


# UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

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

**D. Román Martí Díaz**

**2024**




# UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

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

Autor: D. Román Martí Díaz

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

UNIVERSIDAD DE MURCIA

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

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

D./Dña. Román Martí Díaz

doctorando del Programa de Doctorado en

Biología Molecular y Biotecnología

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

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

y dirigida por,

| |
|---|
| D./Dña. José Neptuno Rodríguez López |
| D./Dña. Luis Sánchez del Campo Ferrer |
| D./Dña. |

**DECLARO QUE:**

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

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

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

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

En Murcia, a 18 de diciembre de 2023

Firmado por MARTI DIAZ ROMAN - ***5113** el día 18/12/2023 con un certificado emitido por AC FNMT Usuarios

Fdo.: Román Martí Díaz

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

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

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

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

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

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

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

*A mis padres, a mi hermano*

# CONTENIDO

PUBLICACIONES ..... I

ÍNDICE GENERAL ..... V

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS ..... XI

ABREVIATURAS ..... XV

CAPÍTULO 1. RESUMEN ..... 3

CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN ..... 11

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS ..... 119

CAPÍTULO 4. TÉCNICAS E INSTUMENTACIÓN ..... 123

CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... 223

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES ..... 309

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA ..... 315

# PUBLICACIONES

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

1. Martí-Díaz, R., Montenegro, M. F., Cabezas-Herrera, J., Goding, C. R., Rodríguez-López, J. N., & Sánchez-Del-Campo, L. (2020). Acriflavine, a Potent Inhibitor of HIF-1α, Disturbs Glucose Metabolism and Suppresses ATF4-Protective Pathways in Melanoma under Non-Hypoxic Conditions. *Cancers*, *13*, 102. https://doi.org/10.3390/cancers13010102

2. Sánchez-Del-Campo, L., Martí-Díaz, R., Montenegro, M. F., González-Guerrero, R., Hernández-Caselles, T., Martínez-Barba, E., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., Goding, C. R., & Rodríguez-López, J. N. (2021). MITF induces escape from innate immunity in melanoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, *40*, 117. https://doi.org/10.1186/s13046-021-01916-8

3. Montenegro, M. F., Martí-Díaz, R., Navarro, A., Tolivia, J., Sánchez-del-Campo, L., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2023). Targeting protein methylation in pancreatic cancer cells results in KRAS signaling imbalance and inhibition of autophagy. *Cell Death & Disease, 14*, 761. https://doi.org/10.1038/s41419-023-06288-9

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

1. Martí-Díaz, R., Cabezas-Herrera, J., Montenegro, M. F., González-Guerrero, R., Rodríguez-López, J. N. y Sánchez-Del-Campo, L. Regulación de ADAM10 mediada por MITF en la respuesta inmune contra el melanoma. Póster presentado en: IV Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca. 11 de noviembre de 2019, Murcia (España).
   Abstract disponible en:
   https://jornadaiv.imib.es/jornadaiv/printComunicacion.jsf?id=881

2. González-Guerrero, R., Martí-Díaz, R., Sánchez-Del-Campo, L., Montenegro, M. F. y Rodríguez-López, J. N. Tea-derivated catechins with antitumor properties. Póster presentado en: I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers. 22-23 de octubre de 2020, Murcia (España).
   Abstract disponible en:
   https://eventos.um.es/_files/_event/_41485/_editorFiles/file/BookOfAbstracts.pdf

**3.** Martí-Díaz, R., González-Guerrero, R., Montenegro, M. F., Sánchez-Del-Campo, L. y Rodríguez-López, J. N. Effect of metformina on melanoma cells. Póster presentado en: I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers. 22-23 de octubre de 2020, Murcia (España).

Abstract disponible en:

https://eventos.um.es/_files/_event/_41485/_editorFiles/file/BookOfAbstracts.pdf

**4.** Montenegro, M. F., Sánchez-Del-Campo, L., Martí-Díaz, R., Cabezas-Herrera, J. y Rodríguez-López, J. N. Control of protein methylation as a novel and efficient epigenetic strategy for the treatment of pancreatic cancer. Póster presentado en: V Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca. 23 de noviembre de 2020, Murcia (España).

Abstract disponible en:

https://jornadav.imib.es/jornadav/printComunicacion.jsf?id=941

**5.** Martí-Díaz, R., Montenegro, M. F., Cabezas-Herrera, J., Rodríguez-López, J. N. y Sánchez-Del-Campo, L. Acriflavine, a potent inhibitor of HIF-1 dimerization, decreases MITF expression and induces apoptosis in melanoma cells. Póster presentado en: V Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca. 23 de noviembre de 2020, Murcia (España).

Abstract disponible en:

https://jornadav.imib.es/jornadav/printComunicacion.jsf?id=951

**6.** Martí-Díaz, R., Montenegro, M. F., Cabezas-Herrera, J., C.R. Goding, Rodríguez-López, J. N. y Sánchez-Del-Campo, L. Acriflavine targets the MITF/ATF4 axis in melanoma. Póster presentado en: EACR 2021 Virtual Congress: Innovative Cancer Science. 9-12 de junio de 2021.

Abstract disponible en:

https://nwm.covr.be/cmPortal/searchable/EACR26/config/normal/redirectconfig/normal/redirectConference/EACR2021V#!abstractdetails/0000936720

**7.** Martí-Díaz, R., González-Guerrero, R., Montenegro, M. F., Rodríguez-López, J. N. y Sánchez-Del-Campo, L. MITF regula directamente ADAM10 en células de melanoma. Comunicación oral presentada en: VI Jornadas Doctorales 2021. 21-24 de junio de 2021, Murcia (España).

**8.** Martí-Díaz, R., Montenegro, M. F., González-Guerrero, R., T., Martínez-Barba, E., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., Goding, C. R., Rodríguez-López, J. N. y Sánchez-Del-Campo, L. ADAM10 is a direct MITF target gene in melanoma. Póster presentado en: 43º Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. 19-22 de julio de 2021, Barcelona (España).

Abstract disponible en:

https://sebbm.es/wp-content/uploads/BOOK-OF-ABSTRACTS-SEBBM-21.pdf

**9.** Martí-Díaz, R. MITF regula ADAM10 y modula la respuesta inmune contra el melanoma. Comunicación oral presentada en: III Congreso Interdisciplinar de Jóvenes Investigadores. 23-24 de septiembre de 2021, Murcia (España).
Abstract disponible en:
https://www.eumed.net/es/libros/libro/actas-jovenes-investigadores

**10.** Montenegro, M. F., Martí-Díaz, R., Navarro-Incio A. M., Tolivia-Fernández J., Cabezas-Herrera, J., Sánchez-Del-Campo, L. y Rodríguez-López, J. N. A hypomethylating treatment inhibits autophagy in pancreatic cancer cells and induces effective apoptosis. Póster presentado en: XIX Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular. 26-29 de octubre de 2021, Madrid (España).
Abstract disponible en:
https://orexco.congressus.es/xixcongresosebc/s5

**11.** Martí-Díaz, R., Montenegro, M. F., Cabezas-Herrera, J., Sánchez-Del-Campo, L. y Rodríguez-López, J. N. Generation of a CD47 knockout breast cancer cell line to study the role of CD47 during radiotherapy. Póster presentado en: VI Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca. 16 de noviembre de 2021, Murcia (España).
Abstract disponible en:
https://jornadavi.imib.es/jornadav/printComunicacion.jsf?id=1037

**12.** Martí-Díaz, R., González-Guerrero, R., Montenegro, M. F., Rodríguez-López, J. N. y Sánchez-Del-Campo, L. Generación de líneas celulares knock-out MITF, TFEB y TFE3 para el estudio de su implicación en la respuesta inmune frente al melanoma. Comunicación oral presentada en: VII Jornadas Doctorales 2022. 4-6 de julio de 2022, Murcia (España).

**13.** Martí-Díaz, R., Cabezas-Herrera, J., Rodríguez-López, J. N. y Sánchez-Del-Campo, L. Papel de las proteínas MiT/TFE en la respuesta inmune contra el melanoma. Póster presentado en: 44º Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. 6-9 de septiembre de 2022, Málaga (España).
Abstract disponible en:
https://congresos.sebbm.es/malaga2022/wp-content/uploads/Resumenes_final_3.pdf

**14.** Martí-Díaz, R., Montenegro, M. F., Sánchez-Del-Campo, L y Rodríguez-López, J. N. Metilación y autofagia en cáncer de páncreas. Comunicación oral presentada en: VIII Jornadas Doctorales 2023. 26-28 de junio de 2023, Murcia (España).

**15.** Martí-Díaz, R. Formación inicial del profesorado universitario: Aprendizajes y retos formativos. Póster presentado en las I Jornadas sobre formación inicial del profesorado universitario. 5 de julio de 2023, Murcia (España).

# ÍNDICE GENERAL

**CAPÍTULO 1. RESUMEN** ..... 3

1.1. RESUMEN ..... 3

1.2. SUMMARY ..... 6

**CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN** ..... 11

2.1. CÁNCER ..... 11

2.1.1. DEFINICIÓN ..... 11

2.1.2. BASES MOLECULARES DEL CÁNCER ..... 11

2.1.3. CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DEL CÁNCER ..... 14

2.1.3.1. Mantenimiento de la señalización proliferativa ..... 14

2.1.3.2. Evasión de los supresores de crecimiento ..... 15

2.1.3.3. Resistencia a la muerte celular ..... 18

2.1.3.4. Potencial de replicación ilimitado ..... 21

2.1.3.5. Inducción de angiogénesis ..... 23

2.1.3.6. Invasión y metástasis ..... 25

2.1.3.7. Desregulación del metabolismo energético ..... 29

2.1.3.8. Evitar la destrucción por el sistema inmune ..... 33

2.1.3.9. Desbloqueo de la plasticidad fenotípica ..... 35

2.1.3.10. Senescencia celular ..... 37

2.1.3.11. Inestabilidad genética y mutaciones ..... 38

2.1.3.12. Inflamación mediada por el tumor ..... 39

2.1.3.13. Reprogramación epigenética no mutacional ..... 40

2.1.3.14. Polimorfismos microbianos ..... 42

2.2. CÁNCER DE PIEL ..... 44

2.2.1. CÁNCER DE PIEL DE TIPO NO MELANOMA ..... 44

2.2.2. MELANOMA ..... 45

2.2.2.1. Melanocitos y melanoma ..... 46

2.2.2.2. Patogénesis del melanoma ..... 48

2.2.2.3. Epidemiología ..... 49

2.2.2.4. Factores de riesgo ..... 52

2.2.2.5. Bases moleculares del melanoma ..... 55

2.2.2.6. Diagnóstico del melanoma ..... 71

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

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

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

5.2. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ASOCIADO A MICROFTALMIA (MITF) INDUCE EL ESCAPE DEL SISTEMA INMUNE INNATO EN EL MELANOMA ..... 251

5.3. EL BLOQUEO DE LA METILACIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PÁNCREAS RESULTA EN EL DESEQUILIBRIO DE LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR KRAS Y LA INHIBICIÓN DE LA AUTOFAGIA..... 283

**CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES**..... 309

6.1. CONCLUSIONES ..... 309

6.2. CONCLUSIONS..... 311

**CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA**..... 315

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

**CAPÍTULO 1. RESUMEN** ..... 3

**CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN** ..... 11

Figura 2.1. Representación del ciclo celular y los complejos ciclina/CDK implicados ..... 16

Figura 2.2. Vía de señalización de la proteína supresora de tumores p53 ..... 18

Figura 2.3. Representación del mecanismo de activación molecular de las vías intrínsecas y extrínsecas de muerte celular programada ..... 21

Figura 2.4. Dinámica de la longitud de los telómeros en diversas células a lo largo del tiempo ..... 23

Figura 2.5. Cambio angiogénico que muestra la progresión de hiperplasia a tumor hipervascularizado ..... 25

Figura 2.6. Descripción general de la cascada metastásica ..... 26

Figura 2.7. Características, marcadores y contexto de la transición epitelio-mesénquima ..... 27

Figura 2.8. Efecto Warburg ..... 30

Figura 2.9. Diferencias en el consumo de glucosa entre células normales y cancerosas ..... 32

Figura 2.10. Representación esquemática de los principales puntos de control inmunitarios y de sus inhibidores ..... 35

Figura 2.11. Representación de diversos tipos de diferenciación celular en la patogénesis del cáncer ..... 37

Figura 2.12. Características distintivas del cáncer ..... 43

Figura 2.13. Representación gráfica de los estratos y tipos celulares de la epidermis ..... 45

Figura 2.14. Función de MITF en el proceso de producción de melanina en la piel humana ..... 48

Figura 2.15. Representación gráfica del modelo de desarrollo y progresión secuencial del melanoma ..... 49

Figura 2.16. Datos estimados tanto de muertes como de nuevos casos de melanoma por cada 100000 habitantes, a nivel mundial ..... 50

Figura 2.17. Datos estimados tanto de nuevos casos de cáncer en países más desarrollados como de las tasas de incidencia de melanoma en todo el mundo ..... 51

Figura 2.18. Datos estimados de las tasas de incidencia de melanoma de piel por cada 100000 habitantes en 2020, a nivel de Europa ..... 51

Figura 2.19. Mutaciones en genes clave y las vías de señalización subsiguientes en el desarrollo del melanoma ..... 59

Figura 2.20. Vía de señalización de Notch ..... 60

Figura 2.21. Esquema de la vía Wnt/β-catenina activada e inhibida ..... 62

Figura. 2.22. Diferentes isoformas de MITF ..... 64

Figura 2.23. Diagrama esquemático de los factores de transcripción que regulan positiva o negativamente el promotor MITF-M y su respuesta a las vías de señalización ..... 65

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

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

Figura 4.32. Esquema del proceso de retrotranscripción y termociclador *Mastercycler personal* ..... 189
Figura 4.33. Dispositivo *NanoDrop 2000* ..... 190
Figura 4.34. Diagrama de las etapas secuenciales durante el proceso de PCR ..... 192
Figura 4.35. Esquema de las condiciones empleadas para los experimentos de PCR convencional ..... 193
Figura 4.36. Aumento de fluorescencia del compuesto *SYBR Green I* tras su unión al ADN de doble cadena ..... 194
Figura 4.37. Equipo *QuantStudioTM 5 Flex* y representación de una curva de amplificación obtenida en una PCR en tiempo real ..... 194
Figura 4.38. Esquema de las condiciones empleadas para los experimentos de PCR en tiempo real ..... 197
Figura 4.39. Diagrama de las principales etapas de la inmunoprecipitación de cromatina .. 199
Figura 4.40. Elementos comunes que comparten los plásmidos de expresión ..... 203
Figura 4.41. Diagrama de los principales pasos que se llevan a cabo con el sistema el sistema *PiggyBac* para integrar una o varias secuencias de ADN en el genoma de la célula ..... 205
Figura 4.42. Diagrama simplificado del mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas9 .. 210
Figura 4.43. Estructura simplificada de los plásmidos utilizados para el silenciamiento estable de un gen mediante la técnica de CRISPR/Cas9 ..... 211
Tabla 4.2. Secuencia de los cebadores empleados para la amplificación por PCR de las regiones de unión de los ARNg y para la secuenciación de las mismas por el método de Sanger ..... 214
Figura 4.44. Diagrama de los principales pasos que ocurren con el kit *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis* ..... 215
**CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN** ..... 223
**CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES** ..... 309
**CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA** ..... 315

# ABREVIATURAS

**2-DG:** 2-deoxi-D-glucosa

**2DG6P:** 2-deoxi-D-glucosa-6-fosfato

**5-FU:** 5-fluorouracilo

**5-mTHF:** 5-metilenTHF

**A:** absorbancia

**$A_{230}$:** absorbancia a 230 nm

**$A_{260}$:** absorbancia a 260 nm

**$A_{280}$:** absorbancia a 280 nm

**AA:** antimicina A

**ABTS:** 2,2′-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

**ACTI:** área científica y técnica de investigación

**ADA:** adenosina desaminasa

**ADAM:** proteína desintegrina y metaloproteasa

**ADM:** metaplasia acinar-ductal

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNasa:** desoxirribonucleasa

**ADNc:** ADN copia

**ADP:** adenosín difosfato

**AdOx:** adenosina dialdehído

**AHCY:** S-adenosilhomocisteína hidrolasa

**AJCC:** *american joint committee on cancer*

**AKT/PKB:** proteína quinasa B

**ALT:** alargamiento alternativo de los telómeros

**ALX3:** *aristaless-like homeobox 3*

**AMPK:** proteína quinasa activada por AMP

**AMPc:** adenosín monofosfato cíclico

**APAF-1:** factor 1 activador de proteasa apoptótica

**APC:** células presentadoras de antígenos

**APC protein:** *adenomatous polyposis coli protein*

**ARAF:** *A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNasa:** ribonucleasa

**ARNg:** ARN guía

**ARNi:** ARN de interferencia

**ARNm:** ARN mensajero

**ASR:** tasa estandarizada por edad

**ATCC:** Colección Americana de Cultivos Tipo

**ATF2:** factor 2 de transcripción activador

**ATF4:** factor 4de transcripción activador

**ATP:** adenosín trifosfato

**ATPasa:** adenosín trifosfatasa

**Bak:** *Bcl-2 homologous antagonist killer*

**Bax:** proteína X asociada a Bcl-2

**Bcl-2:** *B-cell lymphoma 2*

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

**BH3:** dominio 3 homólogo de Bcl-2

**bHLH-ZIP:** cremallera básica hélice-bucle-hélice de leucina

**Bid:** dominio de interacción BH3

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

**BMI:** intensidad promedio de la señal de fondo

**BRAF:** protooncogén B-Raf

**BRCA1:** proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 1

**BRG1:** proteína del gen 1 relacionado con brahma

**BSA:** albúmina de suero bovino

**BTLA:** atenuador de linfocitos B y T

**CAF:** fibroblasto asociado al cancer

**CAIX:** anhidrasa carbónica IX

**CAMs:** moléculas de adhesión celular

**CAR:** receptor antígeno quimérico

**CBP:** proteína de unión a CREB

**CCL:** ligando de quimioquina (motivo C-C)

**CCND1:** ciclina D1

**CD:** *cluster of differentiation*

**CDK:** quinasa dependiente de ciclina

**CDK4:** quinasa 4 dependiente de ciclina

**CDKN1A:** inhibidor de quinasa 1A dependiente de ciclina

**CDKN1B:** inhibidor de quinasa 1B dependiente de ciclina

**CDKN2A:** inhibidor de quinasa 2A dependiente de ciclina

**CEA:** antígeno carcinoembrionario

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

**ChIP:** inmunoprecipitación de cromatina

**ChIP-Seq:** inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuenciación

**CK1α:** caseína quinasa 1-alfa

**COMTs:** catecol-O-metiltransferasas

**CPD:** dímeros de pirimidina de ciclobutano

**CQ:** cloroquina

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

**CRE:** elemento de respuesta al AMPc

**CREB:** proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc

**CRIF:** factor de intensidad recíproca del cromógeno

**CRISPR/Cas9:** sistema de edición del ADN

**CRTC:** coactivador transcripcional regulado por CREB

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

**Ct:** ciclo umbral

**ΔCt:** diferencia entre el Ct del gen de estudio y el Ct del gen de referencia

**ΔΔCt:** diferencia entre el ΔCt de la condición experimental control y el ΔCt de la condición experimental de estudio

**CTLA-4:** proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos

**DAB:** 3,3'-diaminobencidina

**DAPI:** 4’,6-diamidino-2-fenilindol

**DC:** células dendríticas

**DCT:** dopacromo tautomerasa

**DFS:** supervivencia libre de enfermedad

**DG:** 1,2-diacilglicerol

**DHF:** 7,8-dihidrofolato

**DHFR:** enzima dihidrofolato reductasa

**DIAPH1:** *protein 1 diaphanous homolog*

**DICER:** endorribonucleasa de ARN de doble cadena

**DIPY:** dipiridamol

**DISC:** complejo de señalización que induce la muerte

**DMEM:** medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DNMTs:** metiltransferasas de ADN

**dNTPs:** dexosirribonucleótidos trifosfato

**DPX:** dibutilftalato poliestireno xileno

**DRS:** receptores de muerte

**DSB:** rotura de doble hebra

**dTMP:** monofosfato de desoxitimidina

**dUMP:** monofosfato de desoxiuridina

**DVL:** d*isheveled*

**EC1:** dominio extracelular 1 de la E-cadherina

**ECAR:** tasa de acidificación extracelular

**ECG:** epicatequina galato

**ECM:** matriz extracelular

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**EGCG:** epigalocatequina galato

**EGF:** factor de crecimiento epidérmico

**EGFR:** receptor del factor de crecimiento epidérmico

**ELISA:** ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

**EMEM:** medio de cultivo Eagle mínimo esencial

**EMT:** transición epitelial-mesenquimal

**ENTs:** transportadores de nucleósidos

**ER:** retículo endoplásmico

**ERK:** quinasa regulada por señales extracelulares

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

**FD:** factor de dilución

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

**FECN:** factor de enriquecimiento citosólico nucleosomal

**FOXD3:** forkhead box D3

**FSC:** dispersión frontal de la luz

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

**G1:** fase G1 del ciclo celular

**G2:** fase G2 del ciclo celular

**G6P:** glucosa-6-fosfato

**G6PDH:** glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

**GAPDH:** gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

**GAP:** proteína activadora de GTPasa

**GCS:** gamma-glutamilcisteína sintetasa

**GDP:** difosfato de guanosina

**GEF:** factor de intercambio de nucleótidos de guanina

**GFP:** proteína verde fluorescente

**GLOBOCAN:** observatorio mundial del cáncer

**GLUT1:** transportador 1 de glucosa

**Gly:** glicina

**GRB2:** proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento

**GSK3β:** glucógeno sintasa quinasa 3-beta

**GTP:** trifosfato de guanosina

**GTPasa:** guanosín trifosfatasa

**hBRM:** proteína BRM humana

**HCQ:** hidroxicloroquina

**Hcy:** homocisteína

**HDAC1:** histona desacetilasa 1

**HDR:** reparación dirigida por homología

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

**HGF:** factor de crecimiento de hepatocitos

**HIF-1:** factor 1 inducible por hipoxia

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

**HMTs:** metiltransferasas de histonas

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

**HR:** sistema de recombinación homóloga

**HRAS:** *Harvey rat sarcoma virus*

**HRE:** elemento de respuesta a hipoxia

**HRP:** enzima peroxidasa de rábano

**HVEM:** mediador de entrada de herpesvirus

**HVR:** región hipervariable

**IAPs:** inhibidores de las proteínas de la apoptosis

**IB:** tampón de incubación

**$IC_{50}$:** la mitad de la concentración máxima inhibidora

**IDO:** indoleamina 2, 3-dioxigenasa

**IF-α 2b:** interferón alfa 2b

**IFN:** interferón

**IFNγ:** interferón gamma

**IgG:** inmunoglobulina G

**IHQ:** inmunohistoquímica

**IL:** interleucina

**IMIB:** instituto murciano de investigación biosanitaria

**iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible

**IP:** ioduro de propidio

**IP3:** inositol trifosfato

**IPMN:** neoplasia mucinosa pancreática intraductal

**IR:** radiación ionizante

**IRF4:** factor 4 regulador de interferon

**ITR:** repetición terminal invertida

**IVIS:** sistema de imagen *in vivo*

**JNK:** quinasa Jun N-terminal

**KIT:** *proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*

**KO:** *knockout*

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

**LAIB:** laboratorio de investigación biosanitaria

**LB:** medio *Luria-Bertani*

**LDHA:** lactato deshidrogenasa A

**LEF:** factor potenciador linfoide

**LKB1:** quinasa hepática 1

**LMW:** bajo peso molecular

**lncARN:** ARN largos no codificantes

**Luc:** luciferasa

**MACS:** separación magnética de células

**MAML:** m*astermind-like protein*

**MAPK:** proteína quinasa activada por mitógenos

**MAT2A:** metionina adenosiltransferasa 2A

**MATs:** metionina adenosiltransferasas

**MC1R:** receptor 1 de melanocortina

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

**MCN:** neoplasia quística mucinosa

**MCT1:** transportador 1 de monocarboxilato

**MDM2:** *murine double minute 2*

**MDM4:** *murine doble minute 4*

**MDSC:** células supresoras derivadas de células mieloides

**MEK:** quinasa activada por mitógenos que activa a ERK

**MET:** transición mesenquimal-epitelial

**MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad

**miARN:** micro ARN

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

**MITF:** factor de transcripción asociado a microftalmia

**MLANA/MART-1:** proteína melan-A

**MOMP:** permeabilización de la membrana externa mitochondrial

**MRAS:** homólogo del oncogén RAS muscular

**MRI:** imagen de resonancia magnética

**MS:** metionina sintasa

**α-MSH:** hormona estimulante de los melanocitos alfa

**MT:** metiltransferasas

**MTHFR:** metilentetrahidrofolato reductasa

**mTOR:** proteína diana de la rapamicina en mamíferos

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

**MTX:** metotrexato

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

**NAD:** nicotinamida adenina dinucleótida

**NAD+:** nicotín adenín dinucleótido oxidado

**NADH:** nicotín adenín dinucleótido reducido

**NADP+:** nicotín adenín dinucleótido fosfato oxidado

**NADPH:** nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido

**NCI:** instituto nacional de cáncer (Estados Unidos)

**NECD:** dominio extracelular de Notch

**NFAT:** factor nuclear de células T activadas

**NICD:** dominio intracelular de Notch

**NK:** *natural killer*

**NKG2D:** *natural killer group 2D*

**NF1:** neurofibromina

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

**NHEJ:** sistema de unión de extremos no homólogos

**NO:** óxido nítrico

**Noxa:** activador de la NADPH oxidasa

**NRAS:** *neuroblastoma ras viral oncogene homolog*

**OC-2:** *onecut 2*

**OCR:** tasa de consumo de oxígeno

**OS:** supervivencia general

**OxPhos:** fosforilación oxidativa

**$p14_{ARF}$:** *alternative reading frame p14*

**$p15_{INK4b}$:** inhibidor B de CDK4

**$p16_{INK4a}$:** inhibidor A de CDK4

**$p21_{CIP1}$:** *CDK-interacting protein 1*

**$p27_{KIP1}$:** inhibidor de CDKN1B

**PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida

**PAM:** motivo adyacente protoespaciador (secuencia de reconocimiento)

**PanIN:** neoplasia intraepitelial pancreática

**PARP:** polimerasa de poli-(ADP-ribosa)

**PAX3:** *paired box 3*

**PBS:** tampón fosfato salino

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

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PD-1:** proteína 1 de muerte celular programada

