacology*. 53, 223–231.

Sierra, E.E., Goldman, I.D., 1998. Characterization of folate transport mediated by a low pH route in mouse L1210 leukemia cells with defective reduced folate carrier function. *Biochemical Pharmacology*. 55, 1505–1512.

- 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, 7921–6.
- Singh, P., Coe, J., and Hong, W. (1995) A role for retinoblastoma protein in potentiating transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *Nature* 374, 562–5.
- Sirvent, J. J., Aguilar, M. C., Olona, M., Pelegri, A., Balazquez, S., Gutiérrez, C. (2004) Prognostic value of apoptosis in breast cancer (pT1-pT2). A TUNEL, p53, bcl-2, bag-1 and Bax immunohistochemical study. *Histol. Hisopathology* 19, 759–770.
- 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, 177–82.
- Slominski, B. A., Boros, D., Campbell, L. D., Guenter, W., and Jones, O. (2004) Wheat by-products in poultry nutrition. Part I. Chemical and nutritive composition of wheat screenings, bakery by-products and wheat mill run. *Can. J. Anim. Sci.* 84, 421–428.
- Smalley, K. S. M., Contractor, R., Haass, N. K., Kulp, A. N., Atilla-Gokcumen, G. E., Williams, D. S., Bregman, H., Flaherty, K. T., Soengas, M. S., Meggers, E., and Herlyn, M. (2007) An Organometallic Protein Kinase Inhibitor Pharmacologically Activates p53 and Induces Apoptosis in Human Melanoma Cells. *Cancer Res.* 67, 209–217.
- Soengas, M. S., and Lowe, S. W. (2003) Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene.* 22, 3138–3151.
- Song, J. M., Lee, K. H., and Seong, B. L. (2005) Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Res.* 68, 66–74.
- Song, L., Li, Y., He, B., and Gong, Y. (2015) Development of Small Molecules Targeting the Wnt Signaling Pathway in Cancer Stem Cells for the Treatment of Colorectal Cancer. *Clin. Colorectal Cancer* 14, 133–145.
- Sonoda, J., Koriyama, C., Yamamoto, S., Kozako, T., Li, H. C., Lema, C., Yashiki, S., Fujiyoshi, T., Yoshinaga, M., Nagata, Y., Akiba, S., Takezaki, T., Yamada, K., and Sonoda, S. (2004) HTLV-1 provirus load in peripheral blood lymphocytes of HTLV-1 carriers is diminished by green tea drinking. *Cancer Sci.* 95, 596–601.
- Sosa, M. S., Avivar-Valderas, A., Bragado, P., Wen, H.-C., and Aguirre-Ghiso, J. A. (2011) ERK1/2 and p38 α / β signaling in tumor cell quiescence: opportunities to control dormant residual disease. *Clin. Cancer Res.* 17, 5850–7.
- Spina, M., Cuccioloni, M., Mozzicafreddo, M., Montecchia, F., Pucciarelli, S., Eleuteri, A.M., Fioretti, E., and Angeletti, M. (2008). Mechanism of inhibition of wt-dihydrofolate reductase from *E. coli* by tea epigallocatechin-gallate. *Proteins.* 72 (1) 40- 251.
- Sporn, M. B. (1996) The war on cancer. *Lancet (London, England)* 347, 1377–81.
- Srimatkandada S, Schweitzer BI, Moroson BA, Dube S, Bertino JR. (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. *Journal of Biological Chemistry*. 264, 3524-8.

Staniszewska, I., Walsh, E. M., Rothman, V. L., Gaathon, A., Tuszynski, G. P., Calvete, J. J., Lazarovici, P., and Marcinkiewicz, C. (2009) Effect of VP12 and viperistatin on inhibition of collagen-receptor-dependent melanoma metastasis. *Cancer Biol. Ther.* 8, 1507–16.

Stapleton, P. D., Shah, S., Anderson, J. C., Hara, Y., Hamilton-Miller, J. M., and Taylor, P. W. (2004) Modulation of β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *Int. J. Antimicrob. Agents* 23, 462–467.

Steele, J. C. P., Warhurst, D. C., Kirby, G. C., and Simmonds, M. S. J. (1999) In vitro and In vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial. *Phyther. Res.* 13, 115–119.

Stensvold, I., Urdal, P., Thurmer, H., Tverdal, A., Lund-Larsen, P.G., Foss, O.P. (1992). High-density lipoprotein cholesterol and coronary, cardiovascular and all cause mortality among middle-aged Norwegian men and women. *Eur Heart J.* 13(9):1155-1163.