**PDAC:** adenocarcinoma ductal pancreático

**PDH:** piruvato deshidrogenasaPKA: proteína quinasa A

**PD-L1:** ligando 1 de muerte programada

**PD-L2:** ligando 2 de muerte programada

**PER:** tasa de salida de protones

**PET:** tomografía de emisión de positrones

**PGC1α:** *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*

**PI3P:** fosfatidilinositol 3-fosfato

**PI3K:** fosfatidilinositol 3-quinasa

**PIP2:** fosfatidilinositol-4,5-difosfato

**PIP3:** fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

**PKA:** proteína quinasa A

**PKC:** proteína quinasa C

**PLC:** fosfolipasa C

**PMEL17:** proteína premelanosoma

**POMC:** proopiomelanocortina

**PP2A:** proteína fosfatasa 2A

**pRB:** proteína del retinoblastoma

**PRMTs:** metiltransferasas de proteínas

**PTEN:** homólogo de fosfatasa y tensina

**PTM:** modificación post-traduccional

**Puma:** modulador de apoptosis regulado positivamente por p53

**PVDF:** fluoruro de polivinilideno

**qPCR:** PCR cuantitativa

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

**RAL-A/B:** proteína A/B similar a RAS

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

**RB1:** proteína del retinoblastoma 1

**RBD:** dominio de unión a la proteína RAS

**REDECAN:** red española de registros de cáncer

**RFP:** proteína roja fluorescente

**RMPI:** medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*

**RMTs:** metiltransferasas de ARN

**ROI:** región de interés

**Rot:** rotenona

**RT:** retrotranscripción o transcripción inversa

**RTK:** receptor de tirosina quinasa

**S:** fase S del ciclo celular

**SAH:** S-adenosilhomocisteína

**SAM:** S-adenosilmetionina

**SASP:** fenotipo secretor asociado a la senescencia

**SB:** tampón de muestra desnaturalizante

**SBF:** suero bovino fetal

**SCF:** factor de células madre

**SCT:** Sección de Cultivo de Tejidos

**SD:** desviación estándar

**SDS:** docedilsulfato sódico

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

**Ser:** serina

**SHMT:** serina hidroximetiltransferasa

**SIK:** quinasa inducible por sal

**siRNA:** pequeño ARN de interferencia

**SIRT1:** histona desacetilasa dependiente de NAD

**SMAC:** segundo activador de caspasa derivado de mitocondrias

**SMAD:** *mothers against decapentaplegic*

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

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

**SSB:** rotura de hebra sencilla

**SSC:** dispersión lateral de la luz

**STAT3:** transductor de señal y activador de la transcripción 3

**Suv39h1:** histona-lisina N-metiltransferasa

**T:** transmitancia

**TAC:** tomografía axial computarizada

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

**TAM:** macrófagos asociados a tumores

**TBS:** solución salina tamponada con Tris

**TCA cycle:** ciclo del ácido tricarboxílico

**TCF:** factor de células T

**TCGA:** base de datos del genoma del cáncer

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

**TERT:** transcriptasa inversa de telomerasa

**TFE3:** factor de transcripción de unión al potenciador IGHM 3

**TFEB:** factor de transcripción EB

**TFEC:** factor de transcripción EC

**TGF-β:** factor de crecimiento transformante beta

**THF:** 5,6,7,8-tetrahidrofolato

**Thr:** treonina

**TIL:** linfocitos infiltrantes tumorales

**TLS:** estructuras linfoides terciarias

**$T_m$:** temperatura de fusión

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

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

**TNF:** factor de necrosis tumoral

**TNF-α:** factor de necrosis tumoral alfa

**TNFR1:** receptor 1 del factor de necrosis tumoral

**TP53:** proteína tumoral p53

**TRAIL:** ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF

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

**TS:** timidilato sintasa

**T-VEC:** *talimogene laherparepvec*

**TYR:** tirosinasa

**TYRP1:** proteína 1 relacionada con la tirosinasa 1

**UM:** Universidad de Murcia

**UCSC:** Universidad de California en Santa Cruz

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

**UV:** ultravioleta

**UV-VIS:** ultravioleta-visible

**VEGF:** factor de crecimiento vascular endotelial

**VEGFR:** receptor del factor de crecimiento vascular endotelial

**Wnt:** *wingless-related integration site*

**XIAP:** proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma

# Capítulo 1

## Resumen

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

Rafael Nadal

# CAPÍTULO 1. RESUMEN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# Capítulo 2

## Introducción

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

Kobe Bryant

# CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN

## 2.1. CÁNCER

### 2.1.1. DEFINICIÓN

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

### 2.1.2. BASES MOLECULARES DEL CÁNCER

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Alteraciones epigenéticas**

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

### 2.1.3. CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DEL CÁNCER

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

#### 2.1.3.1. Mantenimiento de la señalización proliferativa

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

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

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

#### 2.1.3.2. Evasión de los supresores de crecimiento

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

## Vía supresora de pRb

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

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

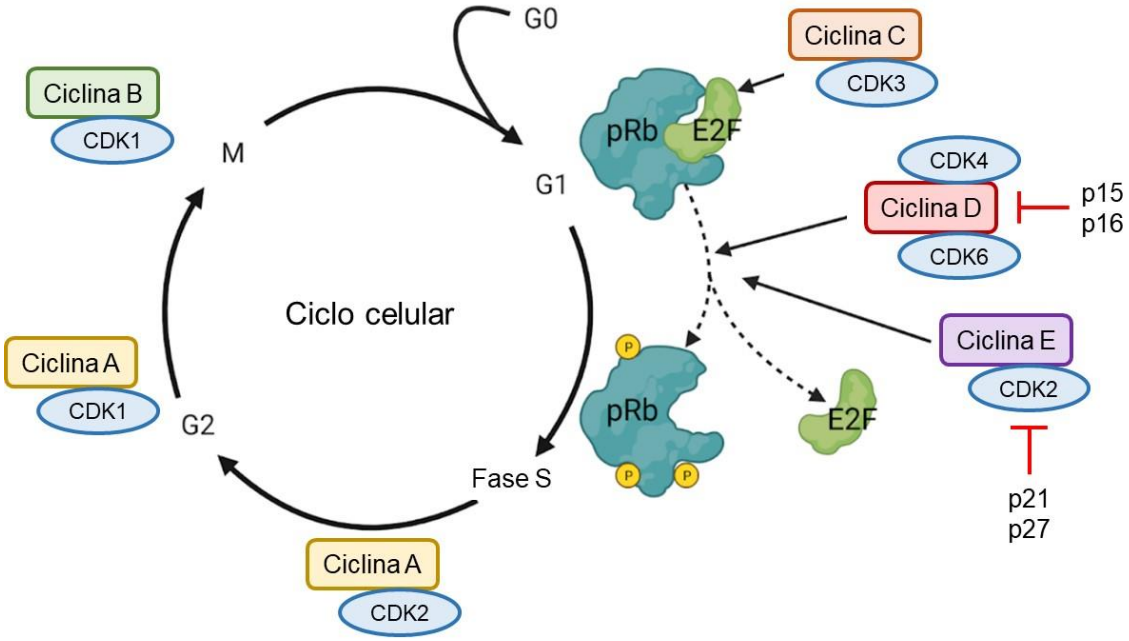



**Figura 2.1.** Representación del ciclo celular y los complejos ciclina/CDK implicados. CDK: quinasa dependiente de ciclina, E2F: factor de transcripción E2F, pRb: proteína del retinoblastoma. Imagen basada en un esquema de Giacinti & Giordano, 2006.

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

**Vía supresora de p53**

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

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

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

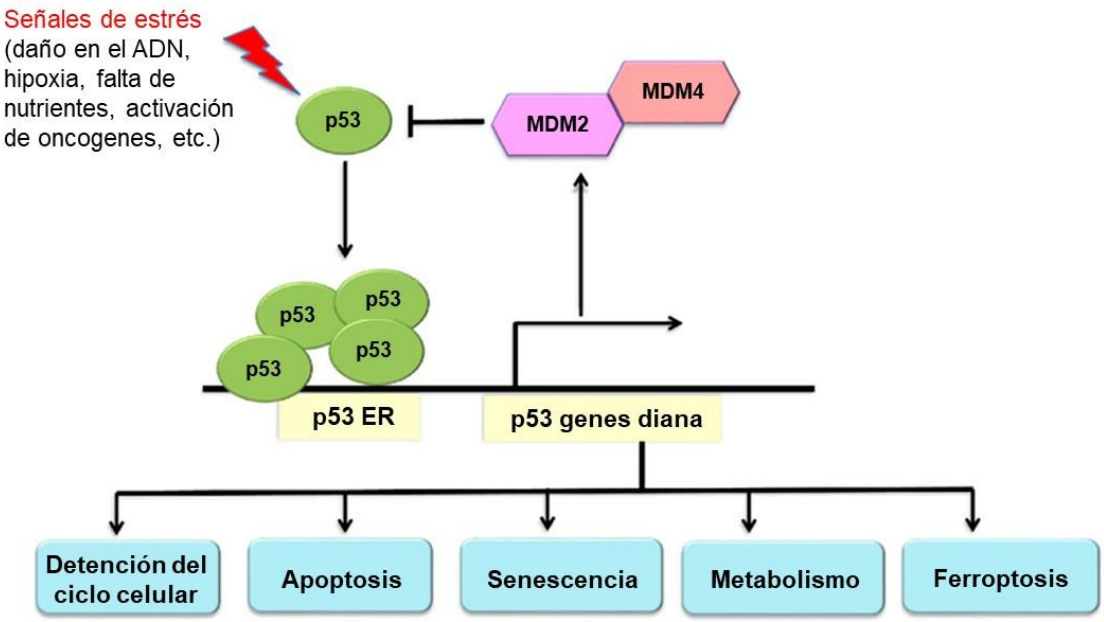



**Figura 2.2.** Vía de señalización de la proteína supresora de tumores p53. p53 ER: Elemento de respuesta (o secuencia de reconocimiento) de p53. Imagen traducida de Liu et al., 2020.

### 2.1.3.3. Resistencia a la muerte celular

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

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

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

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

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

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

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

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

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

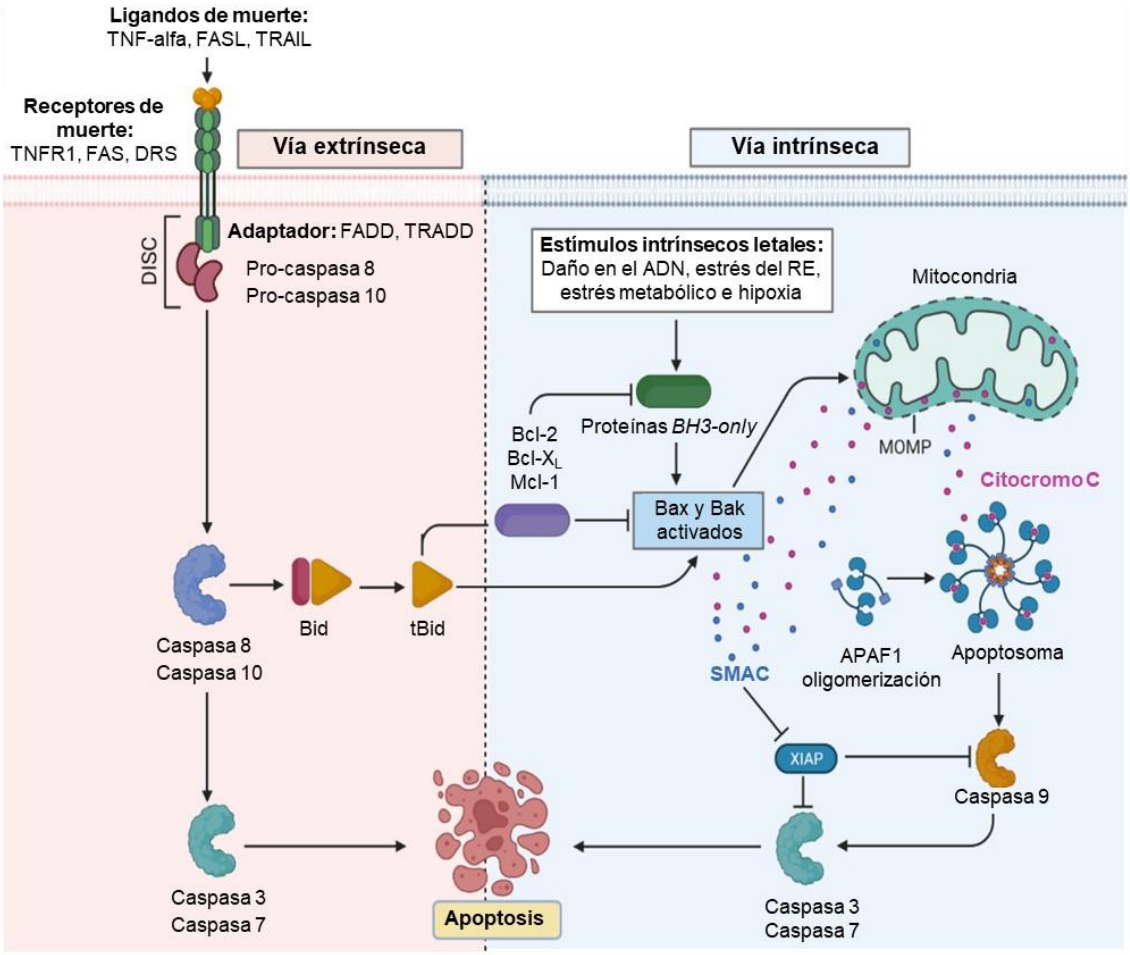



**Figura 2.3.** Representación del mecanismo de activación molecular de las vías intrínsecas y extrínsecas de muerte celular programada. APAF-1: factor 1 activador de proteasa apoptótica, Bak: Antagonista homólogo de Bcl-2, Bax: Bcl- 2 asociada a proteína X, Bid: dominio de interacción BH3, DISC: complejo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

### 2.1.3.4. Potencial de replicación ilimitado

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

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

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

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

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

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

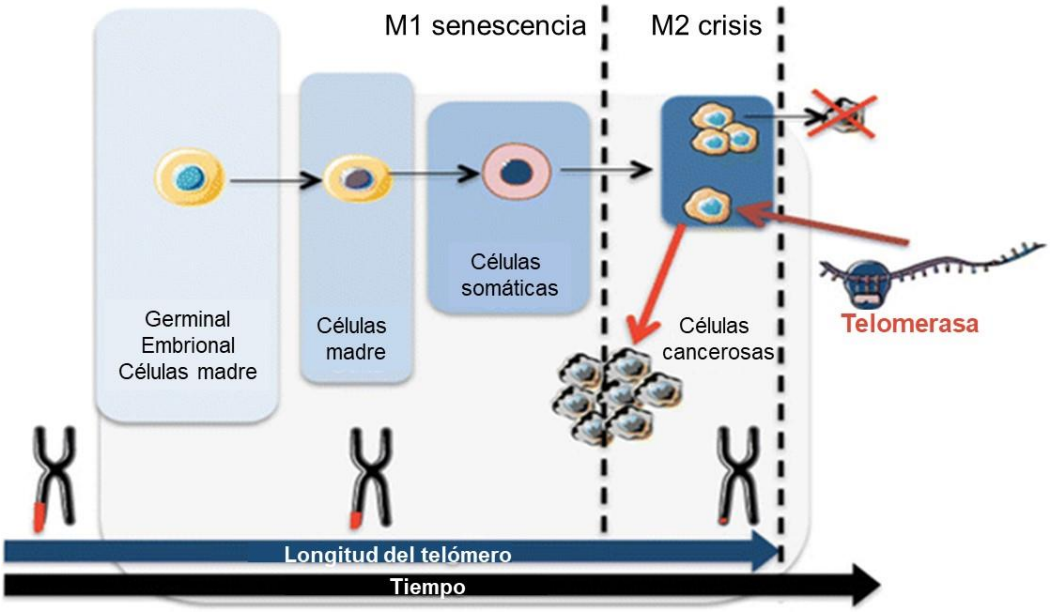



**Figura 2.4.** Dinámica de la longitud de los telómeros en diversas células a lo largo del tiempo. Imagen traducida de Leão et al., 2018.

### 2.1.3.5. Inducción de angiogénesis

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

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

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

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

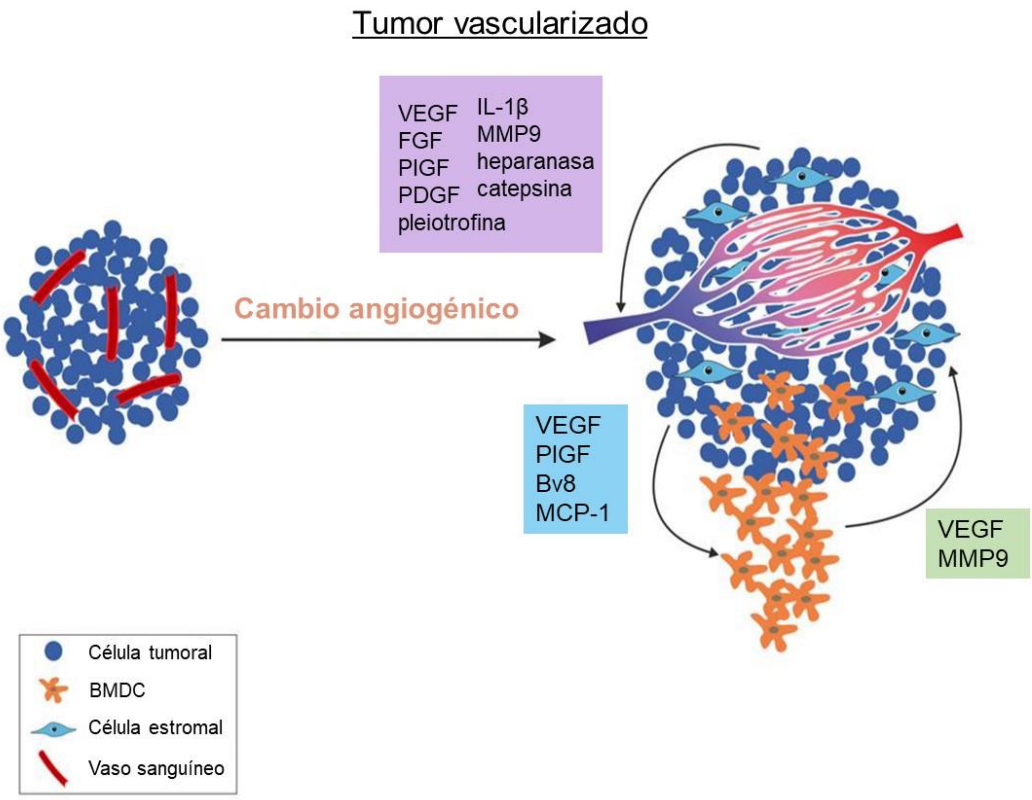



**Figura 2.5.** Cambio angiogénico que muestra la progresión de hiperplasia a tumor hipervascularizado. Se representan los factores proangiogénicos y proteasas secretados por las propias células tumorales (recuadro violeta) y las células del sistema inmunitario reclutadas en el sitio del tumor (recuadro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

### 2.1.3.6. Invasión y metástasis

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

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

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

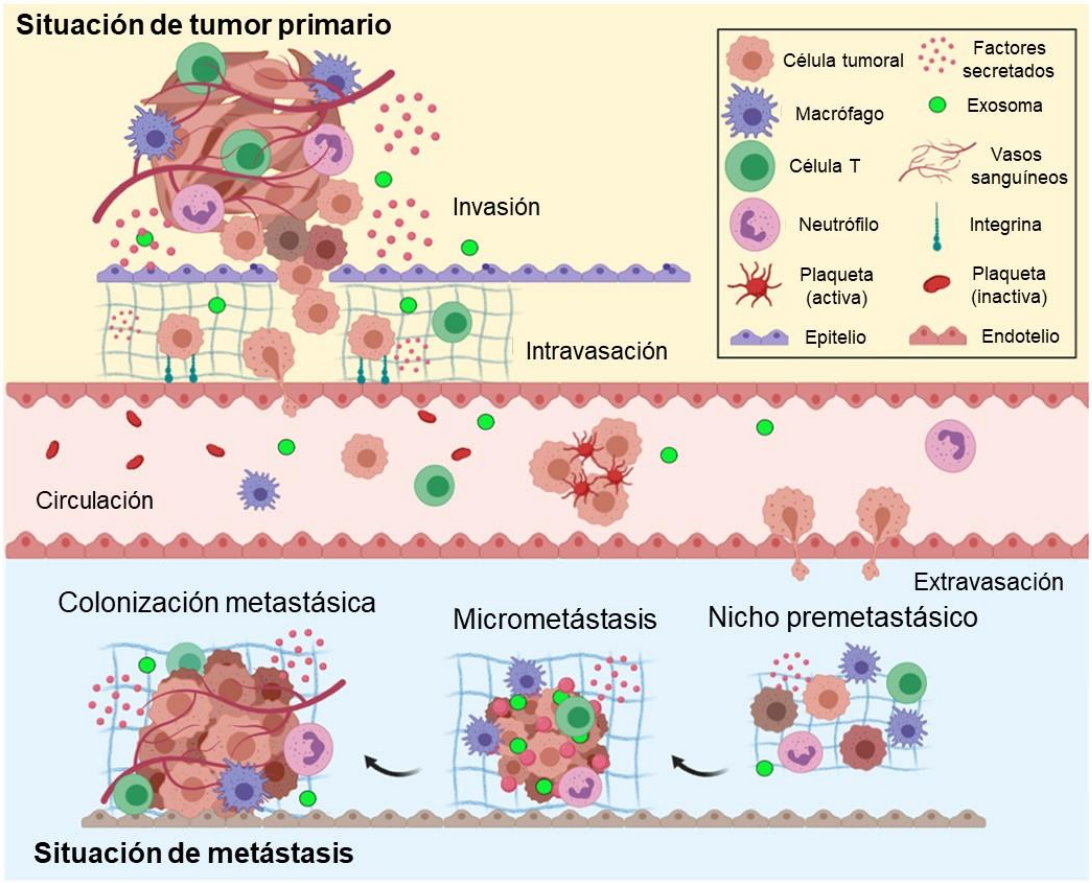



**Figura 2.6.** Descripción general de la cascada metastásica. Se representan los cinco pasos clave de la metástasis: invasión, intravasación, circulación, extravasación y colonización. Imagen traducida de Fares et al., 2020.

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

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

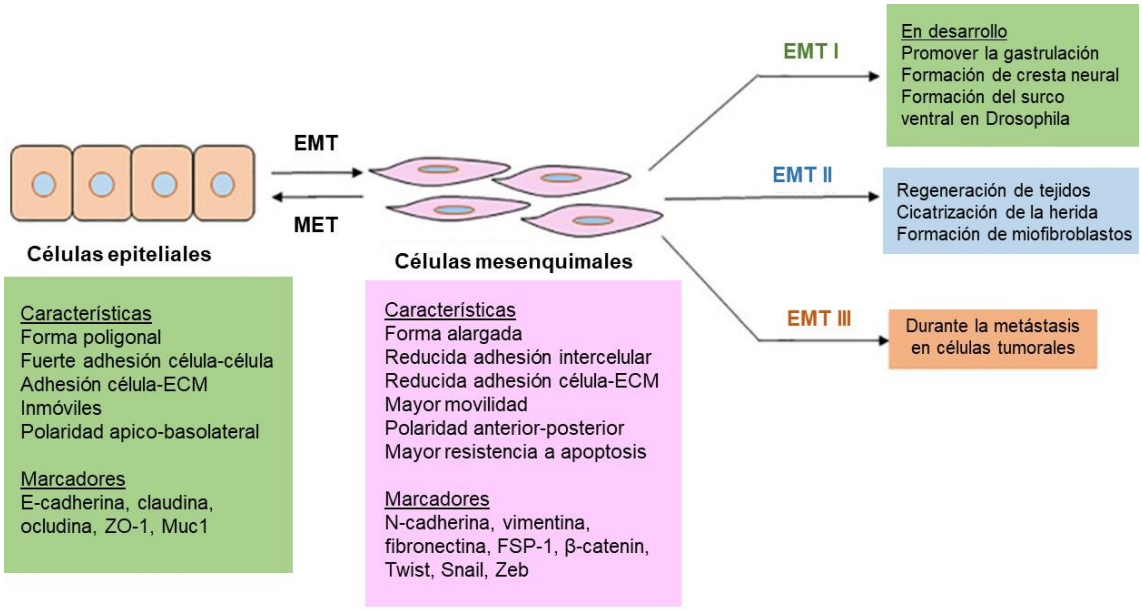



**Figura 2.7.** Características, marcadores y contexto de la transición epitelio-mesénquima. ECM: matriz extracelular, EMT: transición epitelio-mesénquima, MET: transición mesénquima-epitelio. Imagen adaptada de Debnath et al., 2021.

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

Las células con capacidad invasiva o metastásica presentan alteraciones en varias clases de proteínas involucradas en la unión de las células a su entorno tisular. Estas proteínas incluyen moléculas de adhesión célula a célula (CAMs, *cell adhesion molecules*), como las cadherinas dependientes del calcio y las inmunoglobulinas, así como las integrinas, que conectan las células con la matriz extracelular. La alteración más comúnmente observada en las interacciones célula-entorno en el cáncer involucra a la E-cadherina, una molécula responsable de las uniones célula-célula en tejidos epiteliales y que contribuye a su morfología laminar al unirse a los dominios extracelulares EC1 de moléculas de E-cadherina de células adyacentes. En la mayoría de los cánceres epiteliales, parece que se pierde la función de esta molécula debido a diversos mecanismos, como la inactivación mutacional de los genes de la E-cadherina, la represión transcripcional o la proteólisis del dominio extracelular de la cadherina (Wong et al., 2018). Por tanto, la pérdida de la expresión de E-cadherina se considera un paso crucial en la adquisición de un fenotipo invasivo. Por el contrario, en las células tumorales que han experimentado la transición EMT, se observa la expresión de moléculas como N-cadherina, que está asociada con la capacidad de migración. Además de las alteraciones en las moléculas de adhesión, las células con capacidad invasiva y metastásica experimentan cambios en las integrinas que presentan en su superficie. En general, estas células reemplazan las integrinas características del tejido epitelial, como las α6β4 que se unen a la membrana basal, por otras integrinas cuya expresión parece estar asociada a la degradación de la matriz extracelular (Lamouille et al., 2014). La degradación de la matriz extracelular es llevada a cabo por enzimas proteolíticas extracelulares llamadas proteasas (Saitoh, 2018). Estas proteasas pueden ser sintetizadas tanto por las propias células tumorales como por células del microambiente, como los macrófagos asociados al tumor (Kawata et al., 2012). Además, estas células del sistema inmunitario pueden ser reclutadas a través de la liberación de citoquinas. Por lo tanto, se ha visto que la capacidad de invasión y metástasis es un proceso que requiere de la participación de otros componentes del microambiente tumoral.

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

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

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

#### 2.1.3.7. Desregulación del metabolismo energético

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

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

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

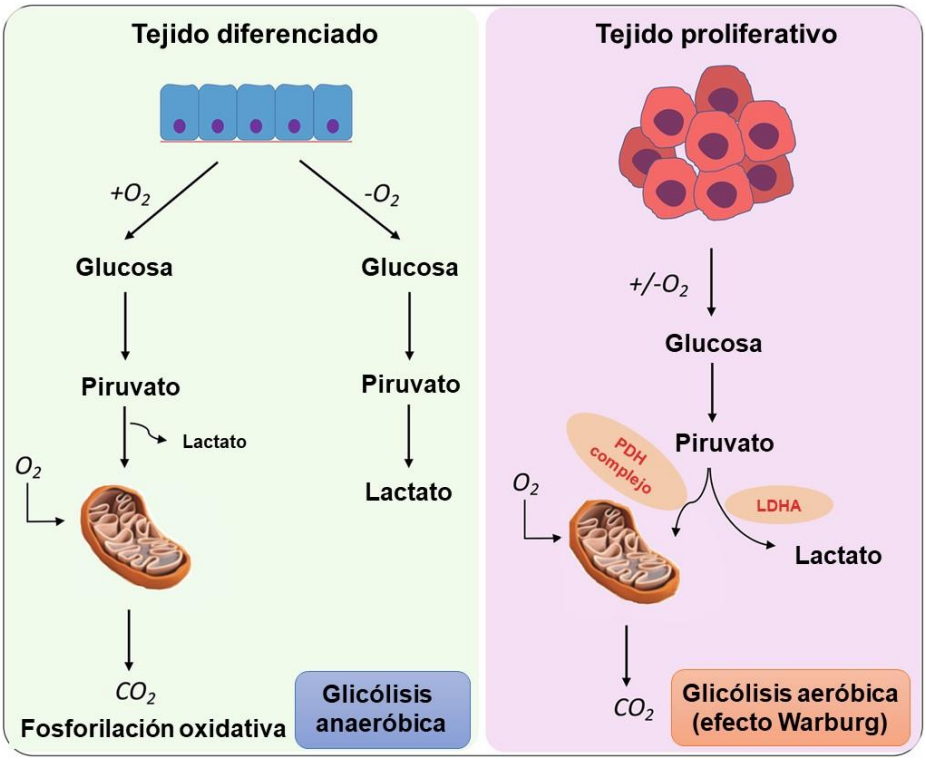



**Figura 2.8.** Efecto Warburg. Respiración celular en tejido diferenciado normal (izquierda) en comparación con el efecto Warburg en tejido proliferativo (derecha). LDHA: lactato deshidrogenasa A, PDH complex: complejo piruvato deshidrogenasa. Imagen traducida de Bose et al., 2021.

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

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

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

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

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

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

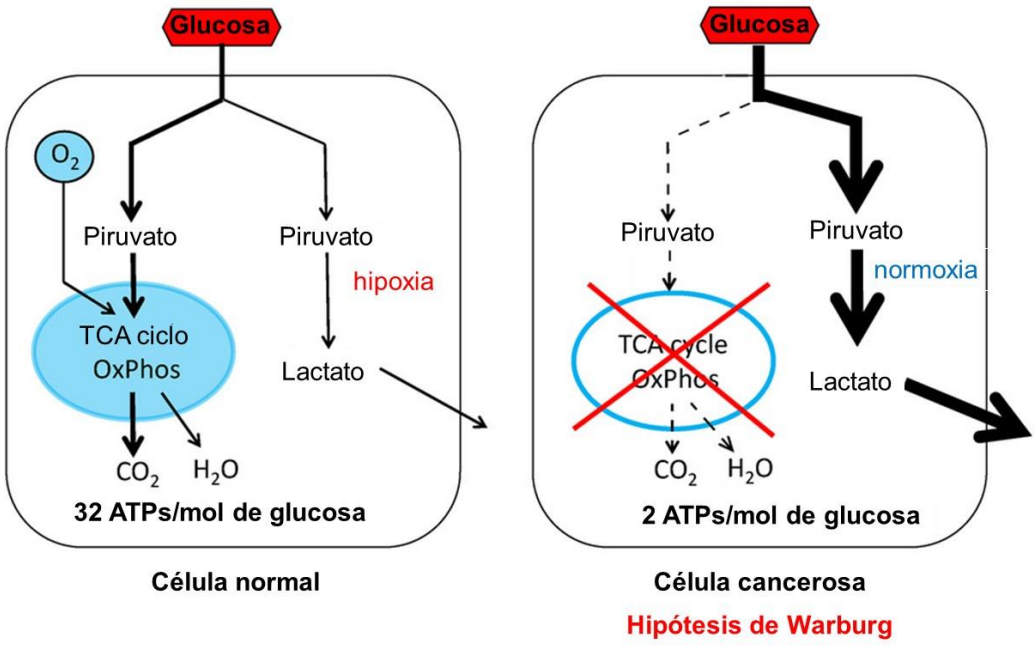



**Figura 2.9.** Diferencias en el consumo de glucosa entre células normales y cancerosas. OxPhos: fosforilación oxidativa. TCA ciclo: ciclo del ácido tricarboxílico. Imagen traducida de Vaupel & Multhoff, 2021.

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

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

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

#### 2.1.3.8. Evitar la destrucción por el sistema inmune

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

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

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

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

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

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

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

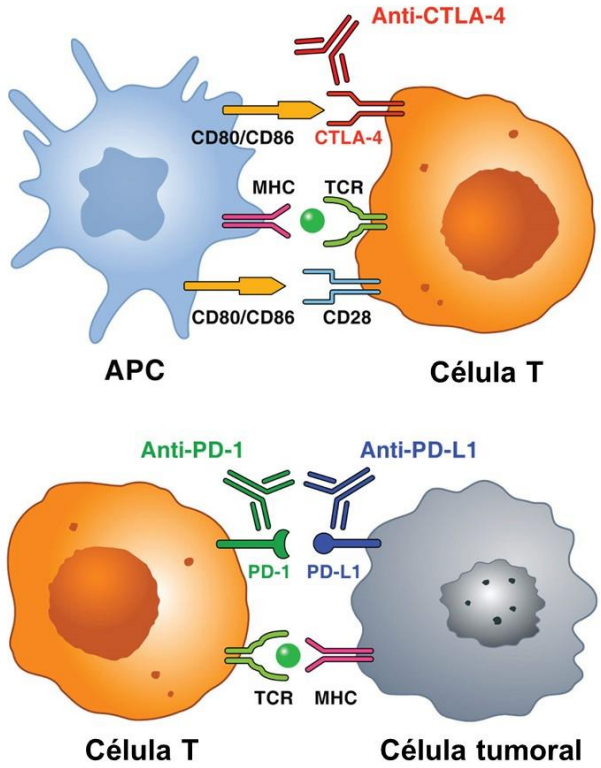



**Figura 2.10.** Representación esquemática de los principales puntos de control inmunitarios y de sus inhibidores. Imagen traducida de Poto et al., 2022.

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

#### 2.1.3.9. Desbloqueo de la plasticidad fenotípica

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

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

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

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

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

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

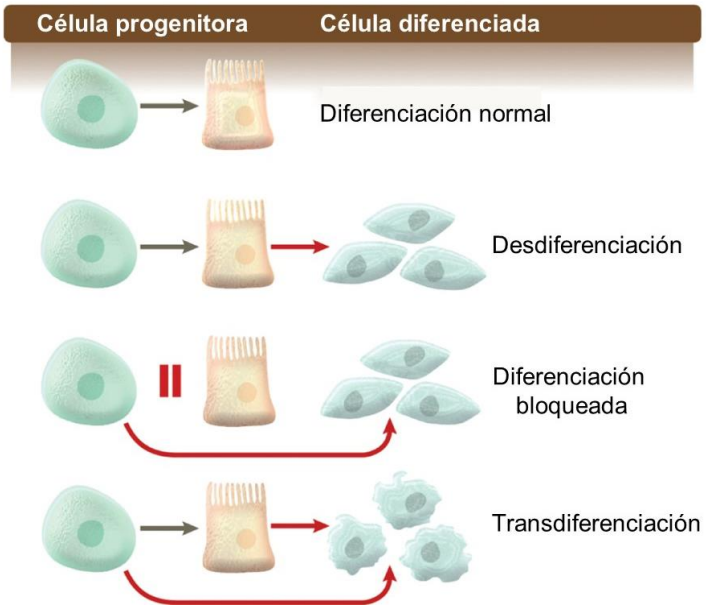



**Figura 2.11.** Representación de diversos tipos de diferenciación celular en la patogénesis del cáncer. Imagen traducida de Hanahan, 2022.

### 2.1.3.10. Senescencia celular

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

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

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

#### 2.1.3.11. Inestabilidad genética y mutaciones

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

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

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

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

#### 2.1.3.12. Inflamación mediada por el tumor

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

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

#### 2.1.3.13. Reprogramación epigenética no mutacional

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

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

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

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

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

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

#### 2.1.3.14. Polimorfismos microbianos

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

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

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

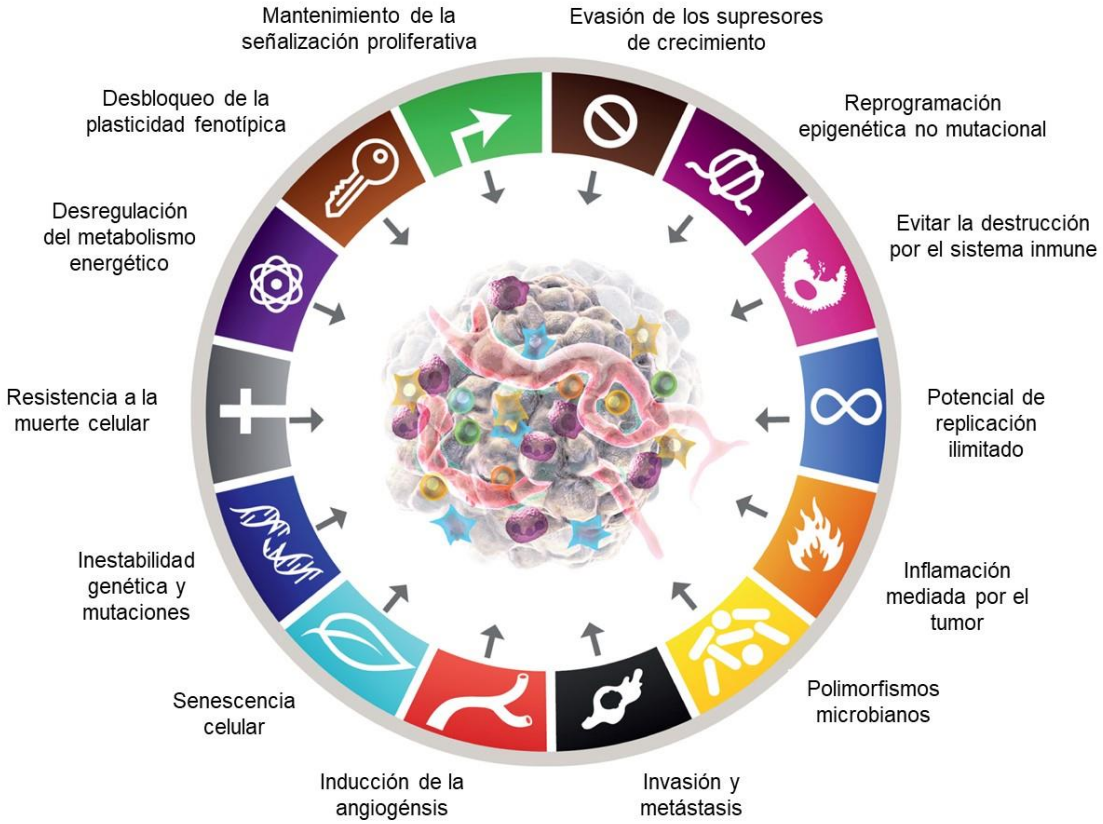



**Figura 2.12.** Características distintivas del cáncer. Características moleculares, bioquímicas y celulares que las células tumorales adquieren en la mayoría de las situaciones. Imagen traducida de Hanahan, 2022.

## 2.2. CÁNCER DE PIEL

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

### 2.2.1. CÁNCER DE PIEL DE TIPO NO MELANOMA

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

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

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

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

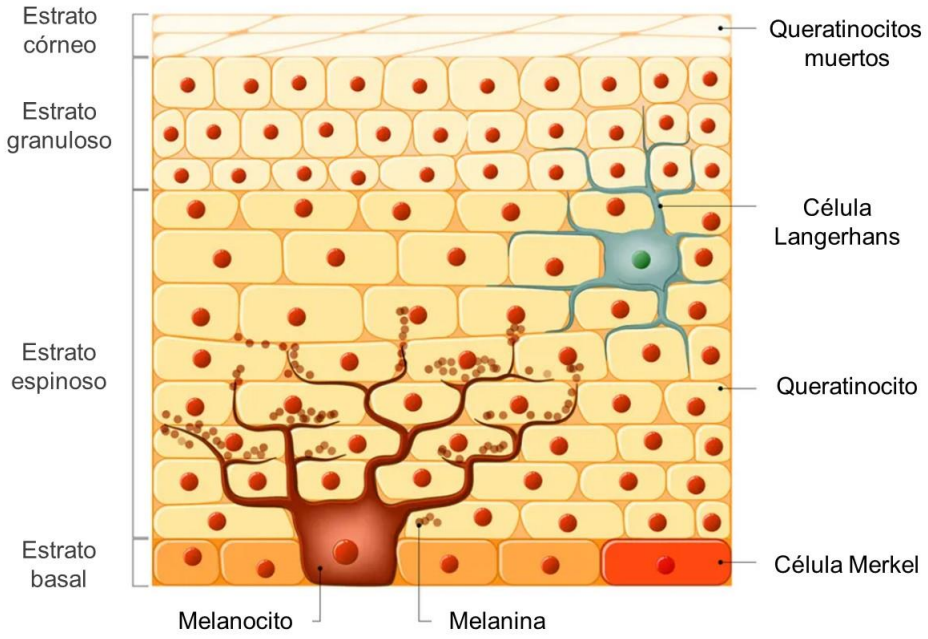



**Figura 2.13.** Representación gráfica de los estratos y tipos celulares de la epidermis (capa externa de la piel). Imagen traducida de la página web *Vector Stock*.

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

### 2.2.2. MELANOMA

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

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

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

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

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

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

#### 2.2.2.1. Melanocitos y melanoma

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

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

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

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

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

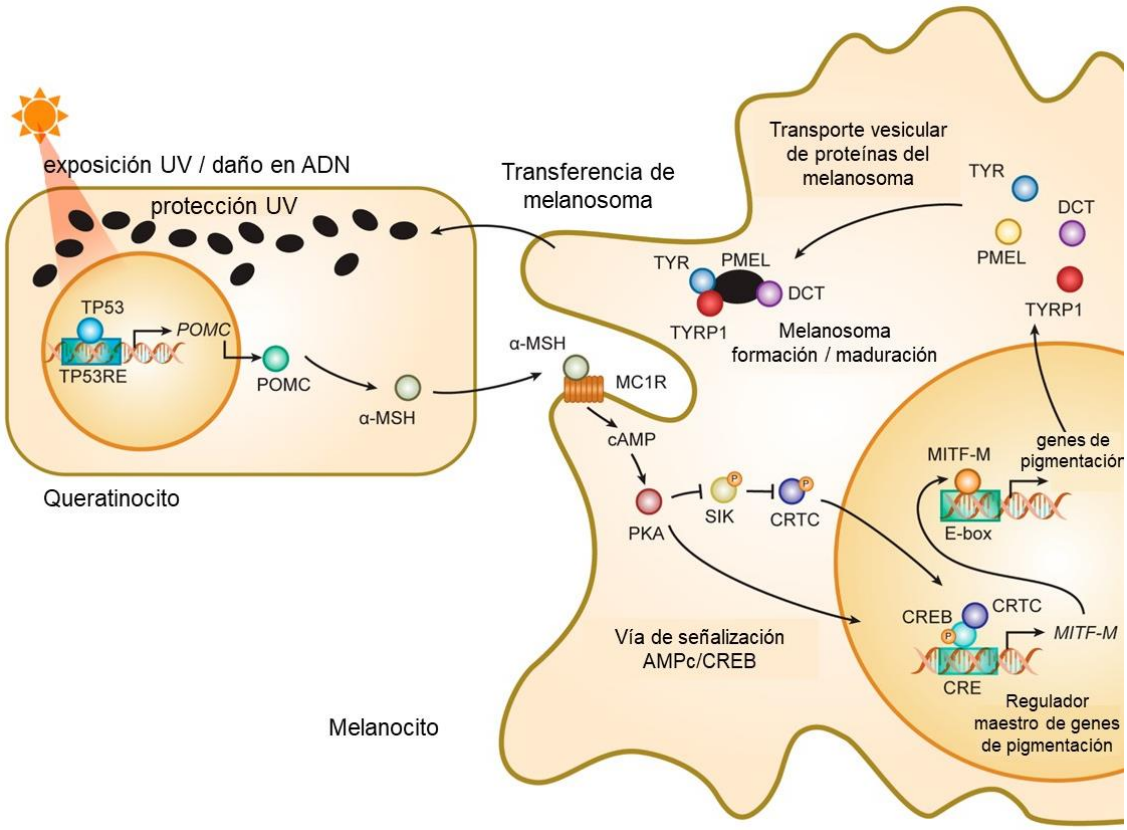



**Figura 2.14.** Función de MITF en el proceso de producción de melanina en la piel humana. AMPc: adenosín monofosfato cíclico, CRE: elemento de respuesta al AMPc, CREB: proteína de unión a CRE, CRTC: coactivador transcripcional regulado por CREB, MC1R: receptor de melanocortina 1, MITF: factor de transcripción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

### 2.2.2.2. Patogénesis del melanoma

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

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

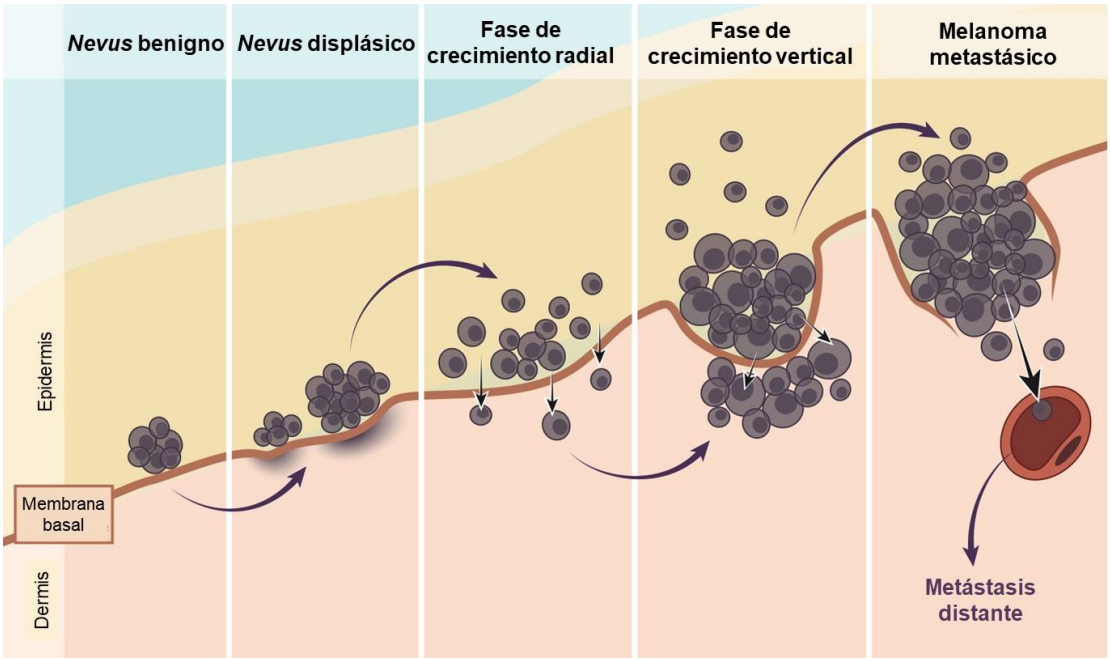



**Figura 2.15.** Representación gráfica del modelo de desarrollo y progresión secuencial del melanoma. Imagen adaptada de la página web *McMaster Pathophysiology Review*.

### 2.2.2.3. Epidemiología

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

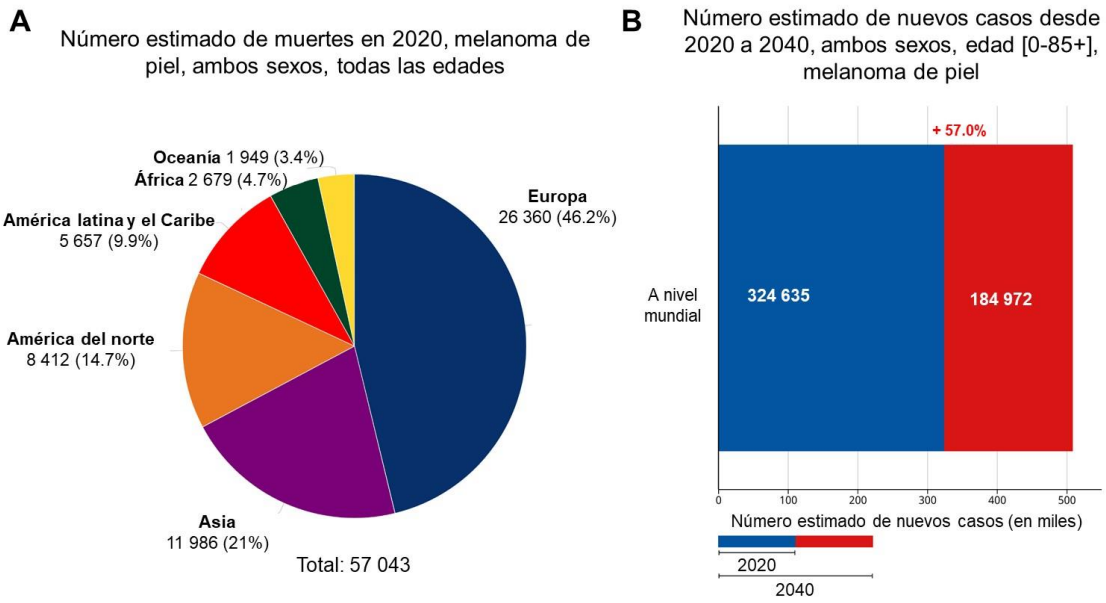



**Figura 2.16.** Datos estimados tanto de muertes como de nuevos casos de melanoma por cada 100000 habitantes, a nivel mundial. **A)** Número estimado de muertes por melanoma en 2020. **B)** Número estimado de nuevos casos de melanoma desde 2020 hasta 2040. Imagen obtenida y traducida de GLOBOCAN el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

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

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

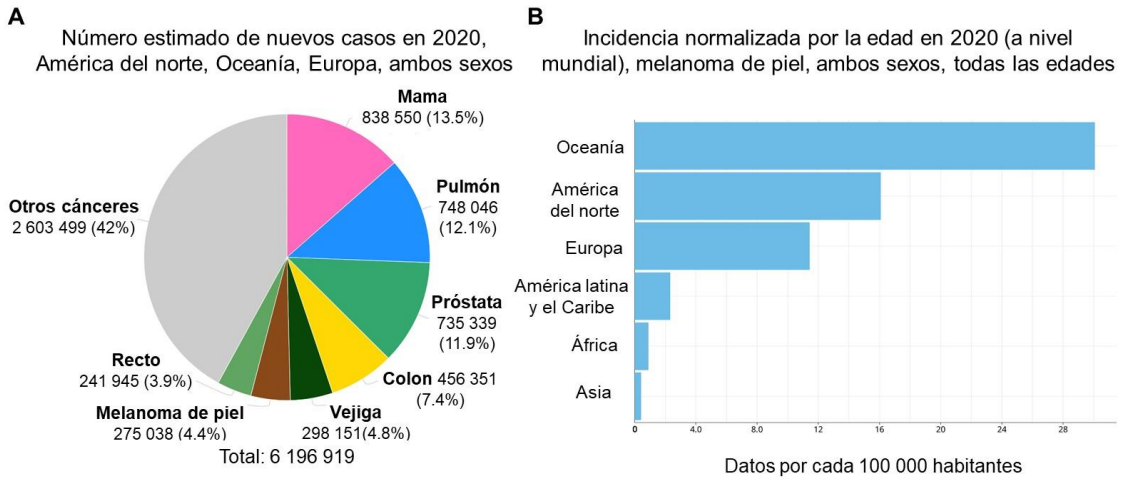



**Figura 2.17.** Datos estimados tanto de nuevos casos de cáncer en países más desarrollados como de las tasas de incidencia de melanoma en todo el mundo. **A)** Número estimado de nuevos casos de cáncer en 2020 en los países de América del Norte, Oceanía y Europa. **B)** Tasas de incidencia de melanoma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

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

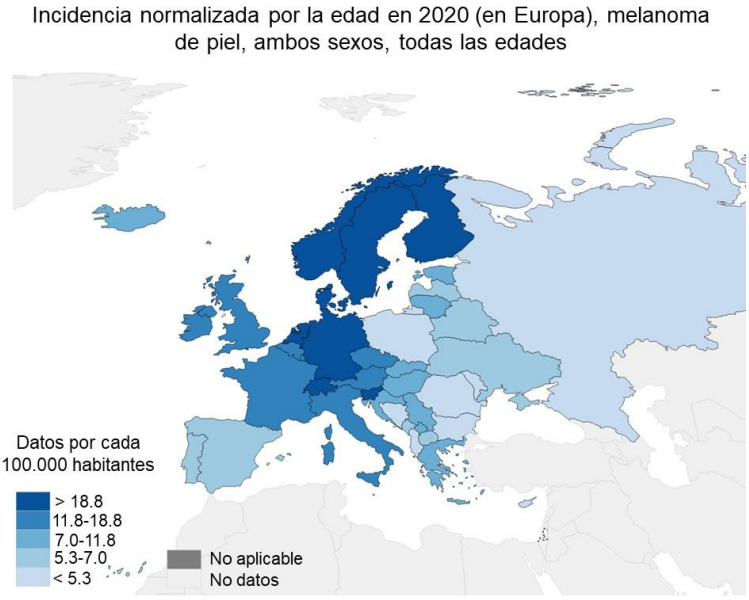



**Figura 2.18.** Datos estimados de las tasas de incidencia de melanoma de piel por cada 100000 habitantes en 2020, a nivel de Europa. Imagen obtenida y traducida de GLOBOCAN el 10 de agosto de 2023.