Stepanova, E. V., Zagrekova, E. L. Ermilova, V. D. Turbin, A. D. Petrivech, n. n. Vysotskaia, I. V. et al. (2003) Molecular-biological markers as pronostic factors in breast cancer of I-IIA stage. *Rrkiv Patol.* 65, 14–18.

Stockstad, E.L.R., 1990. Historical perspective on key advances in the biochemistry and physiology of folates. In: Folic Acid Metabolism in Health and Disease. *Wiley-Liss, New York*. 1–21.

Streuli, C. H., and Akhtar, N. (2009) Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem. J.* 418, 491–506.

Stybło, T. M., Wood, W. C. (2000) Factores pronosticos tradicionales para cáncer de mama. En: La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2a ed. *Buenos Aires. Editor. Médica Panam. SA* 425–433.

Sueoka, N., Suganuma, M., Sueoka, E., Okabe, S., Matsuyama, S., Imai, K., Nakachi, K., and Fujiki, H. (2001) A new function of green tea: prevention of lifestyle-related diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 928, 274–80.

Suganuma, M., Ohkura, Y., Okabe, S., and Fujiki, H. (2001) Combination cancer chemoprevention with green tea extract and sulindac shown in intestinal tumor formation in Min mice. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127, 69–72.

Sui, X., Kong, N., Ye, L., Han, W., Zhou, J., Zhang, Q., He, C., and Pan, H. (2014) p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett.* 344, 174–179.

Sun, C.-L., Yuan, J.-M., Koh, W.-P., and Yu, M. C. (2006) Green tea, black tea and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiological studies. *Carcinogenesis.* 27, 1310–1315.

Sun, V., Zhou, W. B., Nosrati, M., Majid, S., Thummala, S., de Semir, D., Bezrookove, V., de Feraudy, S., Chun, L., Schadendorf, D., Debs, R., Kashani-Sabet, M., and Dar, A. A. (2015) Antitumor activity of miR-1280 in melanoma by regulation of Src. *Mol. Ther.* 23, 71–8.

Sun, X.-F., and Zhang, H. (2007) NFκB and NFκBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. *Histol. Histopathol.* 22, 1387–98.

Surakasula, A., Nagarjunapu, G. C., and Raghavaiah, K. V. (2014) A comparative study of pre- and post-menopausal breast cancer: Risk factors, presentation, characteristics and management. *J. Res. Pharm. Pract.* 3, 12–8.

Sutherland, B.A., Rahman, R. M., Appleton, I. (2006) Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *J. Nutr. Biochem.* 17(5), 291-306.

Sutherland, M., Gordon, A., Shnyder, S., Patterson, L., and Sheldrake, H. (2012) RGD-Binding Integrins in Prostate Cancer: *Expression Patterns and Therapeutic Prospects against Bone Metastasis. Cancers (Basel).* 4, 1106–1145.

Suzuki-Inoue, K., Fuller, G. L. J., Garcia, A., Eble, J. A., Pöhlmann, S., Inoue, O., Gartner, T. K., Hughan, S. C., Pearce, A. C., Laing, G. D., Theakston, R. D. G., Schweighoffer, E., Zitzmann, N., Morita, T., Tybulewicz, V. L. J., Ozaki, Y., and Watson, S. P. (2006) A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood* 107, 542–549.

Suzuki-Inoue, K., Ozaki, Y., Kainoh, M., Shin, Y., Wu, Y., Yatomi, Y., Ohmori, T., Tanaka, T., Satoh, K., and Morita, T. (2001) Rhodocytin induces platelet aggregation by interacting with glycoprotein Ia/IIa (GPIa/IIa, Integrin alpha 2beta 1). Involvement of GPIa/IIa-associated src and protein tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276, 1643–52.

Sztiller-Sikorska, M., Koprowska, K., Majchrzak, K., Hartman, M., and Czyz, M. (2014) Natural Compounds' Activity against Cancer Stem-Like or Fast-Cycling Melanoma Cells. *PLoS One* (Heeschen, C., Ed.) 9, e90783.

Taguchi, K., Hagiwara, Y., Kajiyama, K., Suzuki, Y. (1993). Pharmacological studies of *Houttuynia herba*: the antiinflammatory effect of quercitrin. *Yakuga. Zasshi.* 113, 327–333.

Takada, M., Nakamura, Y., Koizumi, T., Toyama, H., Kamigaki, T., Suzuki, Y., Takeyama, Y., and Kuroda, Y. (2002) Suppression of human pancreatic carcinoma cell growth and invasion by epigallocatechin-3-gallate. *Pancreas* 25, 45–8.

Takimoto, C.H., 1996. New antifolates: pharmacology and clinical applications. *Oncologist.* 1, 68–81.

Tamimi, R. M., Hankinson, S. E., Campos, H., Spiegelman, D., Zhang, S., Colditz, G. A., Willett, W. C., and Hunter, D. J. (2005) Plasma Carotenoids, Retinol, and Tocopherols and Risk of Breast Cancer. *Am. J. Epidemiol.* 161, 153–160.

Taniguchi S, Miyamoto S, S. H. and K. H. (1992) Rat elongation factor 1 alpha: sequence of cDNA from a highly metastatic fos-transferred cell line. *Nucleic Acids Res* 19, 6949.

- 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, R.P., Bharti, S.K., Kaur, R.P., Dikshit, R.P., and Hoondal, G.S. (2005). Synergistic antimicrobial activity of tea and antibiotics. *Indian Journal of Medical Research.* 122:80- 84.
- Tjalma, W., Weyler, J., Pollefiel, C., Bogers, J., Van Marck, E., van Dam, P., and Buytaert, P. (2001) The evaluation of proliferative activity in CIN III and microinvasive cervical cancer and its role in recurrence. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 94, 270–275.
- Tosseti, F. Ferrari, N. De Flora, S. Albini, A. (2002) “Angioprevention”: Angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents. *Int, J oncol* 16, 2–14.
- Toyama, M. H., Carneiro, E. M., Marangoni, S., Amaral, M. E. C., Velloso, L. A., and Boschero, A. C. (2001) Isolation and Characterization of a Convulxin-Like Protein from *Crotalus durissus collilineatus* Venom. *J. Protein Chem.* 20, 585–591.
- Trippett TM, Garcia S, Manova K, Moely R, Cohen-Gould L, Flintoff W, and Bertino JR (2001) Localization of a human reduced folate carrier protein in the mitochondrial as well as the cell membrane of leukemic cells. *Cancer Res.* 61:1941–1947.
- Tsuchida T, Itakura H, Nakamura H. (2002). Reduction of body fat in humans by long-term ingestion of catechins. *Prog Med.* 22, 2189–2203.
- Tsuneki, H., Ishizuka, M., Terasawa, M., Wu, J.-B., Sasaoka, T., and Kimura, I. (2004) Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in healthy humans. *BMC Pharmacol.* 4, 18.
- Ueda, Y., and Richmond, A. (2006) NF-kappaB activation in melanoma. *Pigment cell Res.* 19, 112–24.
- Umemura, T., Kai, S., Hasegawa, R., Kanki, K., Kitamura, Y., Nishikawa, A., and Hirose, M. (2003) Prevention of dual promoting effects of pentachlorophenol, an environmental pollutant, on diethylnitrosamine-induced hepato- and cholangiocarcinogenesis in mice by green tea infusion. *Carcinogenesis.* 24, 1105–1109.
- Unno, K., Takabayashi, F., Kishido, T., and Oku, N. (2004) Suppressive effect of green tea catechins on morphologic and functional regression of the brain in aged mice with accelerated senescence (SAMP10). *Exp. Gerontol.* 39, 1027–1034.
- 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.
- Varner, J. A., and Cheresch, D. A. (1996) Integrins and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 724–30.
- Veronesi, U. (2000) Cirujia conservadora y radioterapia en la enfermedad estadios I y II: la experiencia europea. En: Bland, K. I. Copeland III E. M. editors. La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2a ed. Buenos Aires. Editor. *Medica Paramericana SA* 1209–1214.