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

#### 2.2.2.4. Factores de riesgo

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

**Radiación UV**

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

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

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

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

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

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

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

**Antecedentes familiares**

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

***Nevi* melanocíticos**

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

**Características fenotípicas**

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

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

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

**Inmunosupresión**

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

### 2.2.2.5. Bases moleculares del melanoma

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

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

**Ruta de señalización dependiente de CDKN2A**

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

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

**Ruta de señalización dependiente de MAPK**

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

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

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

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

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

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

**Ruta de señalización dependiente de PI3K/AKT**

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

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

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

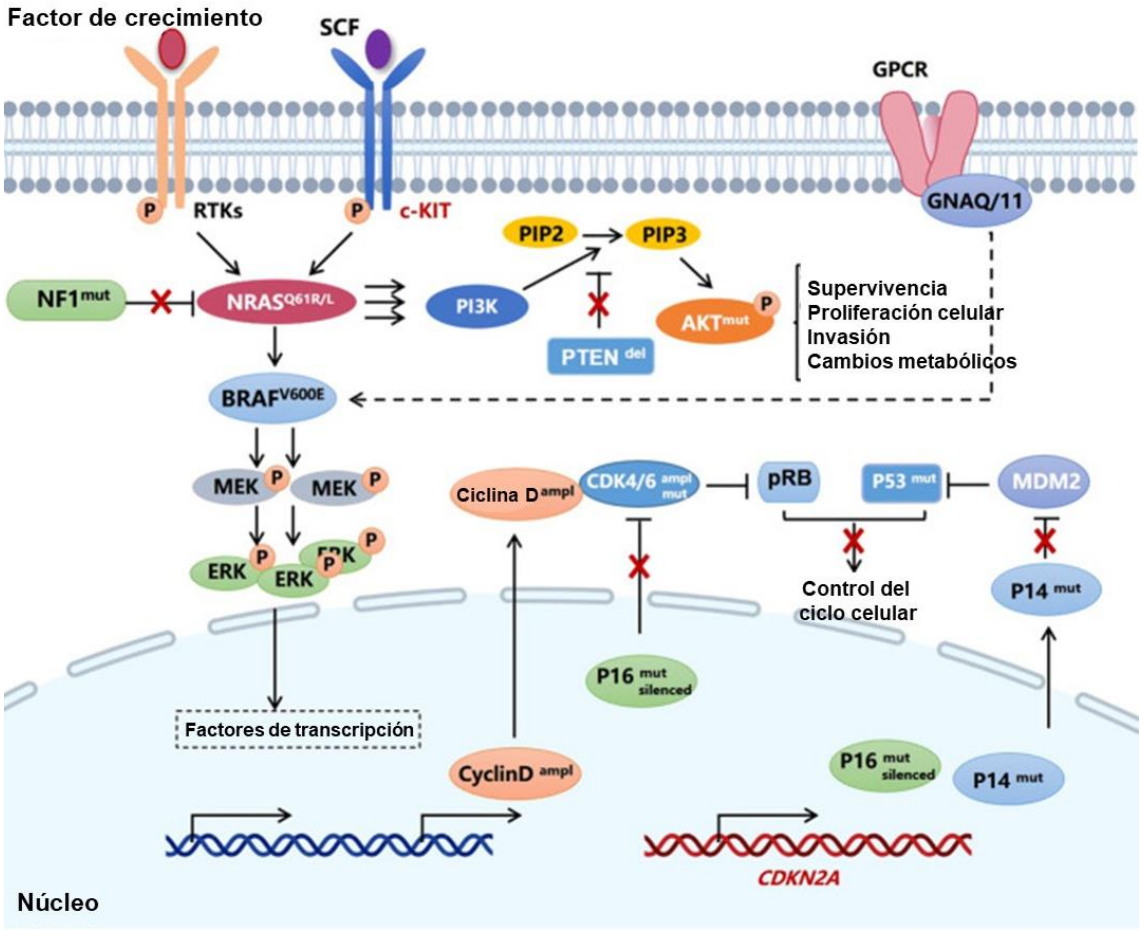



**Figura 2.19.** Mutaciones en genes clave y las vías de señalización subsiguientes en el desarrollo del melanoma. Ampl: amplificación, AKT: proteína quinasa B, CDK: quinasa dependiente de ciclina, CDKN2A: inhibidor de quinasa 2A dependiente de ciclina, Del: deleción, ERK: quinasa regulada por señales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

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

## Ruta de señalización dependiente de Notch

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

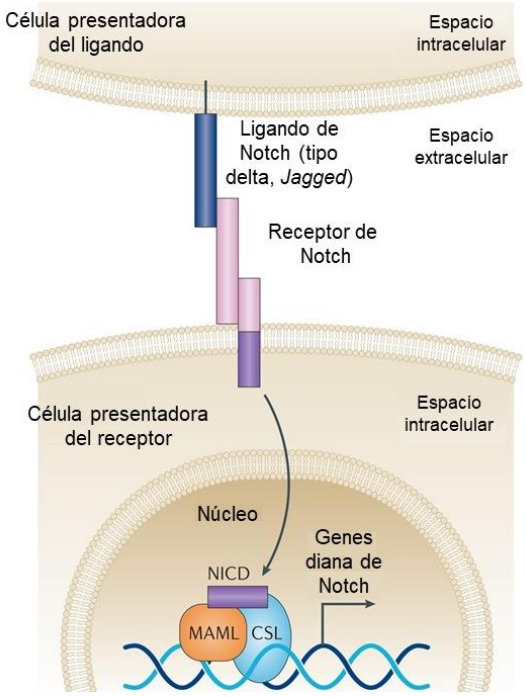



**Figura 2.20.** Vía de señalización de Notch. CSL: proteína *CBF1/Suppressor of Hairless/LAG*-1, MAML: proteína *mastermind-like*, NICD: dominio intracelular de Notch. Imagen traducida de Andersson & Lendahl, 2014.

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

**Rutas de señalización dependientes de Wnt**

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

En melanoma, destaca la ruta canónica de Wnt, ya que β-catenina tiene un papel fundamental en el desarrollo de los melanocitos (Kovacs et al., 2016). Cuando se activa el receptor Frizzled se bloquea la acción del complejo formado por las proteínas AXIN, GSK3β, CK1α y APC por medio de la proteína DVL. Esto permite que β-catenina no sea fosforilada y pueda migrar al núcleo para asociarse con los factores TCF (*T cell-specific factor*) y LEF (*lymphoid enhancer-binding factor*), lo que conduce a la activación de genes diana Wnt importantes en la carcinogénesis, incluidos *c-MYC* y *CCND1*. Sin embargo, en ausencia del ligando de Wnt, la proteína DVL no inhibe la acción del complejo formado por AXIN, CK1α, GSK3β y APC, el cual fosforila a β-catenina, lo que conduce a su ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma (**Figura 2.21**).

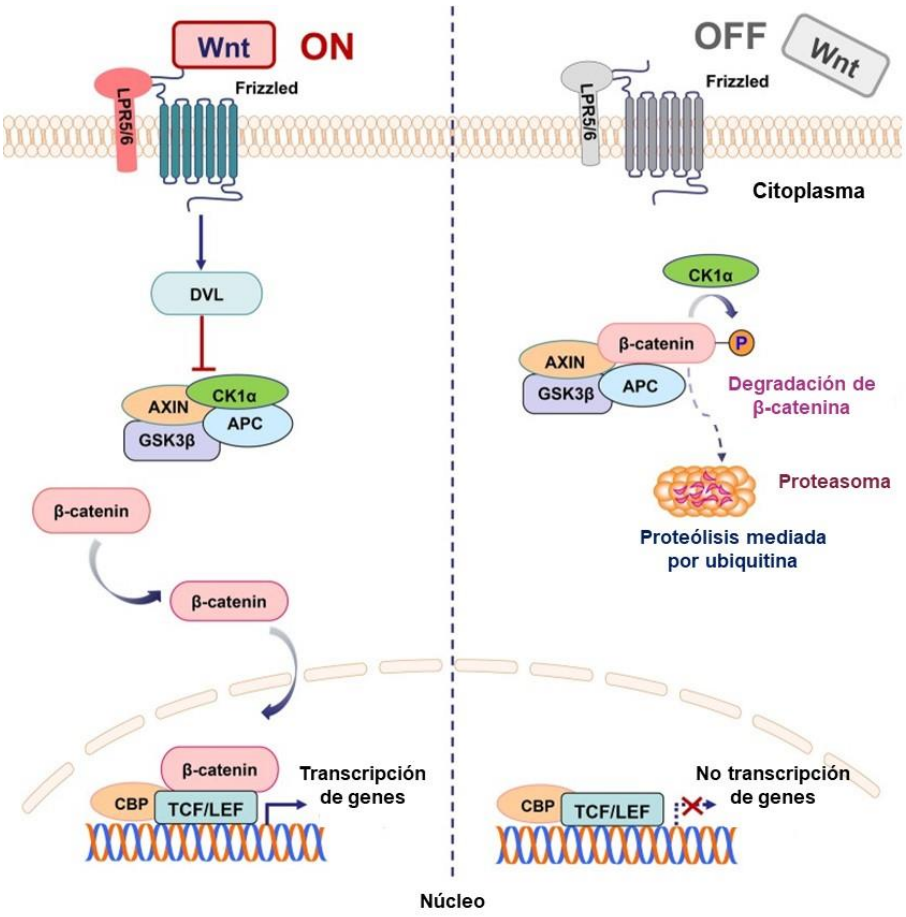



**Figura 2.21.** Esquema de la vía Wnt/β-catenina activada e inhibida. APC protein: proteína *adenomatous polyposis* coli, CBP: proteína de unión a CREB, CK1α: caseína quinasa 1-alfa, DVL protein: proteína d*isheveled*, GSK3β: glucógeno sintasa quinasa 3-beta. Imagen traducida de Zhang & Wang, 2020.

Además, la ruta Wnt/β-catenina ejerce un papel importante en el sistema inmunitario. Diversas investigaciones han demostrado que la evasión inmune inducida por β-catenina se encuentra en el 13% de todos los tumores (Pai et al., 2017) y en el 42% de los melanomas cutáneos (Nsengimana et al., 2018). En un estudio reciente realizado por Waaler y colaboradores, se ha desarrollado un inhibidor específico de la tanquirasa, G007-LK, que disminuye la señalización Wnt/β-catenina en modelos de melanoma murino y sensibiliza los tumores al tratamiento con inhibidores de PD-1 (Waaler et al., 2020). La tanquirasa es una proteína que controla la degradación de AXIN mediante poli-ADP-ribosilación. De esta forma, la tanquirasa es capaz de promover la proteólisis de AXIN e inhibir la acción del complejo formado por AXIN, CK1α, GSK3β y APC, favoreciendo así la estabilización de β-catenina. Por tanto, la inhibición de la tanquirasa puede ser considerada como una estrategia terapéutica para superar la resistencia provocada por β-catenina al bloqueo de los puntos de control inmunitario en melanoma. Durante esta Tesis Doctoral se ha realizado una estancia de tres meses en el laboratorio

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

**MITF: Factor de transcripción clave en el desarrollo del melanoma**

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

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

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

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

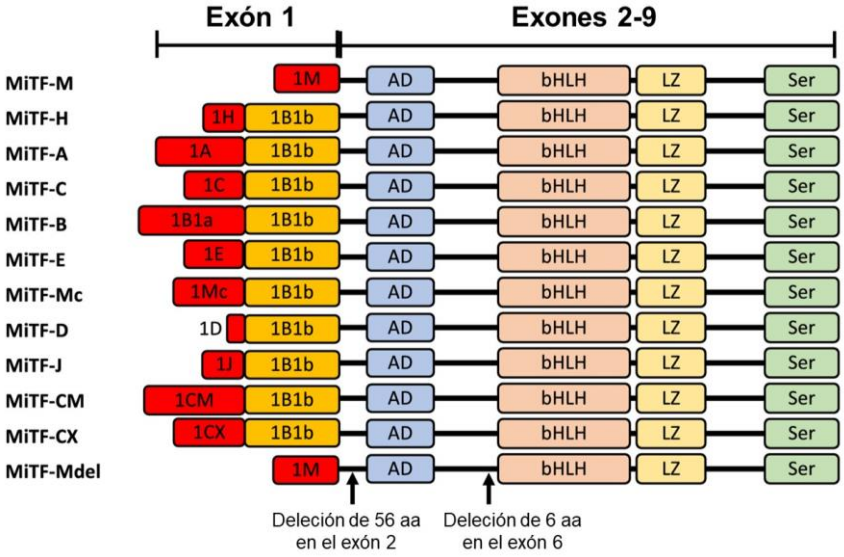



**Figura. 2.22.** Diferentes isoformas de MITF. Imagen traducida de Oppezzo & Rosselli, 2021.

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

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

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

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

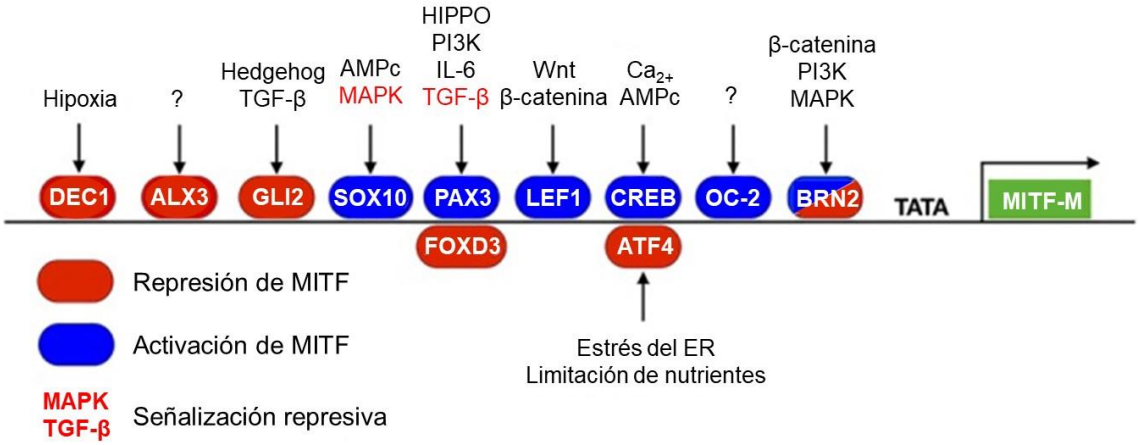



**Figura 2.23.** Diagrama esquemático de los factores de transcripción que regulan positiva o negativamente el promotor MITF-M y su respuesta a las vías de señalización. ER: retículo endoplásmico, MAPK: quinasa activada por mitógenos, TGF-β: factor de crecimiento transformante beta. Imagen traducida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

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

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

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

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

En cuanto a los eventos de fosforilación (**Figura 2.24**), el más estudiado es el que tiene lugar en el residuo de Ser73, identificado en 1998 (Hemesath et al., 1998). Este proceso de fosforilación es mediado por la proteína ERK y afecta a la interacción entre MITF-M y p300, lo que produce efectos sobre la activación de la transcripción. La fosforilación en la Ser409 por la quinasa p90/RSK permite la fosforilación por la quinasa GSK3β (*glycogen synthase kinase-3β*) en Ser405, Ser401 y Ser397, cuyo efecto parece desestabilizar la proteína MITF-M (Ploper et al., 2015). También se ha observado que GSK3β fosforila en la posición Ser298 de MITF-M, provocando una mayor unión de MITF al promotor de *TYR* (Takeda et al., 2000). Además, se ha demostrado que la fosforilación de la Ser307 en MITF-M conduce a un aumento en la expresión génica específica de los osteoclastos (Mansky et al., 2002).

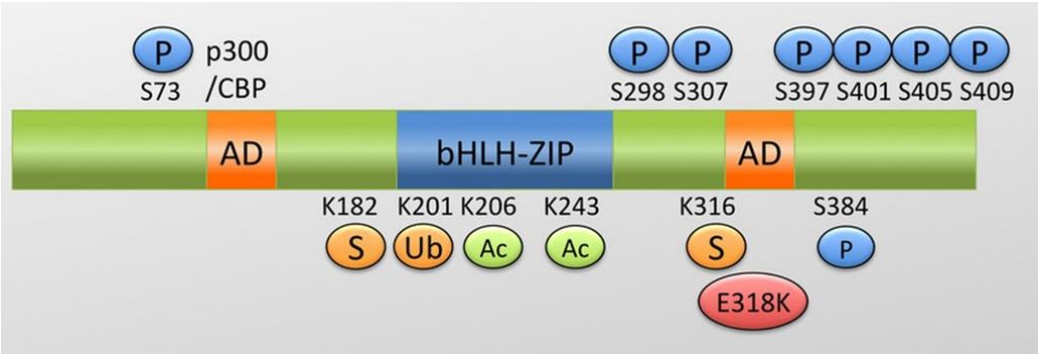



**Figura 2.24.** Principales modificaciones postraduccionales de la proteína MITF-M. Se incluyen fosforilaciones (P), sumoilaciones (S), ubiquitinaciones (Ub) y acetilaciones (Ac), así como la mutación E318K. Imagen obtenida de Wellbrock & Arozarena, 2015.

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

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

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

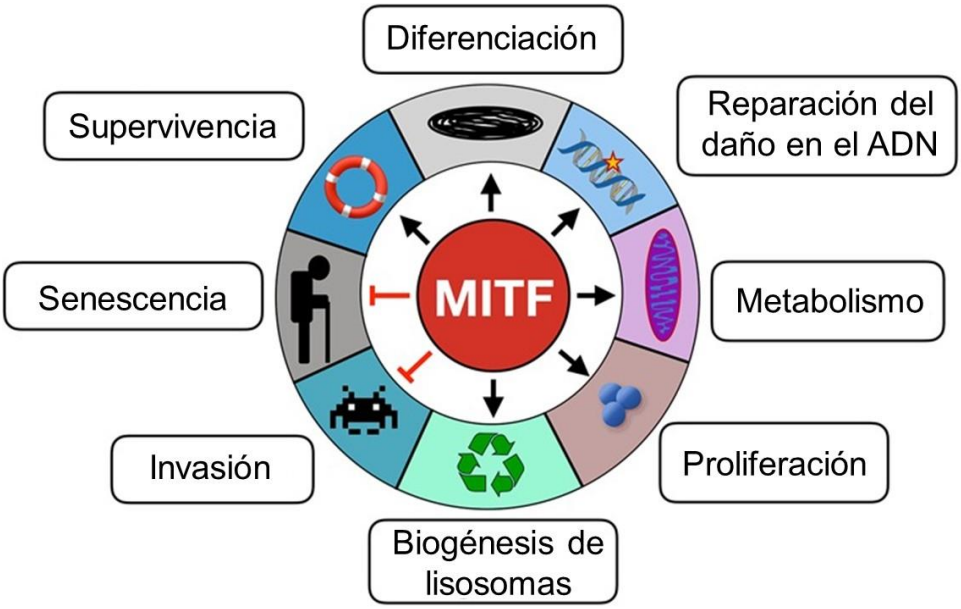



**Figura 2.25.** Principales funciones biológicas de MITF. Imagen traducida de Goding & Arnheiter, 2019.

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

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

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

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

específico de genes relacionados con la autofagia (Möller et al., 2019), un proceso celular que depende de los lisosomas y que se encarga de degradar y reciclar orgánulos no deseados. Esto podría representar una estrategia crucial de supervivencia celular, especialmente cuando hay restricción de nutrientes. Además, se ha observado que MITF es capaz de modificar la configuración metabólica de las células. En concreto, MITF desempeña un papel activador en la regulación de PGC1α, que controla la biogénesis de las mitocondrias (Vazquez et al., 2013).

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

En procesos relacionados con la replicación del ADN, reparación de daños y preservación de la integridad cromosómica, MITF también regula un conjunto significativo de genes. En particular, se ha observado que los niveles reducidos de MITF se asocian con un aumento de los focos γH2AX, que indican la presencia de daños en el ADN (Giuliano et al., 2010). Aunque no queda claro como MITF evita el daño del ADN, puede estar vinculado a su capacidad para regular varios factores de reparación, incluidos BRCA1, LIG1, RAD54, RAD51L3, y la telomerasa codificada por *TERT1* (Strub et al., 2011).

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

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

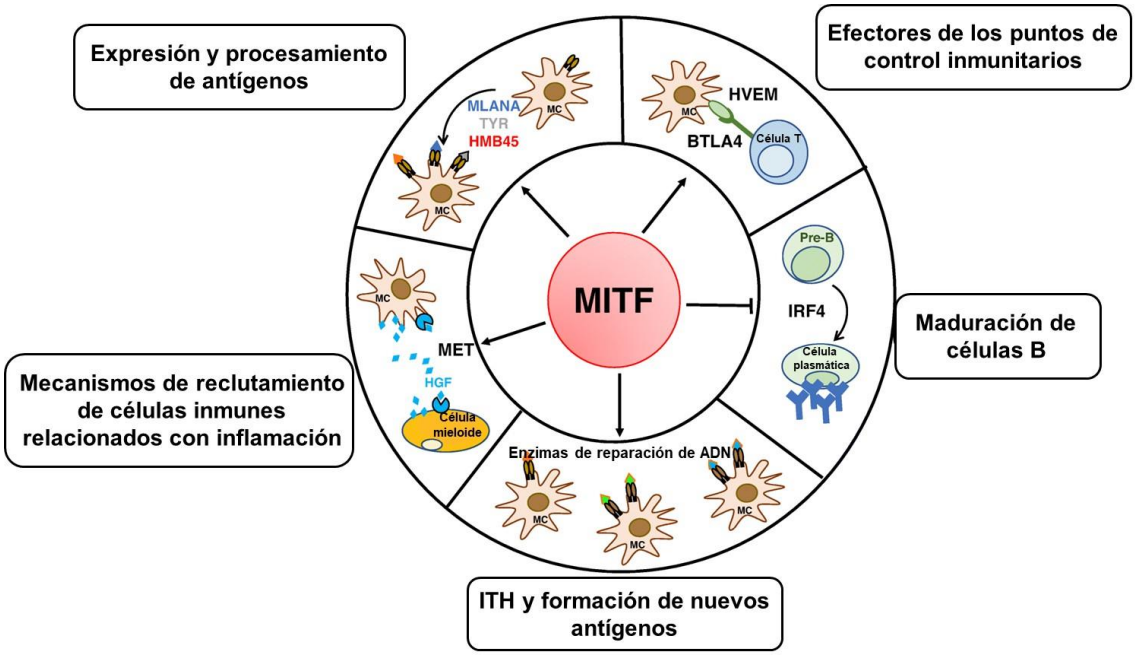



**Figura 2.26.** Esquema resumido de las características de la relación de MITF con el sistema inmunitario a nivel transcripcional. BTLA: atenuador de linfocitos B y T, CCL: ligando de quimioquina (motivo C-C), HGF: factor de crecimiento de hepatocitos, HVEM: mediador de entrada de herpesvirus, IFN: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

### 2.2.2.6. Diagnóstico del melanoma

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

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

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

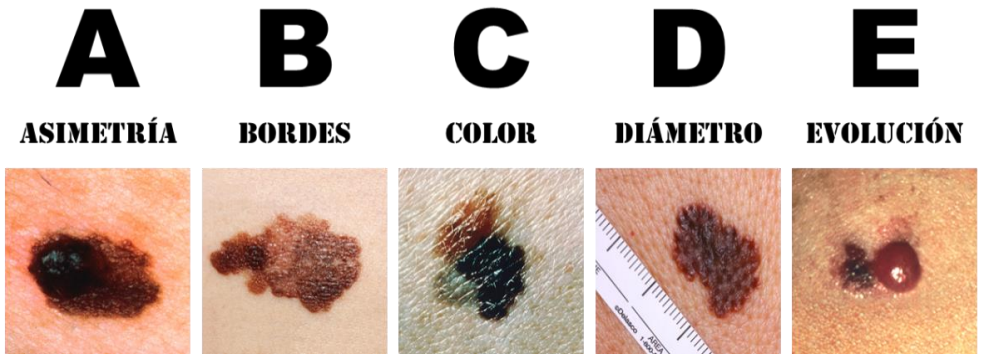



**Figura 2.27.** Regla ABCDE para el diagnóstico del melanoma cutáneo maligno. Imágenes obtenidas de la colección del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (*National Cancer Institute Visuals Online*).

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

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

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

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

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

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

#### 2.2.2.7. Clasificación de los estadios del melanoma

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

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

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

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

**Tabla 2.1.** Diferentes estadios del melanoma.

#### 2.2.2.8. Tratamiento del melanoma

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

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

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

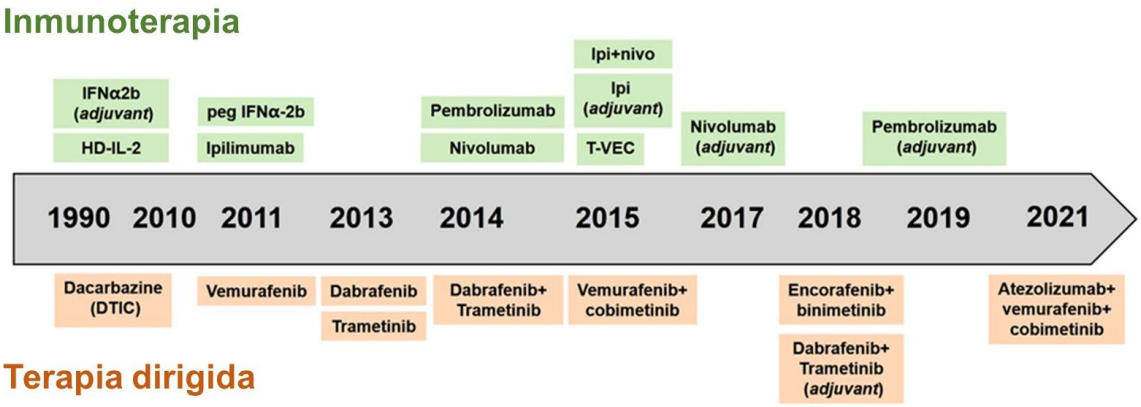



**Figura 2.28.** Secuencia temporal de las terapias aprobadas por la FDA para el melanoma metastásico. HD: dosis altas, Ipi: Ipilimumab, T-VEC: talimogene laherparepvec. Imagen traducida de Guo et al., 2021.