- Versluis, A. J., van Geel, P. J., Oppelaar, H., van Berkel, T. J., and Bijsterbosch, M. K. (1996) Receptor-mediated uptake of low-density lipoprotein by B16 melanoma cells in vitro and in vivo in mice. *Br. J. Cancer*. 74, 525–32.
- Vincenti, F., Kirkman, R., Light, S., Bumgardner, G., Pescovitz, M., Halloran, P., Neylan, J., Wilkinson, A., Ekberg, H., Gaston, R., Backman, L., and Burdick, J. (1998) Interleukin-2–Receptor Blockade with Daclizumab to Prevent Acute Rejection in Renal Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 338, 161–165.
- Vincenti, F., Larsen, C., Durrbach, A., Wekerle, T., Nashan, B., Blanche, G., Lang, P., Grinyo, J., Halloran, P. F., Solez, K., Hagerty, D., Levy, E., Zhou, W., Natarajan, K., and Charpentier, B. (2005) Costimulation Blockade with Belatacept in Renal Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 353, 770–781.
- Volk, E. L., and Schneider, E. (2003) Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res.* 63, 5538–43.
- Volpert, O. V., Dameron, K. M., and Bouck, N. (1997) Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene* 14, 1495–1502.
- Vyas, V. K., Brahmabhatt, K., Bhatt, H., and Parmar, U. (2013) Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3, 156–162.
- Waheed, H., Moin, S. F., and Choudhary, M. I. (2017) Snake Venom: From Deadly Toxins to Life-saving Therapeutics. *Curr. Med. Chem.* 24, 1874–1891.
- Walker, P. R., Weaver, V. M., Lach, B., LeBlanc, J., and Sikorska, M. (1994) Endonuclease Activities Associated with High Molecular Weight and Internucleosomal DNA Fragmentation in Apoptosis. *Exp. Cell Res.* 213, 100–106.
- Wang, A.-X., and Qi, X.-Y. (2013) Targeting RAS/RAF/MEK/ERK signaling in metastatic melanoma. *IUBMB Life* 65, 748–758.
- Wang, J., Wang, Y., Wang, S., Cai, J., Shi, J., Sui, X., Cao, Y., Huang, W., Chen, X., Cai, Z., Li, H., Bardeesi, A. S. A., Zhang, B., Liu, M., Song, W., Wang, M., and Xiang, A. P. (2015) Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-secreted IL-8 promotes the angiogenesis and growth of colorectal cancer. *Oncotarget* 6, 42825–37.
- Wang, M., Guo, C., and Li, M. (1999) [A case-control study on the dietary risk factors of upper digestive tract cancer]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 20, 95–7.
- Wang, S. C., Hung, M. (2001) HER2 overexpression and cancer targeting. *Semin. Oncol. Suppl* 16, 115–124.
- 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, 509–17.

- Weilbaecher, K. N., Motyckova, G., Huber, W. E., Takemoto, C. M., Hemesath, T. J., Xu, Y., Hershey, C. L., Dowland, N. R., Wells, A. G., and Fisher, D. E. (2001) Linkage of M-CSF signaling to Mitf, TFE3, and the osteoclast defect in Mitf(mi/mi) mice. *Mol. Cell* 8, 749–58.
- Weinberg, R. A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323–330.
- Weis, S. M., and Cheresh, D. A. (2011) α V integrins in angiogenesis and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1, a006478.
- Weisburger, J. H. (1999) Tea and Health: The Underlying Mechanisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 220, 271–275.
- Weisburger, J. H. (2003) Prevention of coronary heart disease and cancer by tea, a review. *Environ. Health Prev. Med.* 7, 283–8.
- Westerdahl, J., Olsson, H., Måsbäck, A., Ingvar, C., and Jonsson, N. (1995) Is the use of sunscreens a risk factor for malignant melanoma? *Melanoma Res.* 5, 59–65.
- White, J.C., 1979. Reversal of methotrexate binding to dihydrofolate reductase by dihydrofolate. Studies with pure enzyme and computer modeling using network thermodynamics. *Journal of Biological Chemistry.* 254, 10889–10895.
- White, J.C., Goldman, I.D., 1981. Methotrexate resistance in al L1210 cell line resulting from increased dihydrofolate reductase, decreased thymidylate synthetase activity, and normal membrane transport, Computer simulations based on network thermodynamics. *Journal of Biological Chemistry.* 256, 5722–5727.
- Widlund, H. R., Horstmann, M. A., Price, E. R., Cui, J., Lessnick, S. L., Wu, M., He, X., and Fisher, D. E. (2002) Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *J. Cell Biol.* 158, 1079–87.
- Widschwendter, M., and Jones, P. A. (2002) DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene* 21, 5462–5482.
- 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., Wijnholds, J., Jansen, G., Peters, G., and Borst, P. (2005) The Human Multidrug Resistance Protein MRP5 Transports Folates and Can Mediate Cellular Resistance against Antifolates. *Cancer Res.* 65, 4425–4430.
- Winer, E. P., Morrow, M., Osborne, C. K., Harris, J. R. (2001) Cancer of the breast. En: De vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles and Practice of Oncology.* 6a ed. Lippincott Williams Wilkins.
- 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, 1281–4.
- Wolfram, S., Wang, Y., and Thielecke, F. (2006) Anti-obesity effects of green tea: From bedside to bench. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 176–187.

Wolter, K. G., Verhaegen, M., Fernández, Y., Nikolovska-Coleska, Z., Riblett, M., Martin de la Vega, C., Wang, S., and Soengas, M. S. (2007) Therapeutic window for melanoma treatment provided by selective effects of the proteasome on Bcl-2 proteins. *Cell Death Differ.* 14, 1605–1616.

Wong, L. H., Prawira, A., Kaye, A. H., Hovens, C. M. (2009) Tumour angiogenesis: Its mechanism and therapeutic implications in malignant gliomas. *Journal of Clinical Neuroscience*, 16 (9) 1119-1130.

Wright, P. S., Saudek, V., Owen, T. J., Harbeson, S. L., and Bitonti, A. J. (1993) An echistatin C-terminal peptide activates GPIIb/IIIa binding to fibrinogen, fibronectin, vitronectin and collagen type I and type IV. *Biochem. J.* 263–7.

Wright, W. E., Pereira-Smith, O. M., and Shay, J. W. (1989) Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3088–92.

Wu, C., Arcand, M., Jansen, G., Zhong, M., Louk, T., Thomas, D. Y., Meloche, S., and Whiteway, M. (2003) Phosphorylation of the MAPKKK Regulator Ste50p in *Saccharomyces cerevisiae*: a Casein Kinase I Phosphorylation Site Is Required for Proper Mating Function. *Eukaryot. Cell* 2, 949–961.

Wu, A. H., Tseng, C.-C., Van Den Berg, D., and Yu, M. C. (2003) Tea intake, COMT genotype, and breast cancer in Asian-American women. *Cancer Res.* 63, 7526–9.

Wu, K.-J., Huang, J.-M., Zhong, H.-J., Dong, Z.-Z., Vellaisamy, K., Lu, J.-J., Chen, X.-P., Chiu, P., Kwong, D. W. J., Han, Q.-B., Ma, D.-L., and Leung, C.-H. (2017) A natural product-like JAK2/STAT3 inhibitor induces apoptosis of malignant melanoma cells. *PLoS One* 12, e0177123.

Wu, L.-Y., Juan, C.-C., Hwang, L. S., Hsu, Y.-P., Ho, P.-H., and Ho, L.-T. (2004) Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model. *Eur. J. Nutr.* 43, 116–124.

Wu, W. K., Wang, X. J., Cheng, A. S., Luo, M. X., Ng, S. S., To, K. F., Chan, F. K., Cho, C. H., Sung, J. J., Yu, J. (2013) Dysregulation and crosstalk of cellular signaling pathways in colon carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 86 (3) 251-277.

Xercavins, J., Salicru, S., Sabadell, M. D. (2003) Cancer de mama I. Epidemiologia y factores de riesgo. Prevencion primaria. Diagnostico precoz. Lesiones no palpables. Clinica y desarrollo. Clasificacion TNM. Biologia del carcinoma mamario (marcadores). En : Cabero L, editors, Tratado de Ginecologia, O. 1a ed. Madrid Editor. Medica Panam. SA 1692–1702.