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

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

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

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

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

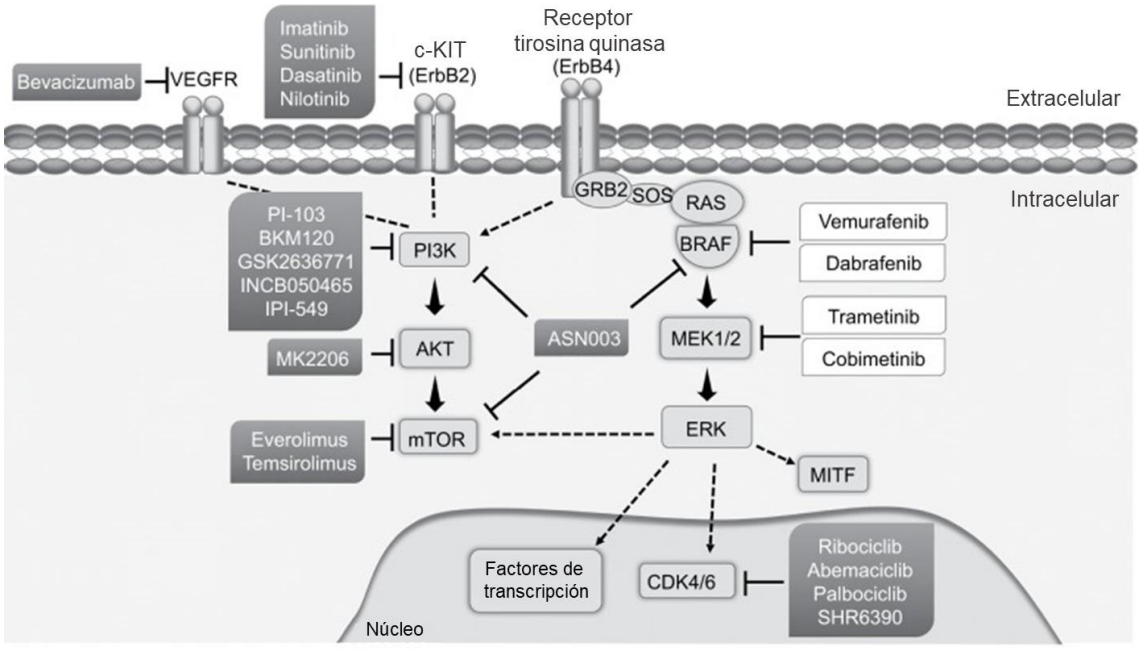



**Figura 2.29.** Terapias dirigidas aprobadas por la FDA (en blanco: vemurafenib, dabrafenib, trametinib y cobimetinib) o en ensayos (en gris oscuro: imatinib, sunitinib, dasatinib, nilotinib, bevacizumab, PI-103, BKM120, GSK2636771, INCB050465, IPI-549, MK2206, everolimus, temsirolimus, ribociclib,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

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

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

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

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

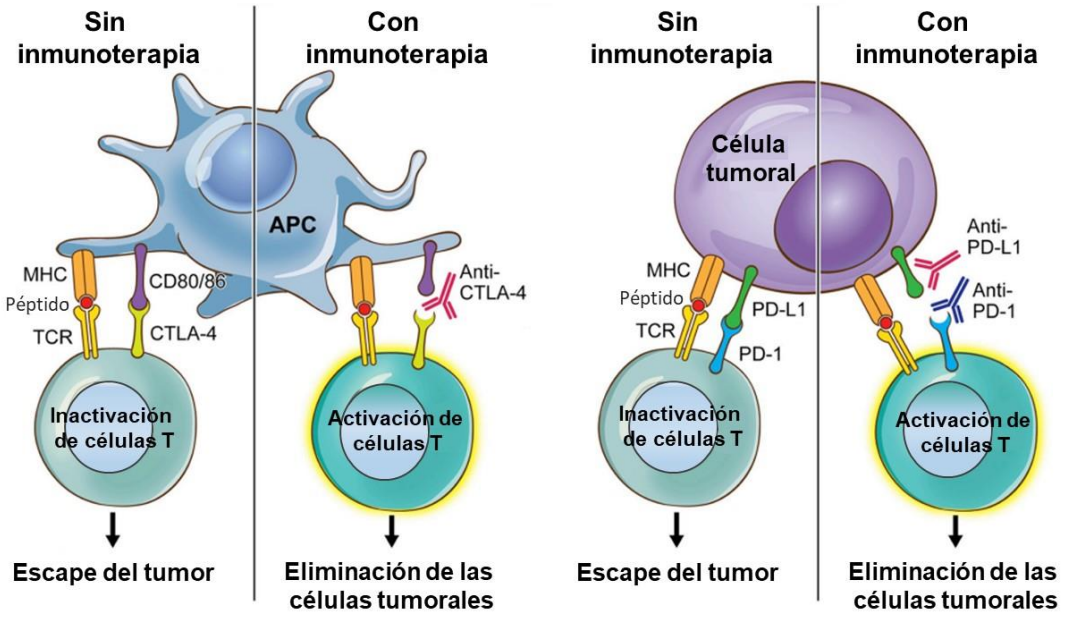



**Figura 2.30.** Papel de CTLA-4 y PD-1 en la regulación del sistema inmunitario. APC: célula presentadora de antígenos, MHC: complejo mayor de histocompatibilidad, TCR: receptor de células T. Imagen traducida de Soularue et al., 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

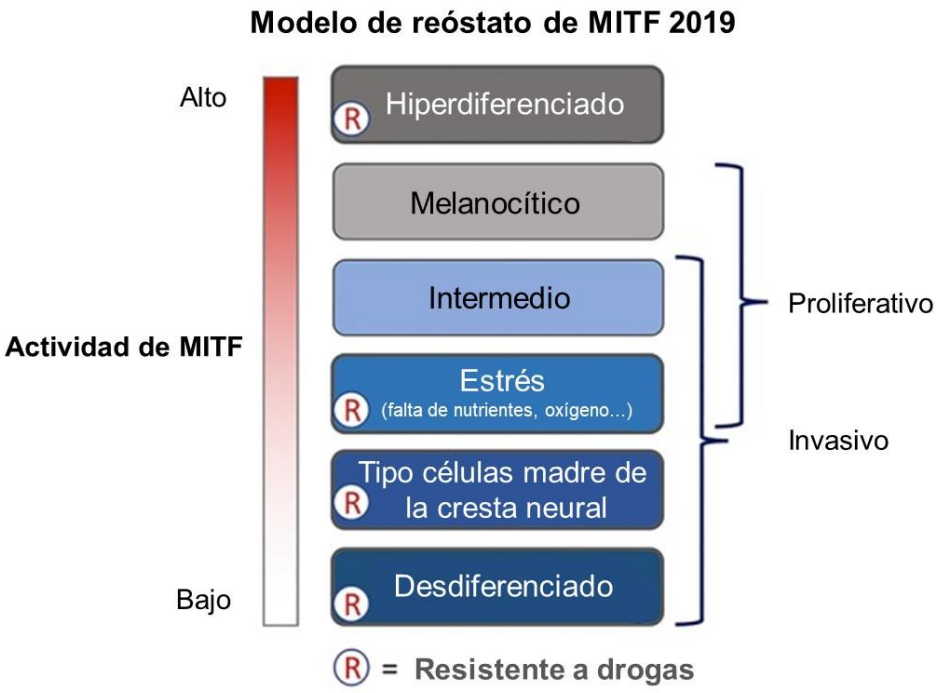



**Figura 2.31.** Modelo de reóstato según la expresión de MITF en melanoma. Imagen traducida de Rambow et al., 2019.

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

#### 2.2.2.10. Evasión del sistema inmunitario en melanoma

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

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

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

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

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

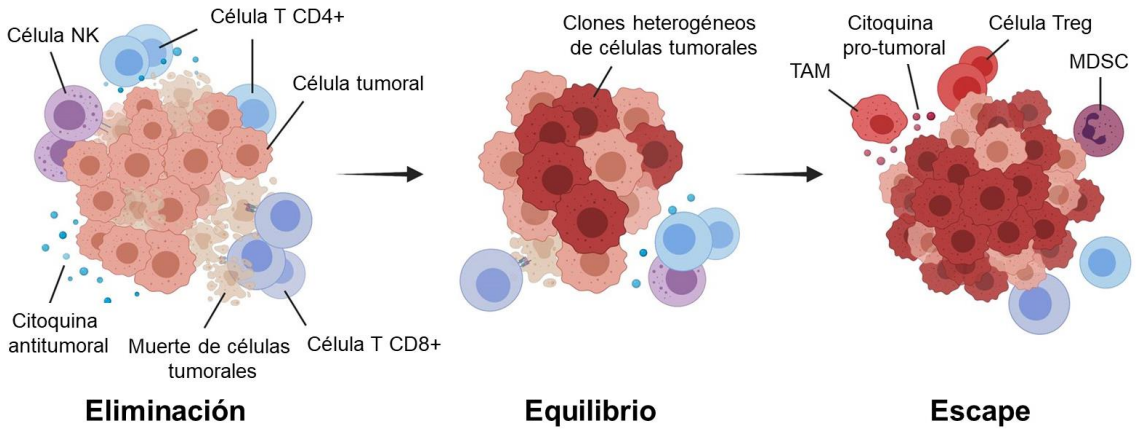



**Figura 2.32.** Inmunoedición a lo largo de la formación y progresión del tumor. MDSC: células supresoras derivadas de células mieloide, TAM: macrófagos asociados a tumores. Imagen traducida de Zhu & Yu, 2022.

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

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

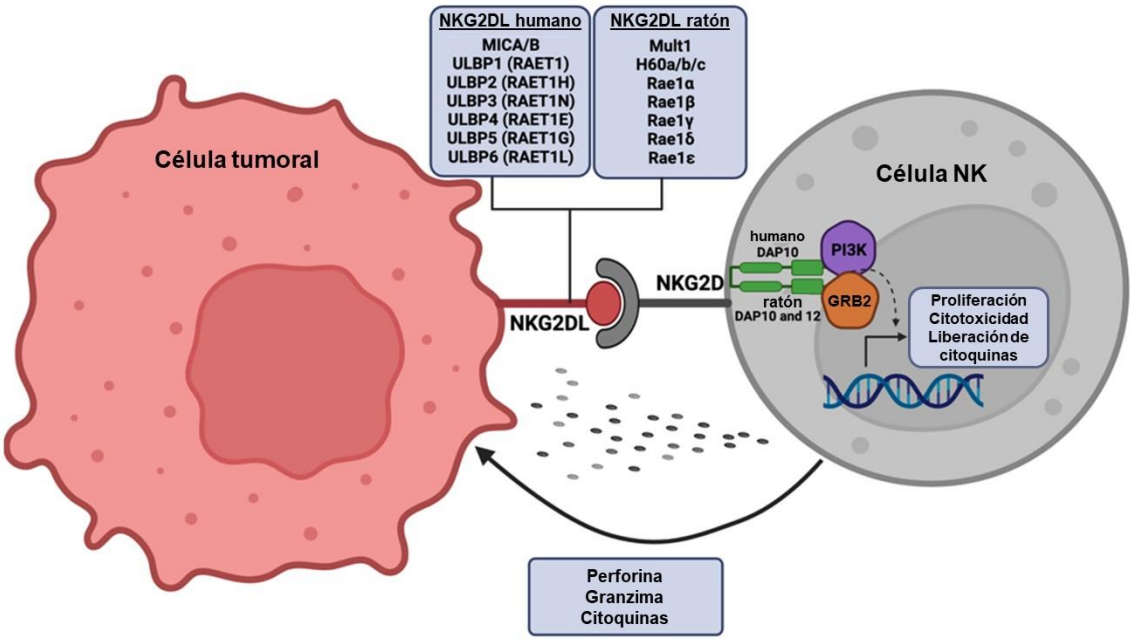



**Figura 2.33.** Función del receptor NKG2D en células NK. GRB2: proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento, NKG2DL: ligando del receptor NKG2D, PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa. Imagen traducida de Jones et al., 2022.

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

Los ligandos MICA/B para NKG2D son proteínas de membrana con dominios extracelulares similares al MHC, pero a diferencia de las moléculas MHC clásicas, no se asocian con la β2 microglobulina ni presentan antígenos (Groh et al., 1996). Los ectodominios de MICA/B constan de tres dominios tipo Ig tipo C denominados dominios α1, α2 y α3. Los dominios α1 y α2 son los que interactúan con la proteína NKG2D y están ubicados más lejos de la membrana celular, mientras que el dominio α3, más cercano a la membrana, no interactúa con NKG2D (Li et al., 2001). La escisión proteolítica de MICA/B comienza en el dominio α3, donde una proteína disulfuro isomerasa, llamada ERp5, rompe un enlace disulfuro específico entre los aminoácidos 202 y 259, lo que probablemente despliega el dominio α3 y expone el sitio de escisión proteolítica (Kaiser et al., 2007). Esta escisión es un proceso de varios pasos que involucra a varias metaloproteasas, incluyendo MMP14, ADAM10 y ADAM17, y resulta en la liberación de la porción extracelular completa de MICA/B, incluyendo los dominios α1 y α2 que son esenciales para la unión a NKG2D (Liu et al., 2010; Waldhauer et al., 2008).

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

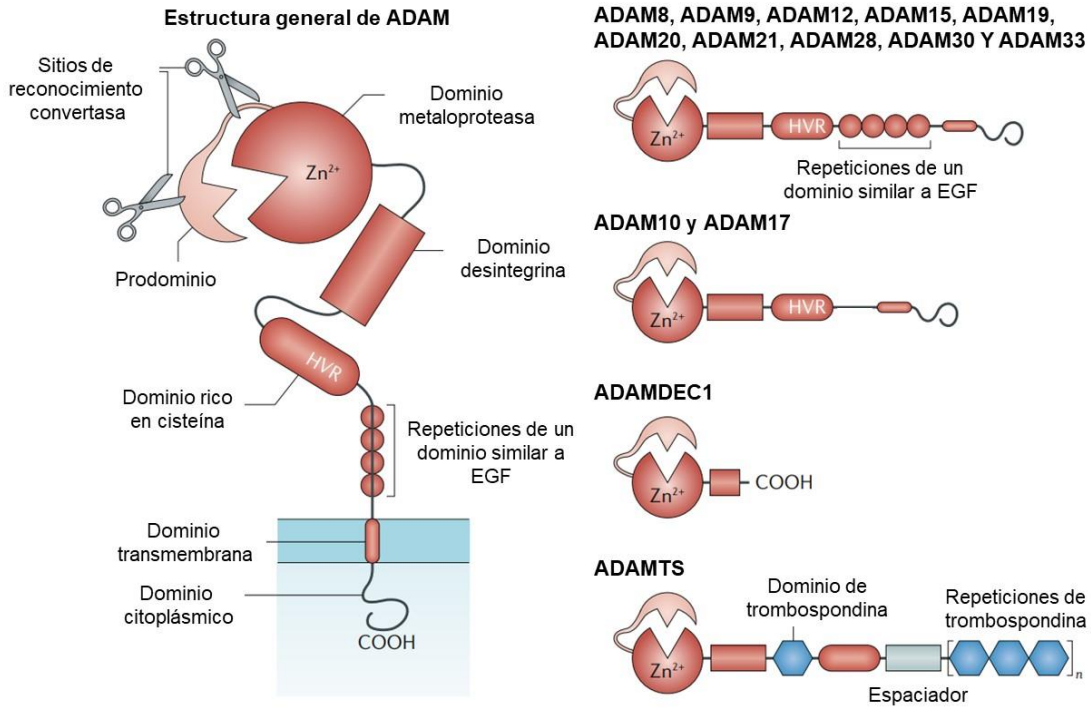



**Figura 2.34.** Estructura de las proteínas ADAM y ADAMTS humanas que tienen actividad proteolítica. EGF: factor de crecimiento epidérmico, HVR: región hipervariable. Imagen traducida de Lambrecht et al., 2018.

Recientemente, estudios con células de melanoma revelaron que los anticuerpos dirigidos específicamente al dominio α3 de MICA/B suprimieron de manera significativa su corte proteolítico, lo que se tradujo en un notable incremento de la actividad citotóxica por parte de las células NK (Ferrari de Andrade et al., 2018). Por tanto, el bloqueo de la eliminación proteolítica de MICA/B en las células tumorales provocó que las células NK pudieran detectarlas y eliminarlas.

## 2.3. CÁNCER DE PÁNCREAS

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

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

### 2.3.1. Células pancreáticas y cáncer de páncreas

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

**Células Endocrinas**

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

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

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

**Células Exocrinas**

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

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

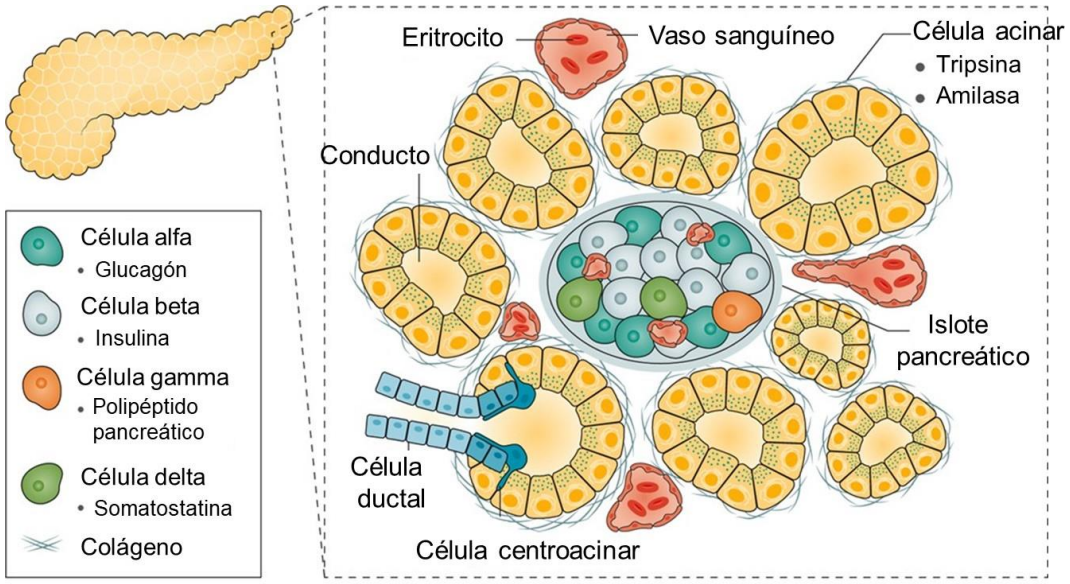



**Figura 2.35.** Tipos de células (endocrinas y exocrinas) presentes en el páncreas. Imagen traducida de Ellis et al., 2017.

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

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

### 2.3.2. Patogénesis del cáncer de páncreas

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

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

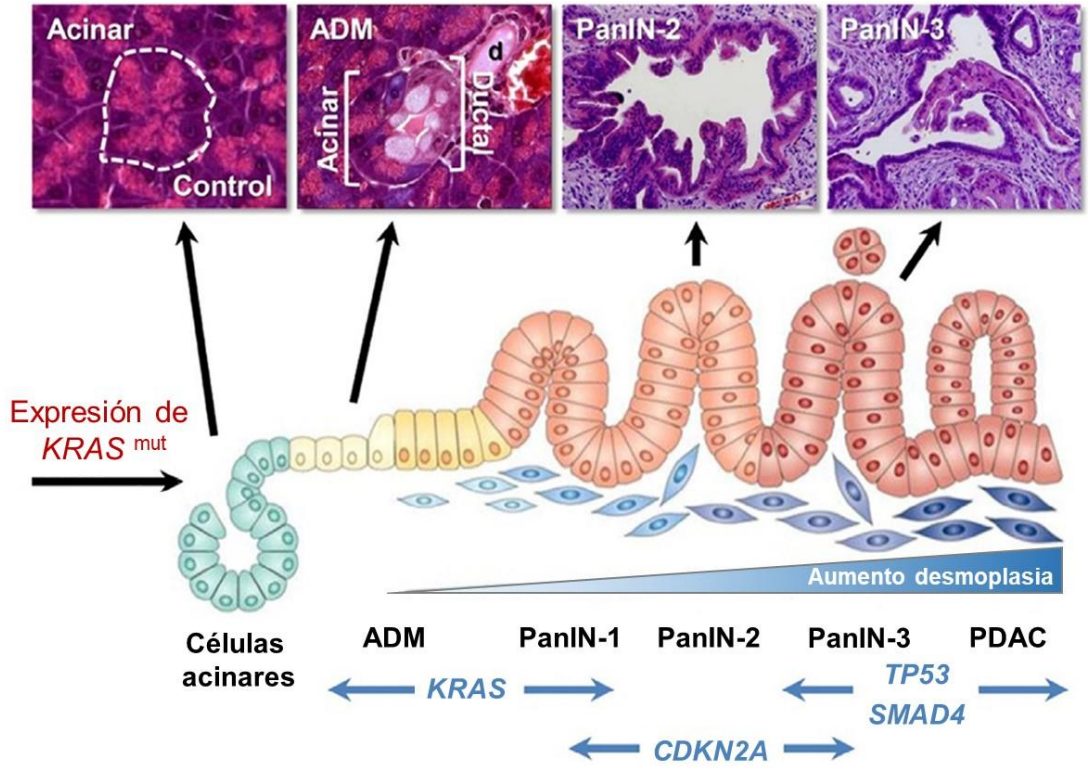



**Figura 2.36.** Representación esquemática e histológica del desarrollo gradual del cáncer de páncreas. ADM: metaplasia acinar-ductal, KRAS: homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Kirsten, PanIN: neoplasia intraepitelial pancreática, PDAC: adenocarcinoma pancreático ductal. Imagen traducida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

### 2.3.3. Epidemiología

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

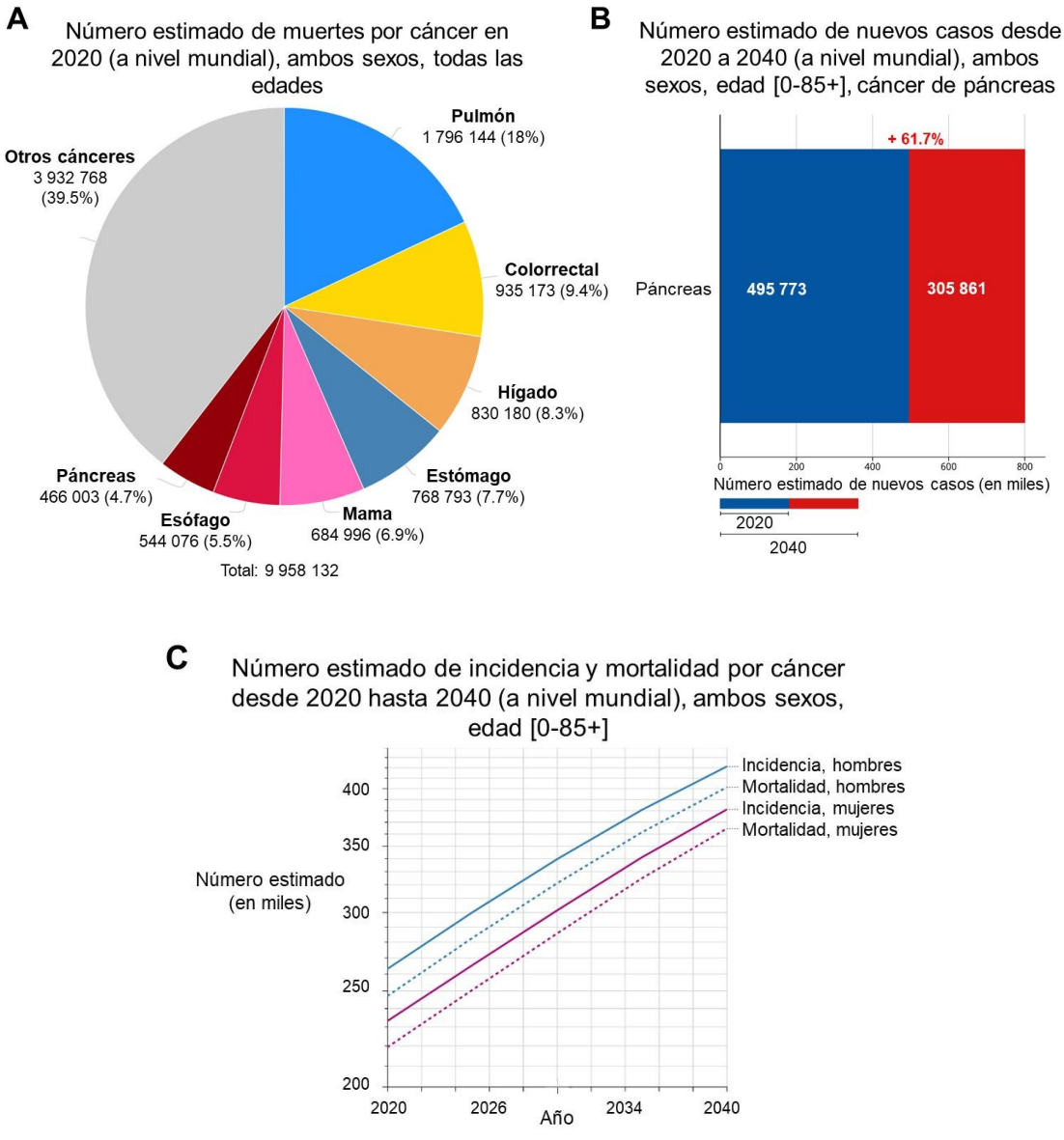



**Figura 2.37.** Datos estimados de muertes por cáncer, de nuevos casos de cáncer de páncreas y de su incidencia/mortalidad, a nivel mundial. **A)** Número estimado de muertes por cáncer en 2020. **B)** Número estimado de nuevos casos de cáncer de páncreas desde 2020 hasta 2040. **C)** Incidencia y mortalidad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

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

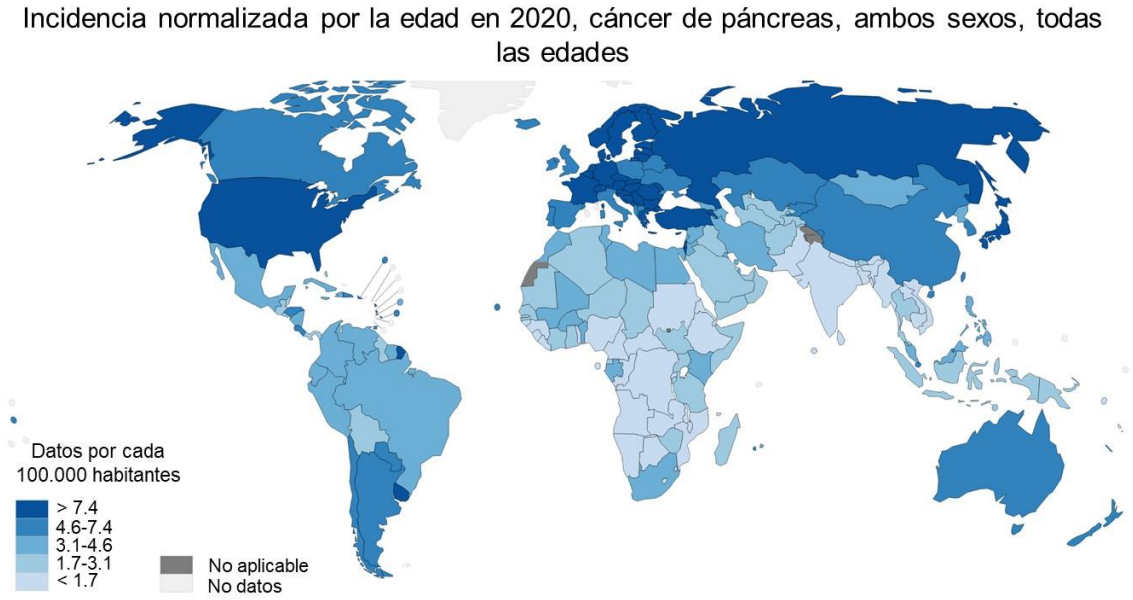



**Figura 2.38.** Datos estimados de las tasas de incidencia de cáncer de páncreas por cada 100000 habitantes en 2020, a nivel mundial. Imagen obtenida y traducida de GLOBOCAN el 10 de agosto de 2023.

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

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

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

### 2.3.4. Factores de riesgo

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

**Factores de riesgo no modificables**

El cáncer de páncreas tiende a afectar principalmente a los ancianos. La mayoría de los pacientes recién diagnosticados, alrededor del 90%, tienen más de 55 años, con un pico en la séptima y octava década de vida. En cuanto al género y área geográfica, la incidencia del cáncer de páncreas es mayor en hombres que en mujeres, con una mayor diferencia en países más desarrollados. Se observa una mayor tasa en norteamericanos y europeos y una menor en asiáticos e isleños del Pacífico. No obstante, estas diferencias en la incidencia entre grupos étnicos o ambos sexos no se pueden explicar únicamente por interacciones genéticas o ambientales. Asimismo, otras investigaciones han demostrado que el riesgo de desarrollar cáncer de páncreas está relacionado con diferentes tipos de grupos sanguíneos. Por ejemplo, a diferencia de los que son tipo 0, aquellos con tipos A, AB o B tienen un mayor riesgo, posiblemente relacionado con procesos de inflamación y regulación inmunológica. Además, el componente genético es uno de los principales factores de riesgo. Se considera que el cáncer de páncreas es de origen familiar si dos o más familiares de primer grado han tenido la enfermedad, representando del 5% al 10% de los nuevos casos. Aquellos con antecedentes familiares tienen un riesgo significativamente mayor de desarrollar la enfermedad, y este riesgo se incrementa aún más si hay tres o más familiares con diagnóstico previo. Las personas con antecedentes familiares de cáncer de páncreas tienen un riesgo 80% mayor de desarrollar adenocarcinoma de páncreas en comparación con aquellos sin antecedentes familiares. Igualmente, se asocia un mayor riesgo de sufrir cáncer de páncreas en personas con diabetes, particularmente en casos de larga duración.

**Factores de riesgo modificables**

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

### 2.3.5. Bases moleculares del cáncer de páncreas

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

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

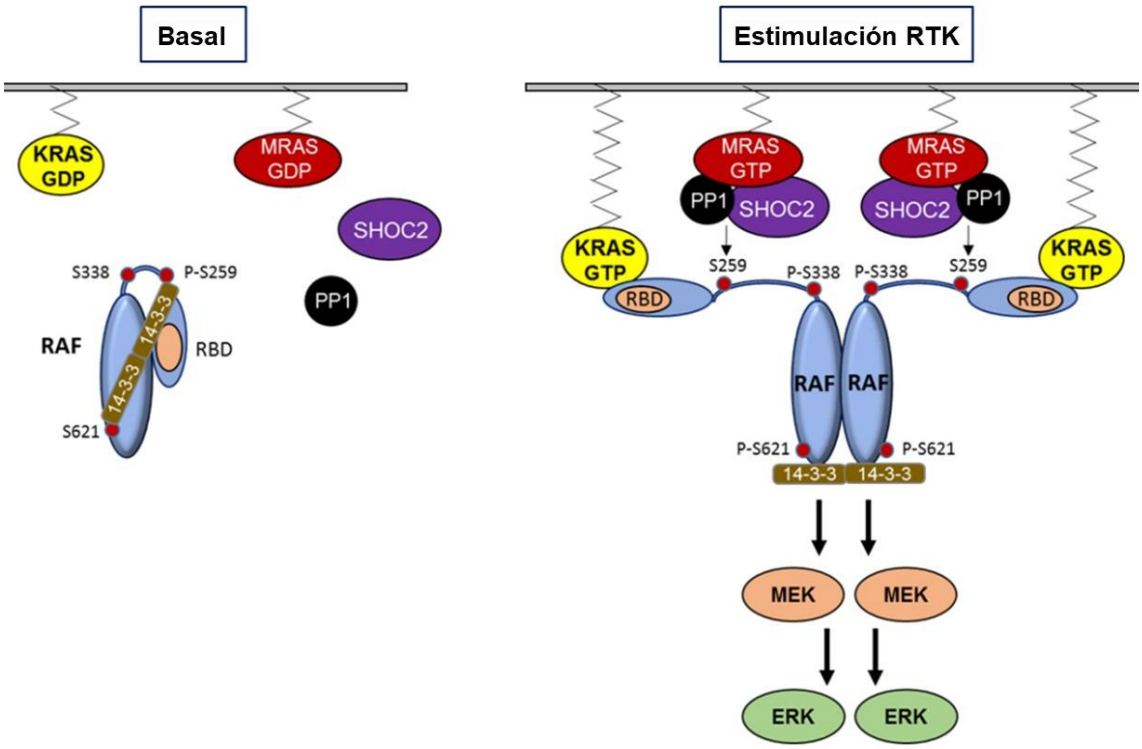



**Figura 2.39.** Función del complejo MRAS-SHOC2-PP1 fosfatasa. ERK: quinasa regulada por señales extracelulares, GDP: difosfato de guanosina, GTP: trifosfato de guanosina, KRAS: homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de *Kirsten*, MEK: quinasa activada por mitógenos, MRAS: MRAS: homólogo del oncogén RAS muscular, RAF: quinasa responsable del "fibrosarcoma rápidamente acelerado", RBD: dominio de unión a RAS, RTK: receptor de tirosina quinasa. Imagen traducida de Jones, 2018.

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

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

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

**Oncogén *KRAS***

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

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

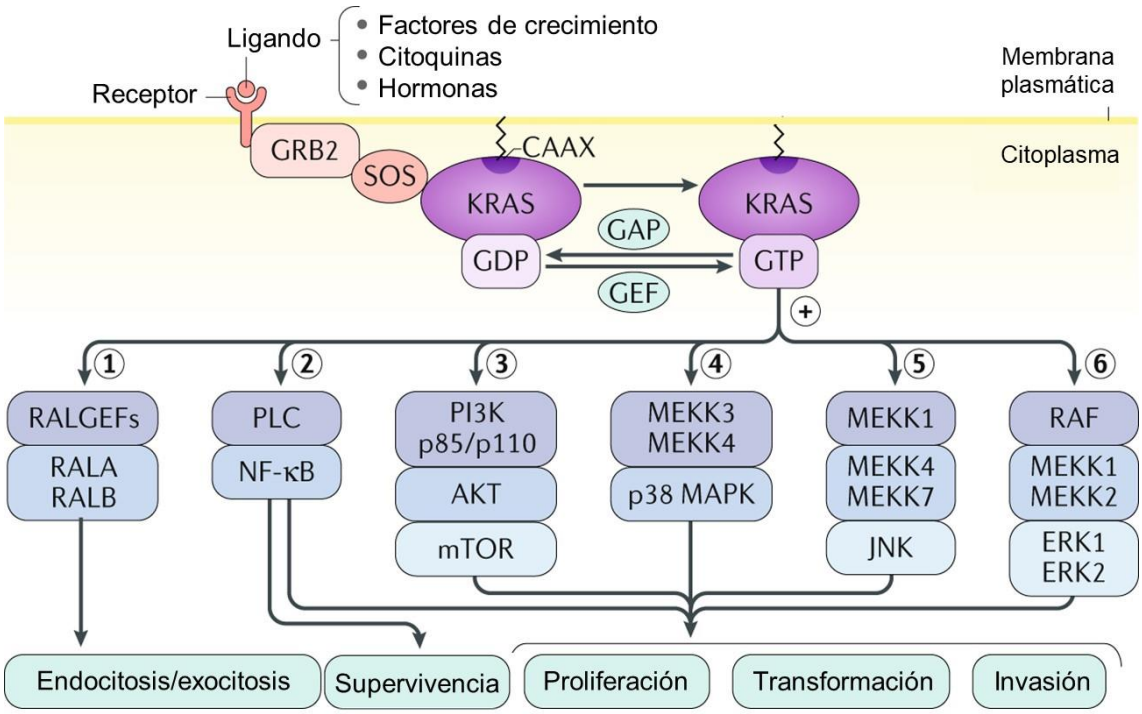



**Figura 2.40.** Activación de la proteína KRAS y las vías intracelulares implicadas. AKT: proteína quinasa B, ERK: quinasa regulada por señales extracelulares, GAP: proteína activadora de GTPasa, GDP: difosfato de guanosina, GEF: factor de intercambio de nucleótidos de guanina, GRB2: proteína 2 unida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

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

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

**Genes supresores de tumores**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 2.3.6. Diagnóstico

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

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

### 2.3.7. Clasificación de los estadios del cáncer de páncreas

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

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

**Tabla 2.2.** Diferentes estadios del cáncer de páncreas.

### 2.3.8. Tratamiento

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 2.3.9. Autofagia como mecanismo protector

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

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

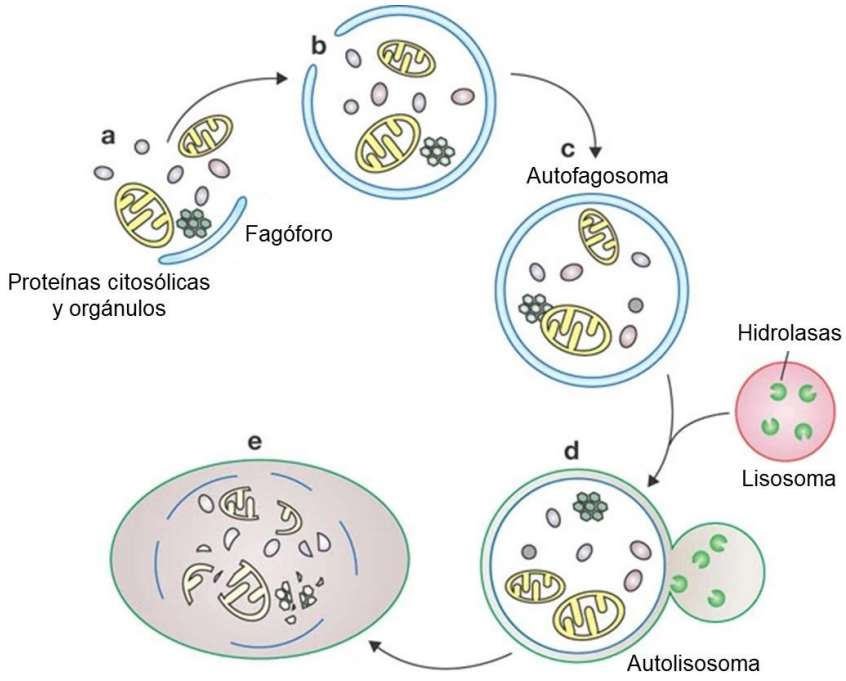



**Figura 2.41.** Representación esquemática del proceso de autofagia. Imagen traducida de Xie & Klionsky, 2007.

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

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

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

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

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

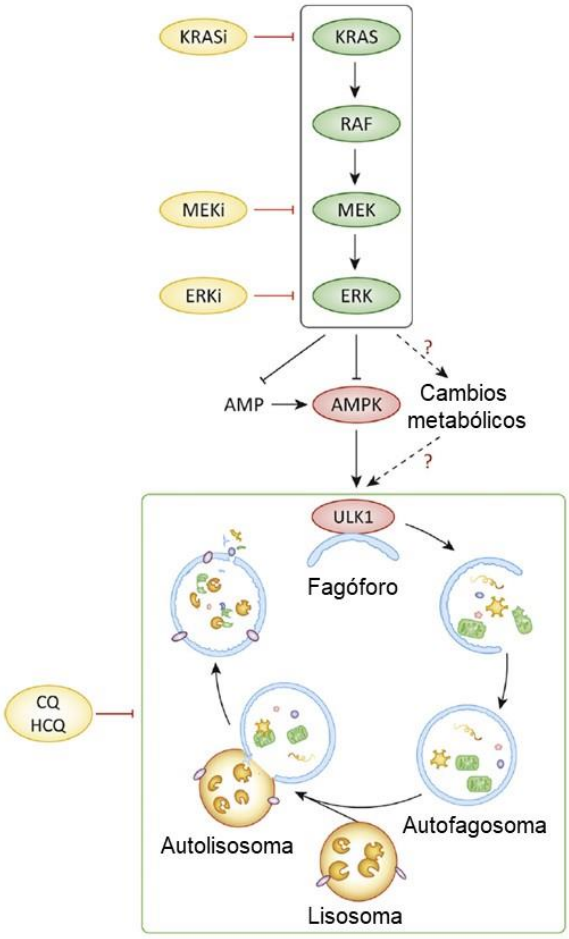



**Figura 2.42.** Inhibición de KRAS, MEK o ERK induce el flujo autofágico en células cancerosas a través de ULK1. AMPK: proteína quinasa activada por AMP, ERK: quinasa regulada por señales extracelulares, ERKi: inhibidor de ERK, CQ: cloroquina, HCQ: hidroxicloroquina, KRAS: homólogo del oncogén viral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

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

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

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

**Ciclo del ácido fólico**

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

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

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

**Ciclo de la metionina**

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

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

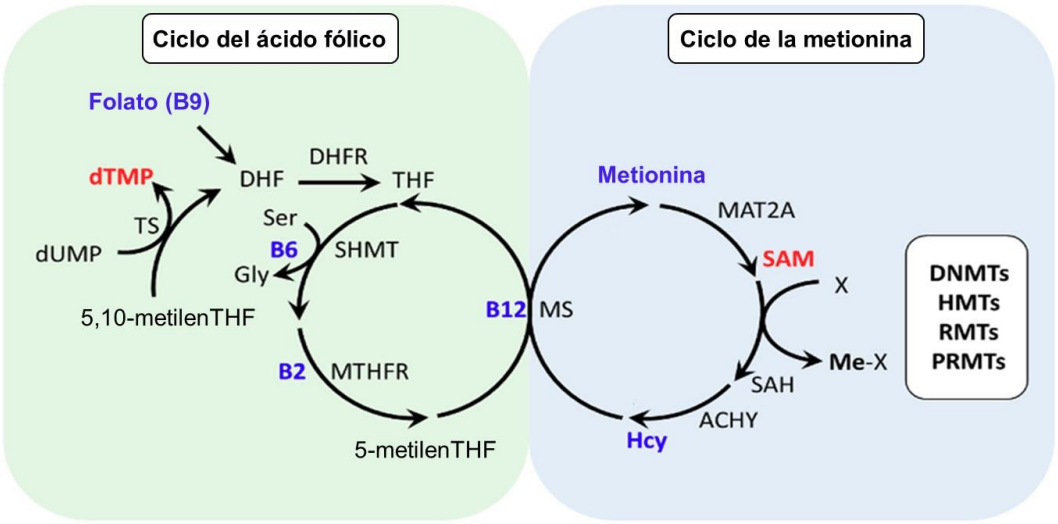



**Figura 2.43.** Representación esquemática de los ciclos del ácido fólico y de la metionina. AHCY: S-adenosilhomocisteína hidrolasa, B-(2, 6, 9, 12): vitamina tipo B-(2, 6, 9, 12), DHF: 7,8-dihidrofolato, DHFR: enzima dihidrofolato reductasa, DNMTs: metiltransferasas de ADN, dTMP: monofosfato de desoxitimidina,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

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

## Antifolatos derivados de las catequinas del té

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

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

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

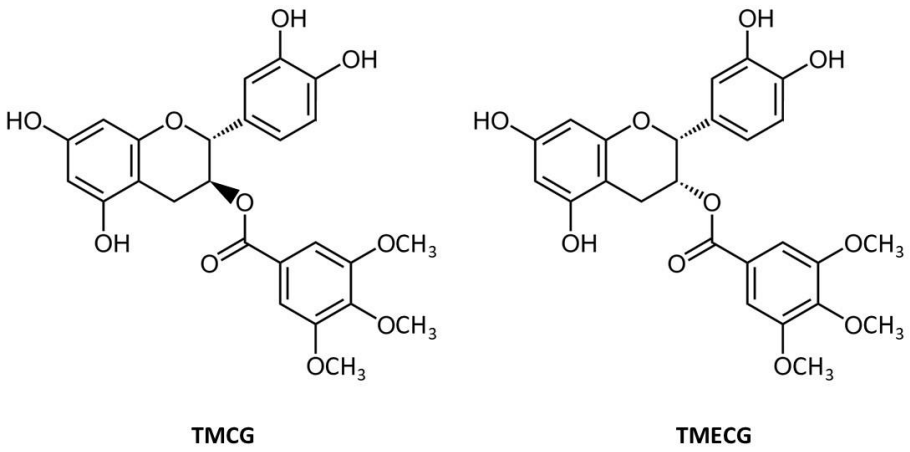



**Figura 2.44.** Estructura molecular del TMCG y TMECG. TMCG: 3-O-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-(–)-catequina, TMECG: 3-O-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-(–)-epicatequina. Imagen adaptada de Sánchez-del-Campo et al., 2008.

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

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

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

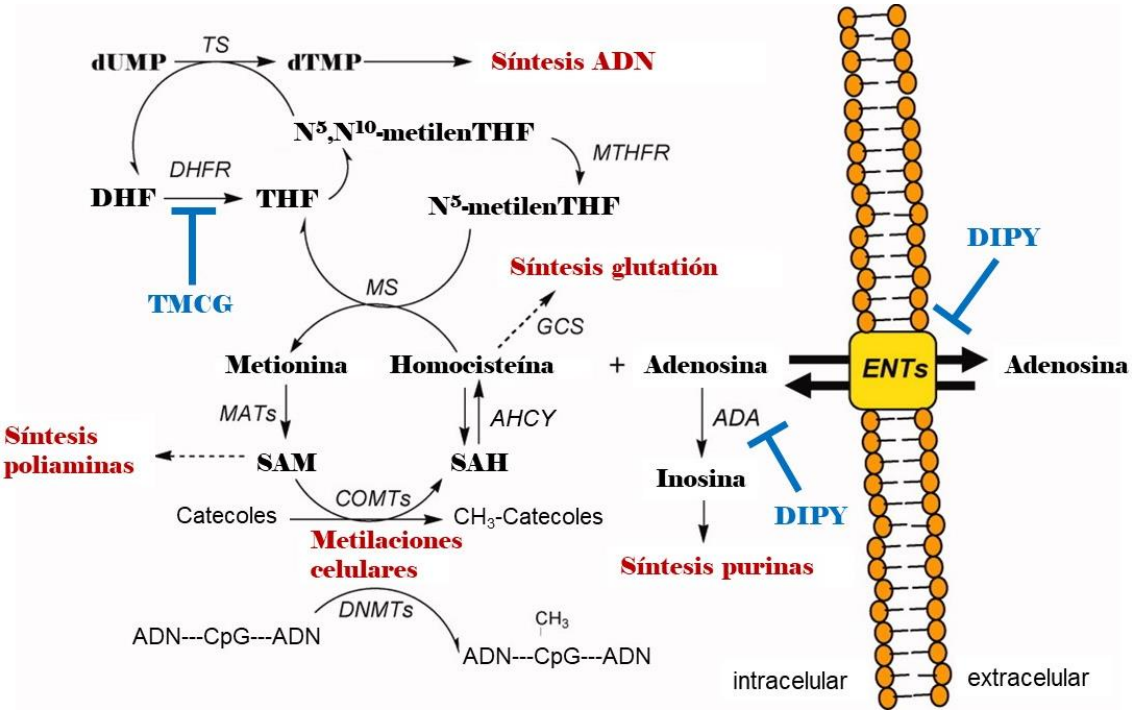



**Figura 2.45.** El ciclo de la metionina y sus conexiones con diversas rutas metabólicas y de supervivencia celular. ADA: adenosina desaminasa, AHCY: S-adenosilhomocisteína hidrolasa, COMTs: catecol-O-metiltransferasas, DHF: 7,8-dihidrofolato, DHFR: enzima dihidrofolato reductasa, DNMTs: metiltransferasas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

# Capítulo 3

## Objetivos

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

Usain Bolt

# CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

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

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

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

# Capítulo 4

## Técnicas e instrumentación

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

Michael Jordan

# CAPÍTULO 4. TÉCNICAS E INSTUMENTACIÓN

## 4.1. MODELOS EXPERIMENTALES

### 4.1.1. CULTIVOS CELULARES

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

#### 4.1.1.1. Mantenimiento

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

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

ambiente estéril en el interior, protegiendo así la muestra. Estas cabinas también tienen filtros y sistemas de flujo de aire que brindan protección tanto al ambiente como al operador. Por otro lado, los incubadores para cultivos celulares son dispositivos que regulan la temperatura, humedad y concentración de $CO_2$ en su interior. El incubador *Jouan IG650* (Thermo Scientific) se utilizó para cultivos que requieren una concentración de $CO_2$ del 7.5%, mientras que el incubador *Steri-Cult 3310* (Thermo Scientific) se empleó para aquellos que requieren una concentración de $CO_2$ del 5%. Ambos incubadores estaban regulados para mantener una temperatura de 37ºC, la cual era la temperatura óptima para todas las células empleadas en esta Tesis Doctoral. Para el almacenamiento de líneas celulares mediante criopreservación se usaron los depósitos de nitrógeno líquido *MVE CryoSystem* 4000 de Cyro Solutions y el *Locator 4* de Thermo Scientific (**Figura 4.1**).



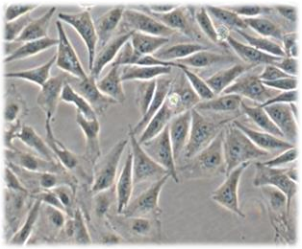

**Figura 4.1.** Cabina de flujo laminar, incubadores y depósito de nitrógeno líquido (de izquierda a derecha). Imágenes tomadas en la Sección de Cultivo de Tejidos de la UM.

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

Por otra parte, los medios de cultivo empleados se basan en una solución salina equilibrada y tamponada con bicarbonato de sodio. La cantidad de bicarbonato determina la concentración de $CO_2$ atmosférico necesaria para mantener el pH neutro de los medios de cultivo, por lo que se usan junto con frascos u otras superficies de cultivo ventiladas. Los medios EMEM y RPMI tienen una concentración de bicarbonato de 1.5 g/l y requieren una atmósfera del 5% de $CO_2$. En cambio, el medio DMEM tiene una concentración de bicarbonato de 3.7 g/l y requiere una atmósfera del 7.5-10% de $CO_2$. Todos comparten la necesidad de una atmósfera con un 95% de humedad.

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

**501-mel**



Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

Morfología: Poligonal-fusiforme.

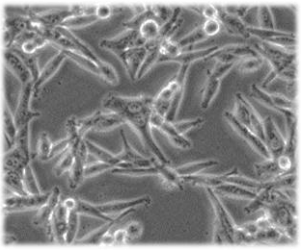
Origen: Melanoma metastásico.

Edad: No se especifica. Sexo: Femenino.

Tiempo de duplicación: ~ 32 horas.

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

**G-361**



Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

Morfología: Fusiforme.

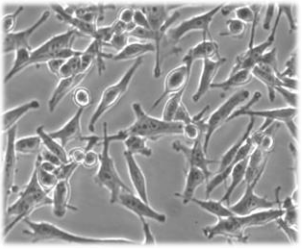
Origen: Piel, melanoma maligno.

Edad: 31 años. Sexo: Masculino.

Tiempo de duplicación: ~ 34 horas.

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

**IGR-37**



Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

Morfología: Fusiforme.

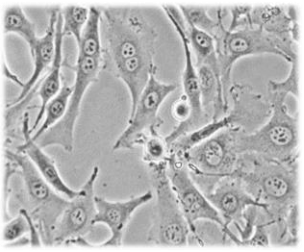
Origen: Nódulo linfático, melanoma maligno.

Edad: 26 años. Sexo: Masculino.

Tiempo de duplicación: ~ 60 horas.

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

**SK-MEL-28**



Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

Morfología: Poligonal.

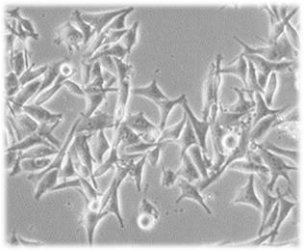
Origen: Piel, melanoma maligno.

Edad: 51 años. Sexo: Masculino.

Tiempo de duplicación: ~ 40 horas.

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

**SK-MEL-2**



Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

Morfología: Poligonal.

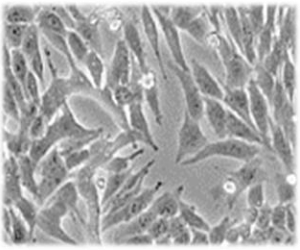
Origen: Piel, melanoma maligno.

Edad: 60 años. Sexo: Masculino.

Tiempo de duplicación: ~ 56 horas.

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

**A-375**



Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

Morfología: Poligonal-fusiforme.

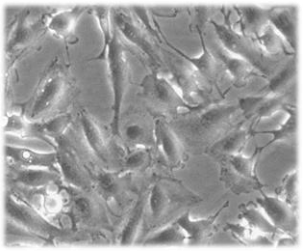
Origen: Piel, melanoma maligno.

Edad: 54 años. Sexo: Femenino.

Tiempo de duplicación: ~ 32 horas.

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

**IGR-39**



Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

Morfología: Poligonal.

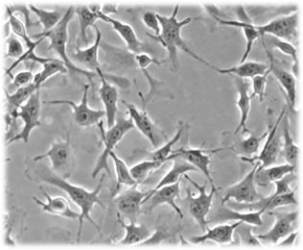
Origen: Piel, melanoma maligno.

Edad: 26 años. Sexo: Masculino.

Tiempo de duplicación: ~ 30 horas.

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

**B16-F10**



Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Mus musculus* (Ratón).

Cepa: C57BL/6.

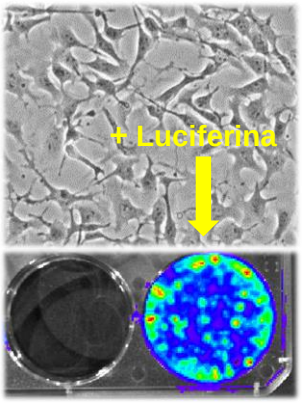
Morfología: Poligonal.

Origen: Piel, melanoma.

Tiempo de duplicación: ~ 18 horas.

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

**B16-F10-Luc2**




Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Mus musculus* (Ratón).

Cepa: C57BL/6.

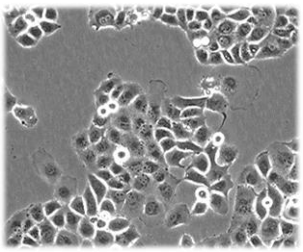
Morfología: Poligonal.

Origen: Piel, melanoma.

Tiempo de duplicación: ~ 18 horas.

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

**PANC-1**



Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

Morfología: Redondeada.

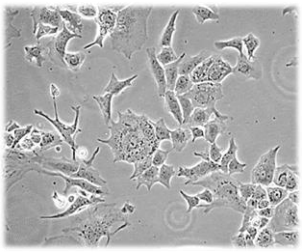
Origen: Conducto de páncreas, carcinoma epitelioide.

Edad: 56 años. Sexo: Masculino.

Tiempo de duplicación: ~ 32 horas.

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

**Hs 766T**



Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

Morfología: Pleomórfica.