- Xiaoguang, C., Hongyan, L., Xiaohong, L., Zhaodi, F., Yan, L., Lihua, T., and Rui, H. (1998) Cancer chemopreventive and therapeutic activities of red ginseng. *J. Ethnopharmacol.* 60, 71–78.
- Xie, T., Huang, F.-J., Aldape, K. D., Kang, S.-H., Liu, M., Gershenwald, J. E., Xie, K., Sawaya, R., and Huang, S. (2006) Activation of Stat3 in Human Melanoma Promotes Brain Metastasis. *Cancer Res.* 66, 3188–3196.
- Xu, W., and McArthur, G. (2016) Cell Cycle Regulation and Melanoma. *Curr. Oncol. Rep.* 18, 34.
- Xu, Y., Ho, C. T., Amin, S. G., Han, C., and Chung, F. L. (1992) Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res.* 52, 3875–9.
- 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, 211–6.
- Yamamoto T, Juneja LR, Chu DC, Kim M. (1997). Chemistry and Applications of Green Tea. *CRC Press LLC; Boca Raton, USA.*
- Yang, C. S., and Wang, Z. Y. (1993) Tea and cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 1038–49.
- Yang, C.S., Maliakal, P., and Meng, X. (2002). Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 42, 25-54.
- Yang, K., Wang, X., Zhang, H., Wang, Z., Nan, G., Li, Y., Zhang, F., Mohammed, M. K., Haydon, R. C., Luu, H. H., Bi, Y., and He, T.-C. (2016) The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies. *Lab. Invest.* 96, 116–136.
- YANG, T. T. C., and KOO, M. W. L. (1997) HYPOCHOLESTEROLEMIC EFFECTS OF CHINESE TEA. *Pharmacol. Res.* 35, 505–512.
- Yang, Y., Kim, S. C., Yu, T., Yi, Y.-S., Rhee, M. H., Sung, G.-H., Yoo, B. C., and Cho, J. Y. (2014) Functional Roles of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Macrophage-Mediated Inflammatory Responses. *Mediators Inflamm.* 2014, 1–13.
- Yarden, Y., and Ullrich, A. (1988) Growth Factor Receptor Tyrosine Kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 443–478.
- Yun, T.-K. Experimental and epidemiological evidence on non-organ specific cancer preventive effect of Korean ginseng and identification of active compounds. *Mutat. Res.* 523–524, 63–74.
- Zakraoui, O., Marcinkiewicz, C., Aloui, Z., Othman, H., Grépin, R., Haoues, M., Essafi, M., Srairi-Abid, N., Gasmi, A., Karoui, H., Pagès, G., and Essafi-Benkhadir, K. (2017) Lebein, a snake venom disintegrin, suppresses human colon cancer cells proliferation and tumor-induced angiogenesis through cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of VEGF expression. *Mol. Carcinog.* 56, 18–35.

- Zamora, P., Espinosa, E. Gonzalez, M. (2001) Cancer de mama. Clasificación concepto. *Medicine (Baltimore)*. 8, 3041–3049.
- Zaveri, N.T., 2001. Synthesis of a 3,4,5-trimethoxybenzoyl ester analogue of epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a potential route to the natural product green tea catechin, EGCG. *Organic Letters*. 3 (6), 843–846
- Zelensky, A. N., and Gready, J. E. (2005) The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J*. 272, 6179–6217.
- Zeng, C., Xing, R., Liu, J., Xing, F. (2015) Role of CSL-dependent and independent Notch signaling pathways in cell apoptosis. *Apoptosis*.
- 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., Zheng, Y., Deng, H., Liang, L., Peng, J. (2014) Aloperine induces G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis in HCT116 human colon cancer cells. *Int J Mol Med*. 33 (6) 1613-1620.
- Zhang, N., Yin, Y., Xu, S. J., Chen, W. S. (2008) 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules*. 2008; 13 (8): 1551-1569.
- Zhao, R., Russell, R.G., Wang, Y., Liu, L., Gao, F., Kneitz, B., Edelmann, 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.
- Zhong, L., Goldberg, M. S., Gao, Y. T., Hanley, J. A., Parent, M. E., and Jin, F. (2001) A population-based case-control study of lung cancer and green tea consumption among women living in Shanghai, China. *Epidemiology* 12, 695–700.
- Zhou, Q., Bennett, L. L., Zhou, S. (2016) Multifaceted ability of naturally occurring polyphenols against metastatic cancer. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 43 (4) 394-409.
- Zhou, Q., Hu, P., Ritter, M. R., Swenson, S. D., Argounova, S., Epstein, A. L., and Markland, F. S. (2000) Molecular Cloning and Functional Expression of Contortrostatin, a Homodimeric Disintegrin from Southern Copperhead Snake Venom. *Arch. Biochem. Biophys*. 375, 278–288.
- Zhou, Q., Nakada, M. T., Brooks, P. C., Swenson, S. D., Ritter, M. R., Argounova, S., Arnold, C., and Markland, F. S. (2000) Contortrostatin, a Homodimeric Disintegrin, Binds to Integrin $\alpha\beta 5$. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 267, 350–355.
- Zhou, Q., Sherwin, R. P., Parrish, C., Richters, V., Groshen, S. G., Tsao-Wei, D., and Markland, F. S. (2000) Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix* contortrix, inhibits breast cancer progression. *Breast Cancer Res. Treat*. 61, 249–60.
- Zittoun, J., (1993) Pharmacokinetics and in vitro studies of l-leucovorin Comparison with the d and d,l-leucovorin. *Ann. Oncol*, 4 (2) 1–5.