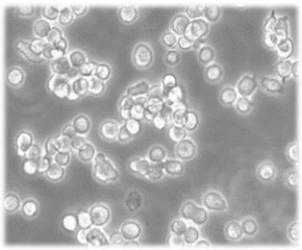
Origen: Nódulo linfático, carcinoma pancreático metastásico.

Edad: 64 años. Sexo: Masculino.

Tiempo de duplicación: ~ 48 horas.

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

**YAC-1**



Tipo de crecimiento: Suspensión.

Organismo: *Mus musculus* (Ratón).

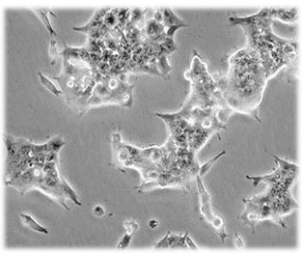
Morfología: Redondeada.

Origen: Linfoma.

Tiempo de duplicación: ~ 20 horas.

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

**HEK-293**



Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

Morfología: Poligonal, formando islas.

Origen: Riñón, embrión.

Edad: Feto. Sexo: Femenino.

Tiempo de duplicación: ~ 30 horas.

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

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

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

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

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

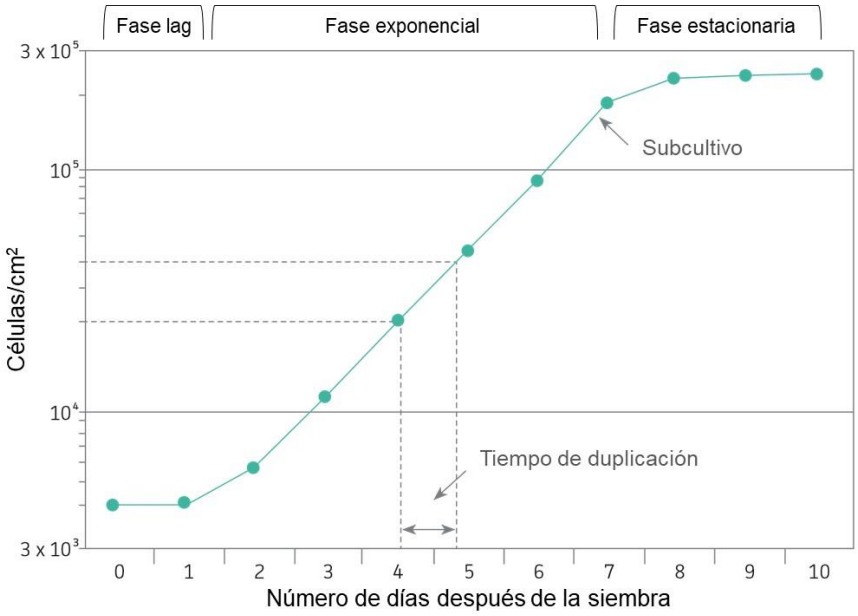



**Figura 4.2.** Curva de crecimiento teórica para una línea celular continua. Imagen traducida de la guía para cultivo de células animales de la ATCC.

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

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

#### 4.1.1.2. Subcultivo

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

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

#### 4.1.1.3. Crioconservación

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

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

#### 4.1.1.4. Tratamientos

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

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

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




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

### 4.1.2. MODELOS ANIMALES

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

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

#### 4.1.2.1. El ratón como modelo animal

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

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



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

**Ratones C57BL/6**

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

**Ratones Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu**

La mutación homocigota en el locus *nude* (nu/nu) se encuentra en varias cepas de ratones y es una mutación recesiva. Los ratones con esta mutación tienen ambos alelos del gen *FOXN1* mutados, el cual codifica la proteína Forkhead box protein N1. La expresión de *FOXN1* solo ocurre en piel y timo, por lo que la mutación nu/nu afecta a estos dos órganos. En la piel, causa problemas en el folículo piloso que resultan en la pérdida del pelo en los ratones. En el timo, la mutación nu/nu provoca una defectuosa maduración y diferenciación del estroma. Así pues, el timo de estos ratones es pequeño, quístico y no puede llevar a cabo una adecuada maduración de los linfocitos T. En este sentido, estos ratones se denominan como "atímicos" y se caracterizan por tener un número bajo de linfocitos T funcionales.

**Ratones Rag2-Il2rg doble *knockout* (R2G2)**

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

#### 4.1.2.2. Mantenimiento de los ratones

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

#### 4.1.2.3. Estudio de tumores primarios y metástasis

Para recrear el desarrollo de un tumor primario en la piel, se inyectaron $5x10^5$ de células de melanoma debajo de la piel del flanco dorsal del animal. La implantación subcutánea es sencilla de realizar, de bajo coste y permite una observación más fácil del desarrollo del tumor, por lo que sigue siendo ampliamente utilizada.

Por otro lado, se inyectaron el mismo número de células de melanoma ($5x10^5$) en la vena de la cola del ratón para estudiar la capacidad de colonización (última fase de metástasis) principalmente en pulmón, pero también en otros órganos. Primero se dilató durante unos minutos la vena de la cola del animal utilizando una lámpara de calor de luz roja o agua caliente y posteriormente se introdujeron las células, en un volumen de 100 µl de PBS estéril, utilizando una aguja de diámetro 30G x 1/2" (13 x 0.3 mm). Para realizar este procedimiento se usó un sistema de inmovilización del ratón (**Figura 4.5**).

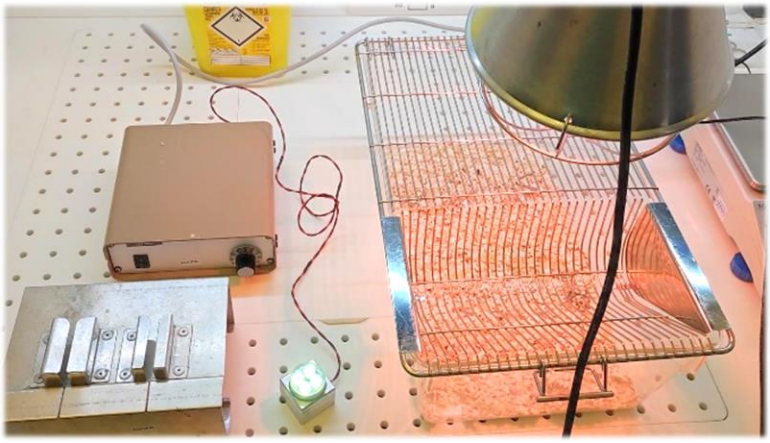


**Figura 4.5.** Equipo necesario para inmovilizar al ratón y dilatar la vena de su cola. Imagen tomada durante mi estancia en el centro de investigación Domus Medica tilbygg (Oslo, Noruega).

#### 4.1.2.4. Monitorización de tumores primarios y metástasis

Las células B16-F10-Luc2 utilizadas tienen la gran ventaja de producir la proteína luciferasa. De esta forma, cuando se les suministra el sustrato de la luciferasa, la luciferina, las células emiten luz, lo que se conoce como bioluminiscencia. Para visualizar los tumores primarios y las metástasis en ratones, se administró luciferina de luciérnaga (Caliper Life Sciences) a una dosis de 120 mg/kg por vía intraperitoneal y se utilizó el sistema de imagen *in vivo* (IVIS, *in vivo imaging system*) de Caliper Life Sciences (**Figura 4.6**). Este sistema codifica la intensidad de la luz detectada mediante un código de colores, en el que el azul representa una baja intensidad de señal y el rojo una alta intensidad de señal. La luz emitida por este proceso de bioluminiscencia se mide en unidades de fotones por segundo por centímetro cuadrado por estereorradián (ph/s/cm$^2$/sr).

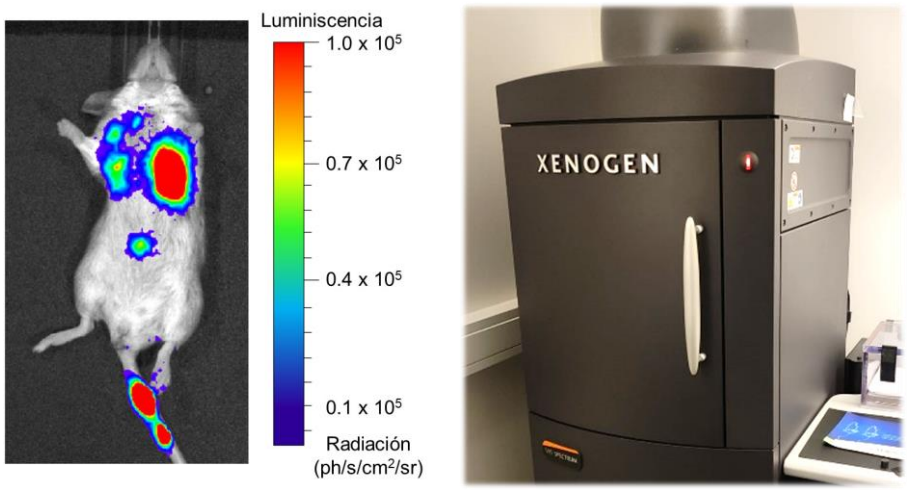



**Figura 4.6.** Imagen obtenida de un ratón con metástasis (izquierda) y sistema de imagen *in vivo* (IVIS) de Caliper Life Sciences (derecha). La escala de color indica la intensidad de luminiscencia. Imágenes tomadas durante mi estancia en el centro de investigación Domus Medica tilbygg (Oslo, Noruega).

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

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

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

## 4.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

### 4.2.1. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

#### 4.2.1.1. Tinción con azul tripán

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

El hemocitómetro o cámara de Neubauer es un portaobjetos diseñado específicamente para la cuantificación de células. Su superficie está impresa con una retícula compuesta por 9 cuadrados de 1 $mm^2$ cada uno. En las esquinas de esta retícula se encuentran 4 cuadrados que se dividen en 16 cuadrados más pequeños, de 0.0625 $mm^2$ cada uno. La profundidad de la cámara es fija, lo que permite la medición precisa del volumen y la cuantificación de células (**Figura 4.7**).




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

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

$$\text{Nº células viables/ml} = \text{Promedio de células viables por cuadro} \times 10000 \times \text{FD} \times 2$$

$$\text{Nº células muertas/ml} = \text{Promedio de células muertas por cuadro} \times 10000 \times \text{FD} \times 2$$

$$\text{Nº células totales/ml} = \text{Promedio de células totales por cuadro} \times 10000 \times \text{FD} \times 2$$

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

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

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

#### 4.2.1.2. Ensayo con MTT

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

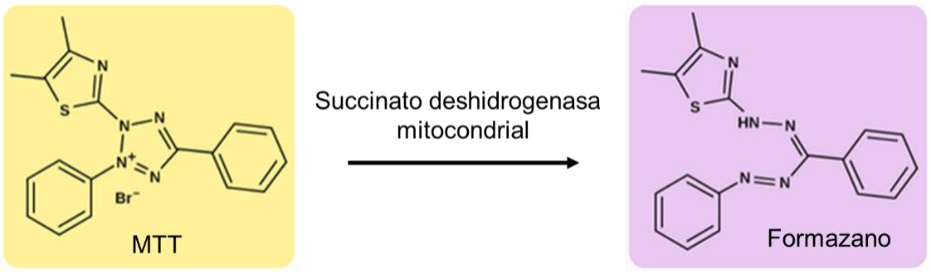



**Figura 4.8.** Reacción de la conversión de MTT a Formazano. Reacción llevada a cabo por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial. MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio.

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

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

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

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

#### 4.2.1.3. Tinción de cristal violeta

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

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

## 4.2.2. ENSAYOS DE APOPTOSIS

### 4.2.2.1. Detección de apoptosis mediante ELISA

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

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

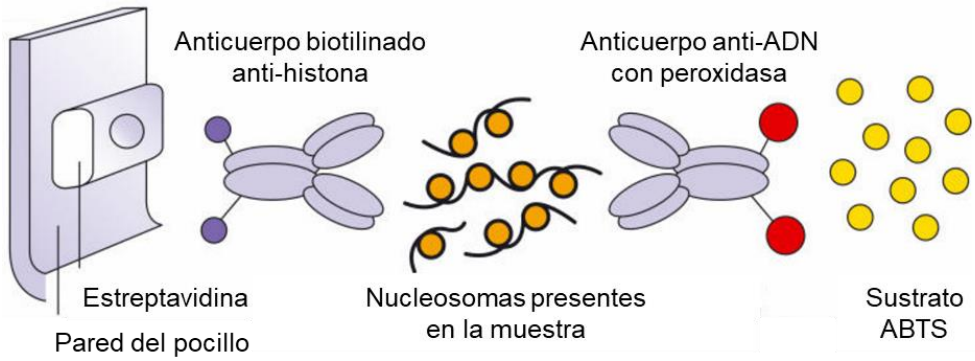



**Figura 4.9.** Esquema de los principales elementos del kit empleado para la detección de apoptosis mediante ELISA. ABTS: 2-2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-sulfónico). Imagen traducida del protocolo del kit *Cell Death Detection ELISA*$^{PLUS}$ (Roche).

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

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

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

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

#### 4.2.2.2. Ensayo TUNEL

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

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

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

### 4.2.3. MICROSCOPÍA

#### 4.2.3.1. Microscopía óptica

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

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

**Microscopía óptica de contraste de fases**

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

## Microscopía de fluorescencia

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

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



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

## Microscopía confocal

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

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

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

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

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



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

### 4.2.3.2. Microscopía electrónica

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

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

**Microscopía electrónica de transmisión**

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



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

### 4.2.4. INMUNOFLUORESCENCIA

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

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

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

### 4.2.5. INMUNOHISTOQUÍMICA

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

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

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

**Desparafinado e hidratación**

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

**Desenmascaramiento antigénico**

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

**Inhibición de la actividad peroxidasa endógena**

Debido a que el proceso de revelado de las muestras depende de la actividad catalítica de la enzima peroxidasa sobre un sustrato cromogénico, es necesario inhibir cualquier actividad peroxidasa intrínseca que pueda estar presente en el tejido, para evitar una tinción no específica. Para lograr esto, se incubaron las muestras en una solución de $H_2O_2$ al 3% en metanol a temperatura ambiente y protegidas de la luz durante 20 minutos. El uso de una alta concentración de peróxido de hidrógeno puede provocar una inhibición por exceso de sustrato de la peroxidasa. Después, las muestras se lavaron primero una vez con PBS y luego una vez con PBS-T, ambos lavados en agitación y durante 5 minutos. PBS-T es una solución de PBS que contiene un 0.05% de Tween-20 (v/v).

**Bloqueo de uniones inespecíficas**

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

**Incubación con el anticuerpo primario**

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

**Incubación con el anticuerpo secundario**

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

**Revelado**

Para realizar el revelado de las muestras se preparó una solución formada por PBS, 3,3'-diaminobencidina (DAB) y $H_2O_2$. Por ejemplo, para preparar 45 ml de esta mezcla se utilizaron 30 mg de DAB, 36 µl de $H_2O_2$ y se completó hasta 45 ml con PBS. La oxidación del DAB produce un color pardo-anaranjado. Las muestras fueron incubadas en esta solución durante 1-10 minutos, hasta que se observó la aparición de color en las muestras. Posteriormente, con el fin de evaluar la intensidad del marcaje, las muestras fueron lavadas con PBS y se observaron al microscopio óptico.

**Tinción con hematoxilina y eosina**

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

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

**Deshidratación y montaje**

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

**Cuantificación de la señal**

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

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

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

### 4.2.6. CITOMETRÍA DE FUJO

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

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

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

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

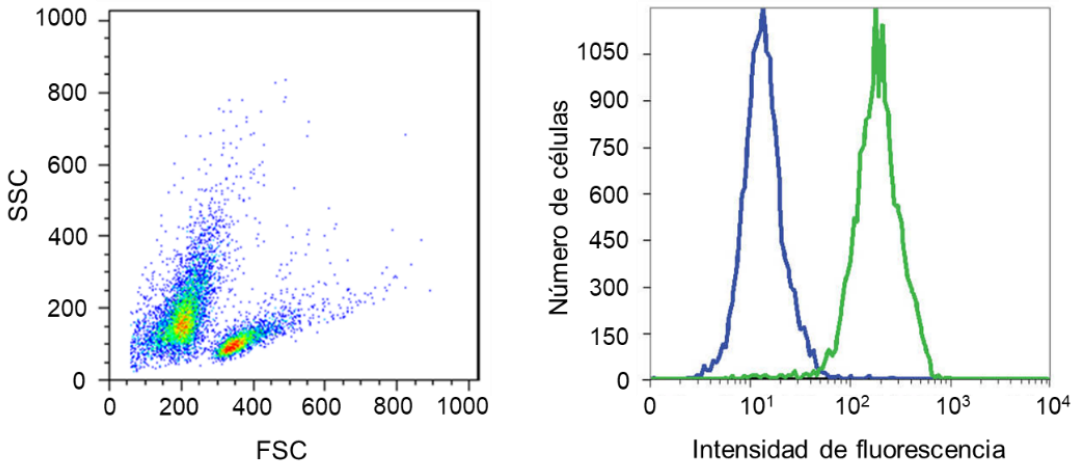



**Figura 4.13.** Diagrama de puntos o "dot plot" con un doble marcaje (izquierda) e histograma que representa la intensidad de fluorescencia de un determinado marcador (derecha). FSC: dispersión frontal de la luz, SSC: dispersión lateral de la luz. Imágenes adaptadas de Cell Signalling Tecnology.

#### 4.2.6.1. Análisis de marcadores mediante citometría de flujo

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

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

Este protocolo fue utilizado para procesar aquellas muestras en las que nos interesaba analizar y cuantificar proteínas intracelulares, así como la fracción total de aquellas proteínas que se expresaban tanto dentro de la célula como a nivel de membrana. Para ello, se llevó a cabo un protocolo que permitió la permeabilización de las células. Primero se realizó la tripsinización de las muestras celulares, se lavaron una vez con PBS, mediante centrifugación a 1400 rpm durante 4 minutos, y se cogieron $1x10^6$ células. A continuación, se llevó a cabo la fijación y permeabilización de las células con metanol 100% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó un bloqueo de posibles uniones inespecíficas durante 5 minutos con el tampón de incubación (IB, *incubation buffer*), formada por BSA al 0,5% en PBS.

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

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

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

Por un lado, para el estudio de proteínas de membrana, las células fueron tripsinizadas y lavadas con PBS frío durante 5 minutos a una velocidad de centrifugación de 1400 rpm y una temperatura de 4ºC. Se cogieron $1x10^6$ células para cada condición experimental y se fijaron con paraformaldehído a 4ºC durante 10 minutos. A continuación, se lavaron las células con PBS durante 5 minutos a 1400 rpm y se incubaron durante 10-15 minutos con el IB a temperatura ambiente. A continuación, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo un lavado con el IB y la incubación con el pertinente anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, las células fueron lavadas con el IB durante 4 minutos a 2000 rpm y resuspendidas en PBS para su posterior adquisición. Los anticuerpos empleados fueron disueltos en el IB a la concentración indicada en cada caso.

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

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

**Adquisición de células en el citómetro de flujo**

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




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

**Análisis de los datos obtenidos en el citómetro de flujo**

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

#### 4.2.6.2. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

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

Así pues, para los estudios realizados sobre el ciclo celular, primero se tripsinizaron las células y se resuspendieron $1x10^6$ células en un volumen de 200 µl de PBS a 4ºC. A continuación, se añadieron 750 µl de etanol 100% a las muestras y se incubaron durante 1 hora en hielo. Transcurrido ese tiempo, las muestras fueron centrifugadas a una velocidad de 2000 rpm durante 4 minutos y se resuspendieron en 250 µl de una

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

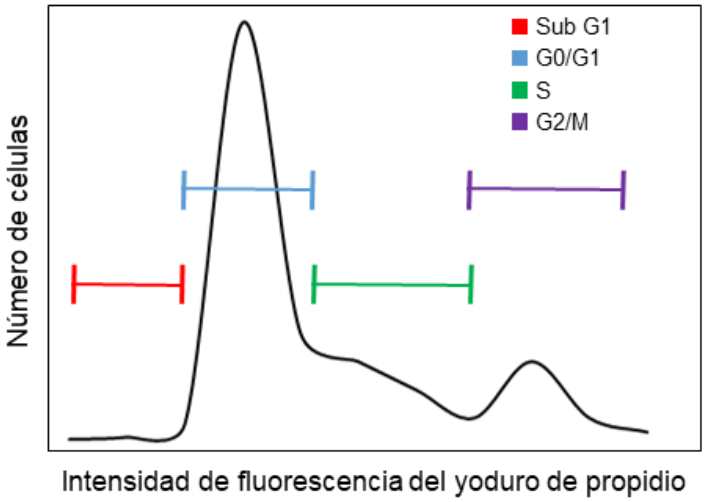



**Figura 4.15.** Histograma representativo de las diferentes fases del ciclo celular después de la tinción con yoduro de propidio. Imagen adaptada de Nexcelom Bioscience.

### 4.2.7. ANÁLISIS DEL METABOLISMO CELULAR

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



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

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

El ensayo comienza incubando las células en el *Seahorse XF Glycolytic Rate Assay Medium*, el cual contiene sustratos como glucosa, glutamina y piruvato, además de un tampón HEPES. Durante esta etapa, se registran las tasas basales de consumo de oxígeno durante tres períodos de medición para establecer una referencia. Luego, se realiza la primera inyección de Rotenona y Antimicina A (Rot/AA), que son inhibidores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (**Figura 4.17**). Estos inhibidores reducen el consumo de oxígeno mitocondrial y, por consiguiente, la producción de protones derivados del $CO_2$. Esto permite evaluar el impacto de la función mitocondrial en el metabolismo celular. La segunda inyección consiste en 2-deoxi-D-glucosa (2-DG), un análogo de la glucosa que actúa como un inhibidor de la glucólisis. El 2-DG se une de manera competitiva a la enzima glucosa hexoquinasa, que es la primera enzima de la vía glucolítica. Al inhibir la glucólisis, se observa una disminución en PER. Esto confirma de manera cualitativa que la PER producida antes de la inyección se debe principalmente a la actividad de la glucólisis (**Figura 4.17**). Así, este ensayo permite obtener información valiosa sobre la contribución de la función mitocondrial y la glucólisis en el metabolismo celular, permitiendo un análisis más completo de la vía metabólica y sus implicaciones en diferentes condiciones experimentales.

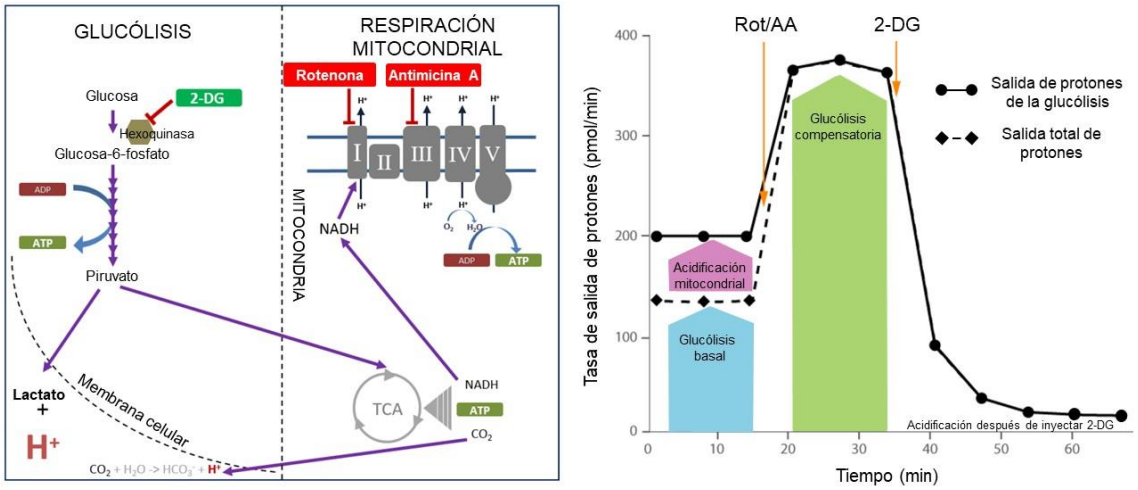



**Figura 4.17.** Fundamento del ensayo empleado para la medida de glucólisis celular. Se muestra un esquema que indica el lugar de acción de los diferentes inhibidores empleados (izquierda) y el perfil de la gráfica obtenida a partir de la medida de la producción de protones (derecha). 2-DG: 2-deoxi-D-glucosa.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

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

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

### 4.2.8. ENSAYOS DE LUCIFERASA

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

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

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

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

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

### 4.2.9. MEDIDA DE LA GLUCOSA INTRACELULAR

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

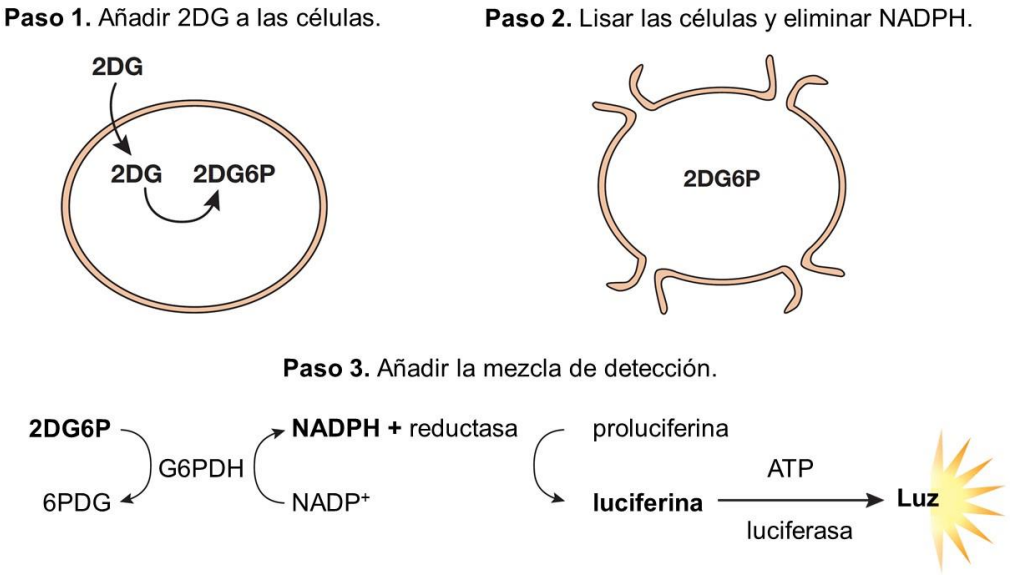



**Figura 4.18.** Esquema del ensayo empleado para medir la captación de glucosa por parte de las células. 2DG: 2-deoxi-D-glucosa, 2DG6P: 2-deoxi-D-glucosa-6-fosfato, G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Imagen adaptada del protocolo del kit *Glucose Uptake-Glo* (Promega).

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

### 4.2.10. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

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

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

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

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

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

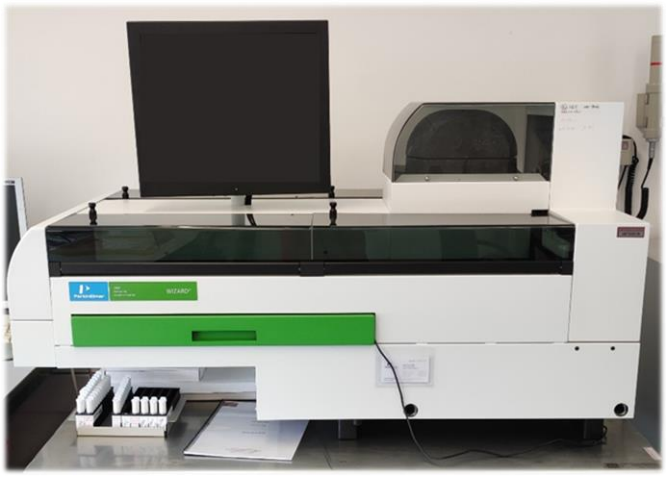


**Figura 4.19.** Contador de centelleo gamma *Wizard2 2480* de Perkin Elmer. Imagen tomada en la Sección de Radioprotección y Residuos de la UM.

## 4.3. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

### 4.3.1. DETECCIÓN DE CONTAMINACIONES POR MICOPLASMA

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

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

### 4.3.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE BRADFORD

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

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

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

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

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

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

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

### 4.3.3. ELECTROFORESIS

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

#### 4.3.3.1. SDS-PAGE

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

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



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

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

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

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

**Preparación de las muestras a partir de células en cultivo**

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

**Fraccionamiento celular**

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

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

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

### 4.3.4. WESTERN BLOT

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

**Inmovilización de proteínas sobre una membrana mediante electrotransferencia**

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

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

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

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

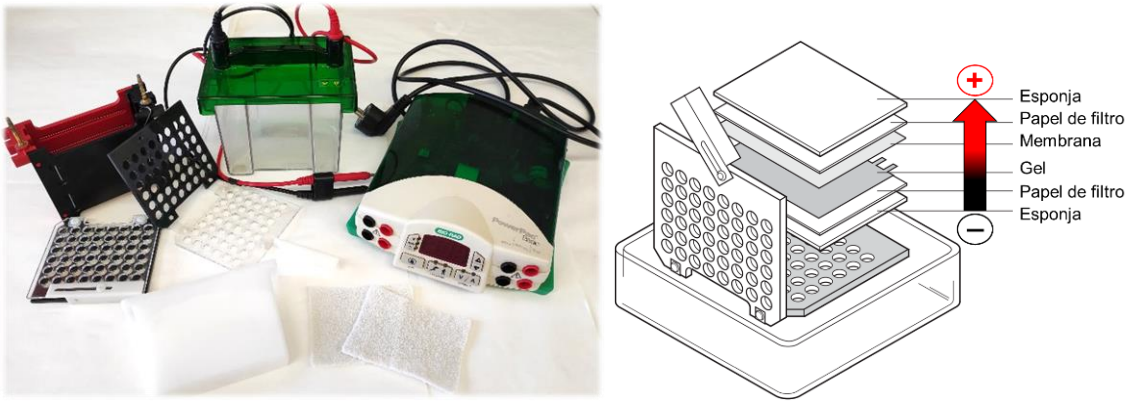



**Figura 4.21.** Componentes del sistema empleado para realizar la técnica de Western blot (izquierda) y sentido de migración de las proteínas desde el gel hacia la membrana (derecha). La imagen con los accesorios del sistema (izquierda) ha sido tomada en nuestro laboratorio, mientras que la imagen que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

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

**Bloqueo de las uniones inespecíficas de la membrana**

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

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

**Incubación con el anticuerpo primario**

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

**Incubación con el anticuerpo secundario**

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

**Revelado de la actividad peroxidasa**

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

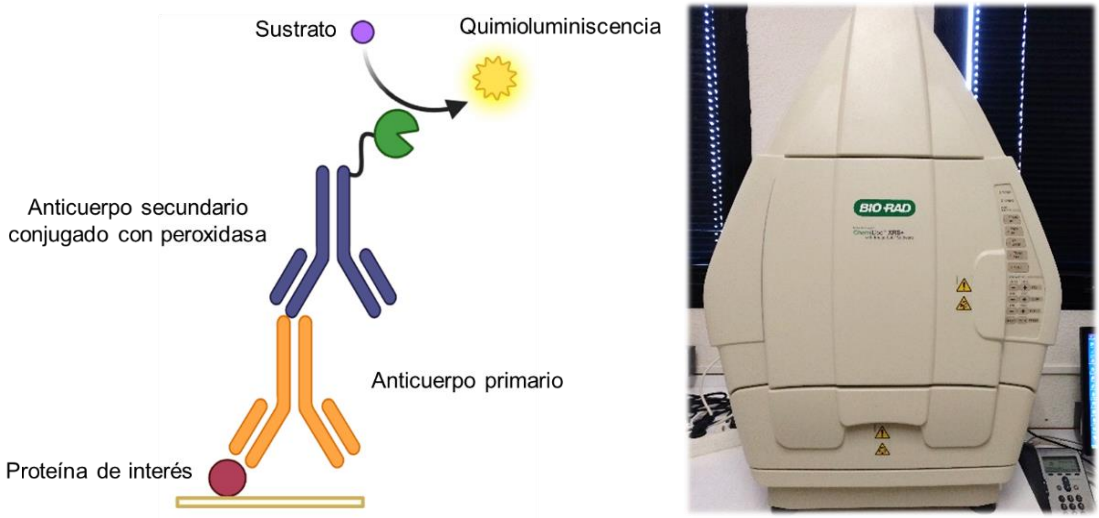



**Figura 4.22.** Revelado mediante quimioluminiscencia. La imagen del diagrama de revelado de la actividad peroxidasa (izquierda) ha sido elaborada a partir del protocolo, mientras que la imagen del dispositivo *Molecular Imager ChemiDoc XRS+* de BioRad (derecha) ha sido tomada en nuestro laboratorio.

***Stripping***

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

### 4.3.5. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

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

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

recuento aproximado de unas $5x10^6$ células. Las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS frío, centrifugando a 200 × g durante 5 minutos. Después del último lavado, el precipitado fue resuspendido con 500 µl de un tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, 180 mM NaCl, NP40 0.4%) al cual se le añadieron inhibidores enzimáticos como inhibidores de proteasas, fosfatasas, demetilasas y desacetilasas con el fin de preservar las modificaciones postraduccionales de la proteína de interés. Las células se incubaron con el tampón de lisis durante 10-15 minutos en hielo, agitando en vórtex cada 1-2 minutos. Los lisados se centrifugaron a 20000 × g durante 20 minutos a 4ºC para sedimentar los restos celulares. Se tomó una alícuota del sobrenadante, que contiene las proteínas, para cuantificarlas mediante la técnica de Bradford. Una vez evaluada la concentración de proteína, se cogió el volumen de sobrenadante correspondiente a 1 mg de proteína y se diluyó con tampón de dilución. Por cada 500 µl de sobrenadante se agregaron 500 µl de tampón de dilución (Tris-HCl 50 mM pH 8, 2.5 mM $CaCl_2$, NP40 0.4%) suplementado con inhibidores enzimáticos y ADNasa I. El tampón de dilución reduce la concentración de NaCl y ayuda a la unión del anticuerpo, y la ADNasa clarifica la muestra al eliminar el ADN que podría obstruir los sitios de unión del anticuerpo en las microesferas magnéticas. Una vez diluida la muestra con nuestra proteína de interés se llevó a cabo una etapa de lavado o *pre-clearing* con el fin de descartar todo aquello que se unía inespecíficamente a las microesferas. Para ello, se realizó una incubación de la muestra con 50 µl de la suspensión de microesferas (lavadas) durante 2 horas a 4ºC en rotación giratoria y se cogió de nuevo el sobrenadante con ayuda de una gradilla magnética. Posteriormente, se agregó el anticuerpo primario a la muestra y se incubó a 4ºC durante toda la noche en una rueda giratoria para permitir la formación de los complejos antígeno-anticuerpo.

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

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

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

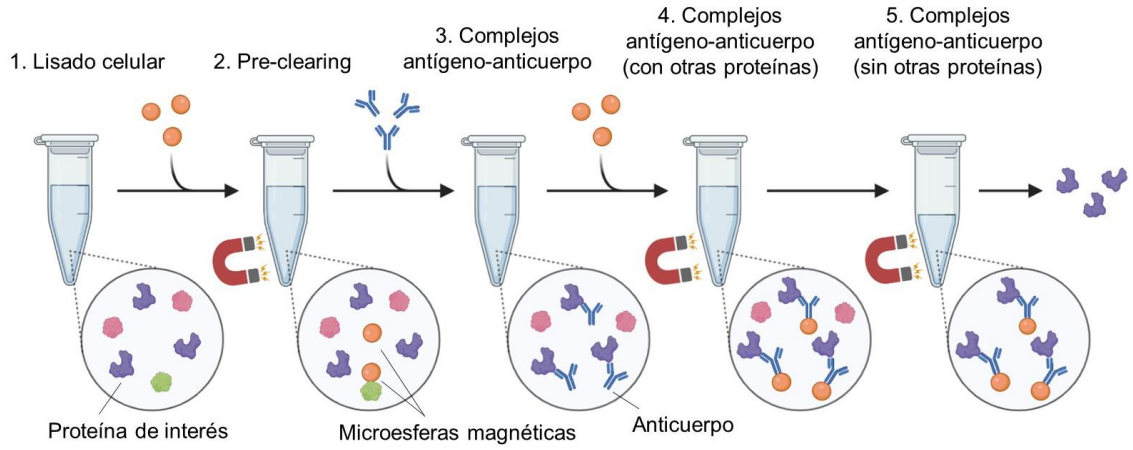



**Figura 4.23.** Diagrama del proceso de inmunoprecipitación indirecta con microesferas magnéticas de proteína G. Imagen elaborada a partir del protocolo.

### 4.3.6. CENTRIFUGACIÓN

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



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

#### 4.3.6.1. Separación de células mononucleares por centrifugación isopícnica

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

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

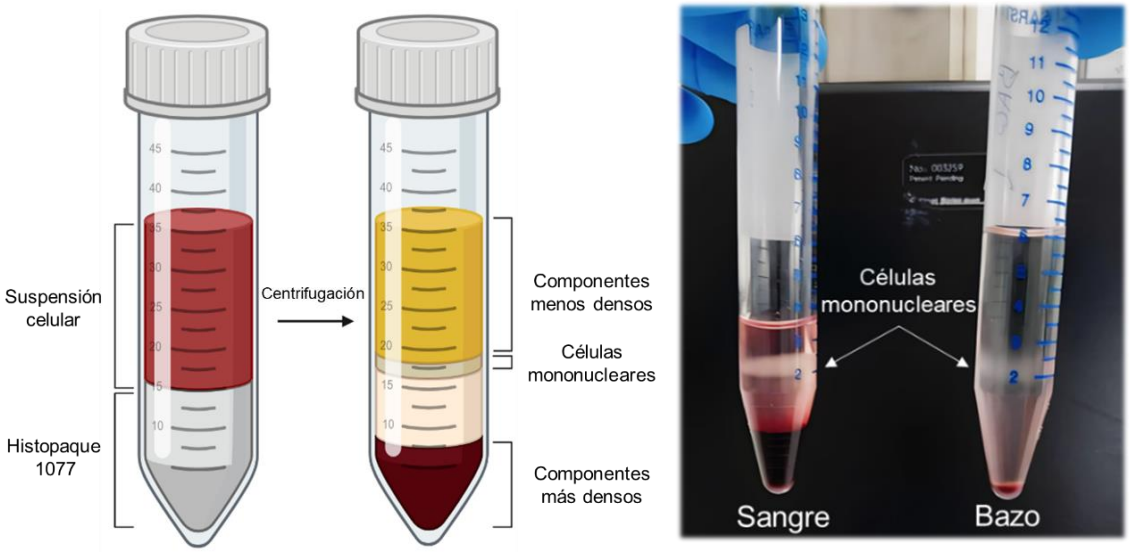



**Figura 4.25.** Separación de los componentes de una suspensión celular según su densidad mediante la solución de *Histopaque-1077.* La imagen del esquema del proceso de separación (izquierda) ha sido elaborada a partir del protocolo, mientras que la imagen que muestra el resultado (derecha) ha sido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

### 4.3.7. AISLAMIENTO DE CÉLULAS NK

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

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

Primero se determinó el número de células de la suspensión celular obtenida tras la centrifugación isopícnica y se cogió una alícuota de $2x10^5$ células para su posterior evaluación por citometría de flujo. La suspensión celular restante se centrifugó a 300 × g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió añadiendo 40 µl por cada $10^7$ de células totales con tampón de dilución (0.5% BSA, 2 mM EDTA, pH 7.2 en PBS). A continuación, se agregaron 10

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

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

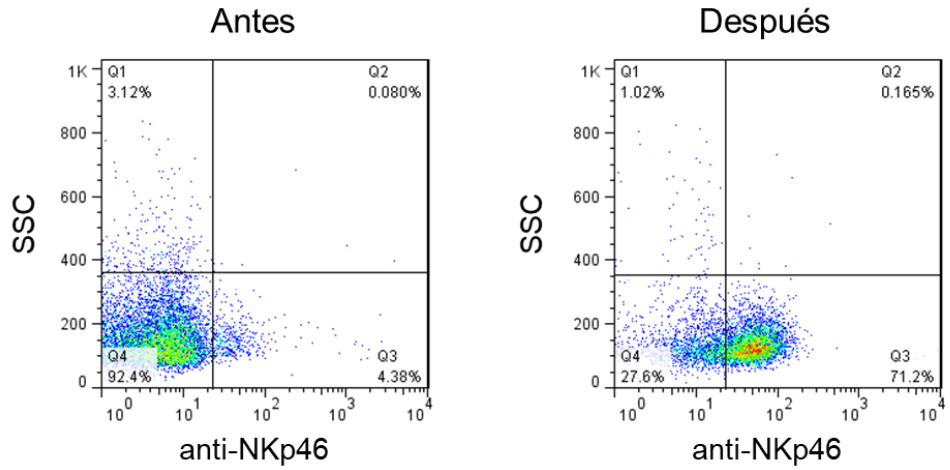



**Figura 4.26.** Análisis por citometría de flujo de la población de células NK antes y después de la purificación. SSC: dispersión lateral de la luz. Imágenes elaboradas a partir de los resultados obtenidos durante el proceso de purificación.

### 4.3.8. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE

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

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

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

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

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

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

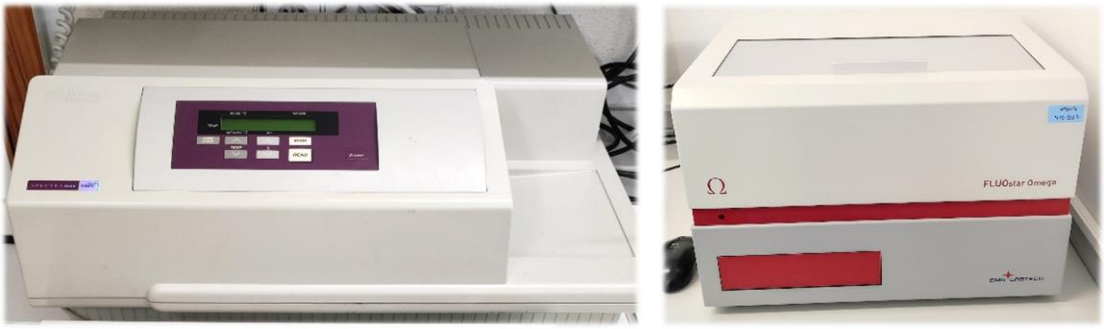



**Figura 4.27.** Lectores de placas *SpectraMax 340PC384* de Molecular Devices (izquierda) y *FLUOstar Omega* de BMG LabTech (derecha). Imágenes tomadas en nuestro laboratorio y en la Sección de Cultivo de Tejidos de la UM.

### 4.3.9. ENSAYOS ELISA

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

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

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

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

#### 4.3.9.1. Cuantificación de SAM y SAH

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

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

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

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

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

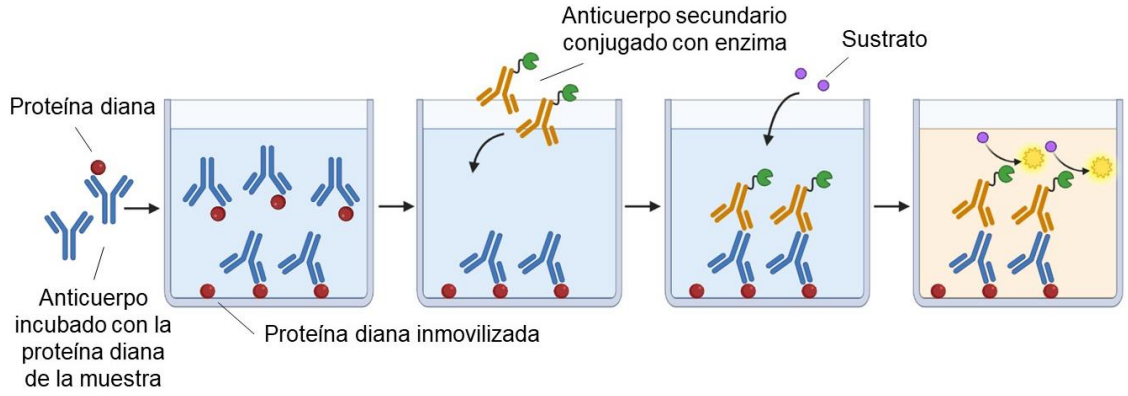



**Figura 4.28.** Diagrama de un ensayo ELISA de tipo competitivo. Imagen elaborada a partir del protocolo.

#### 4.3.9.2. Cuantificación MIC-A/B

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

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

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

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

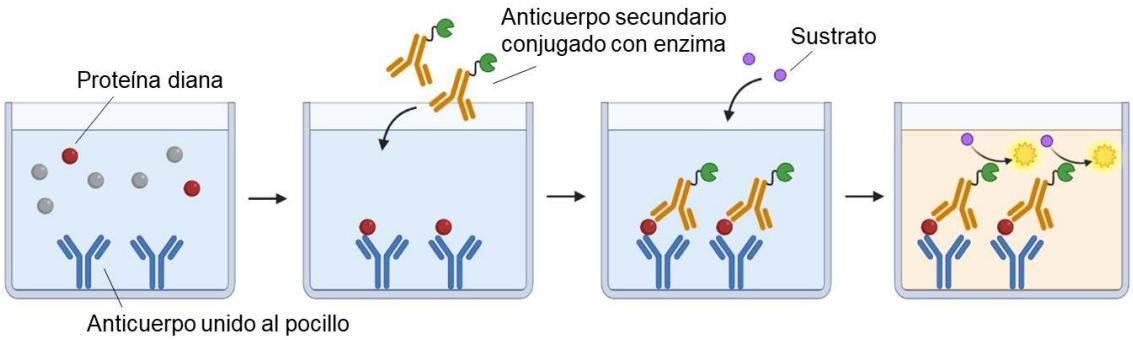



**Figura 4.29.** Diagrama de un ensayo ELISA de tipo sándwich. Imagen elaborada a partir del protocolo.

### 4.3.10. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA DE PP2A

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

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

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

**Preparación de las disoluciones de verde de malaquita y fosfopéptido**

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

**Preparación de la curva estándar de fosfato**

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

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

**Preparación de las muestras**

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

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

**Inmunoprecipitación de PP2A y ensayo enzimático**

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

### 4.3.11. CUANTIFICACIÓN DE AUTOFAGOSOMAS

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

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

### 4.3.12. MEDIDA DE KRAS ACTIVADO

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

En el primer kit se utilizan perlas de agarosa visibles para precipitar selectivamente la forma activa de la proteína KRAS. A continuación, esta pequeña GTPasa precipitada se detecta mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico de la proteína diana. Para realizar el procedimiento, las células fueron lisadas añadiendo 1 ml de tampón de ensayo (25 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 2% glicerol) e incubando durante 15 minutos en hielo. Los lisados fueron centrifugados a 14000 × g durante 10 minutos a 4ºC y se recolectó el sobrenadante.

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

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

## 4.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 4.4.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

#### 4.4.1.1. Extracción y purificación de ADN genómico

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

**Preparación de los lisados**

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

**Unión del ADN a la membrana de purificación**

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

**Lavados del ADN**

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

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

**Elución del ADN**

A cada columna se agregaron 50 µl de agua ultrapura libre de nucleasas, asegurando que el líquido caía en el centro de la membrana. Los tubos se incubaron durante 1 minuto a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 11000 × g durante 2 minutos. Los viales de 1.5 ml que contenían el ADN genómico purificado se almacenaron a -20ºC hasta su uso.

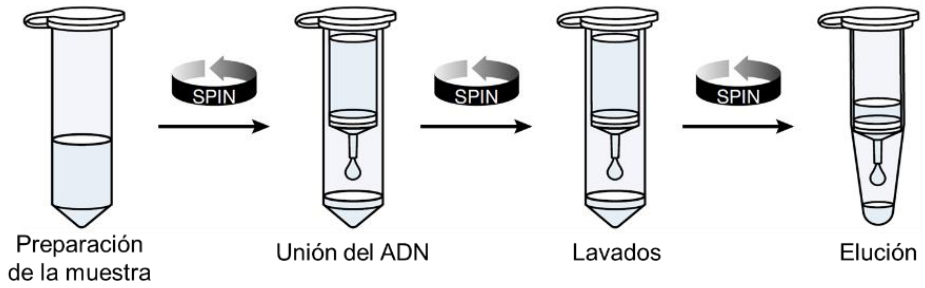



**Figura 4.30.** Diagrama del proceso de purificación de ADN. Imagen elaborada a partir del protocolo.

### 4.4.1.2. Extracción y purificación de ARN total

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

**Preparación de los lisados y adición de etanol**

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

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

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

**Lavados del ARN**

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

**Elución del ARN**

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

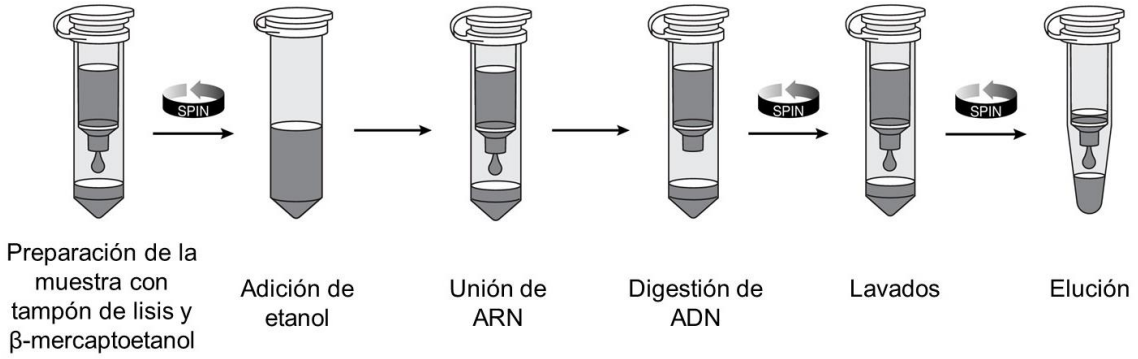



**Figura 4.31.** Diagrama del proceso de extracción y purificación de ARN total. Imagen elaborada a partir del protocolo.

### 4.4.2. RETROTRANSCRIPCIÓN

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

Para ello, se utilizó el kit comercial *First-Strand cDNA Synthesis* de NZYTech. Dependiendo de la concentración inicial de ARN, se añadió el volumen de muestra correspondiente a 1 µg de ARN total (entre 2 y 8 µl) a un tubo de reacción. Además, se agregaron 10 µl de una mezcla de reacción 2X (oligonucleótidos aleatorios, $MgCl_2$ y dNTPs), 2 µl de enzima ADNasa y, en caso necesario, se completó el volumen hasta 20 µl con agua libre de ARNasas. La mezcla se mezcló suavemente y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incubó a 50ºC por un tiempo de 30 minutos en un termociclador *Mastercycler personal* de Eppendorf (**Figura 4.32**). Transcurrido ese tiempo, se detuvo la reacción por calor a 85ºC durante 5 minutos y posteriormente, se añadió 1 µl ARNasa H y se incubó a 37ºC durante 20 min para eliminar el enlace de ARN con el ADNc. Finalmente, el producto de ADNc fue almacenado a -20ºC.

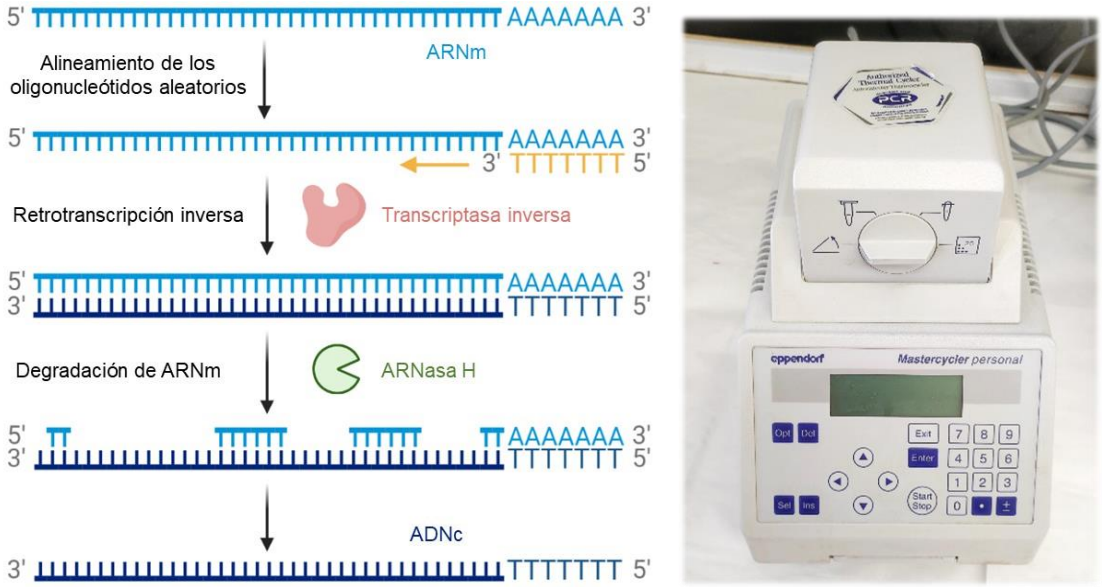



**Figura 4.32.** Esquema del proceso de retrotranscripción (izquierda) y termociclador *Mastercycler personal* de Eppendorf (derecha). La imagen del esquema (izquierda) ha sido elaborada a partir del protocolo, mientras que la imagen del termociclador ha sido tomada en nuestro laboratorio.

### 4.4.3. ANÁLISIS DE CANTIDAD Y CALIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS

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




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

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

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

### 4.4.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

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

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

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

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

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

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

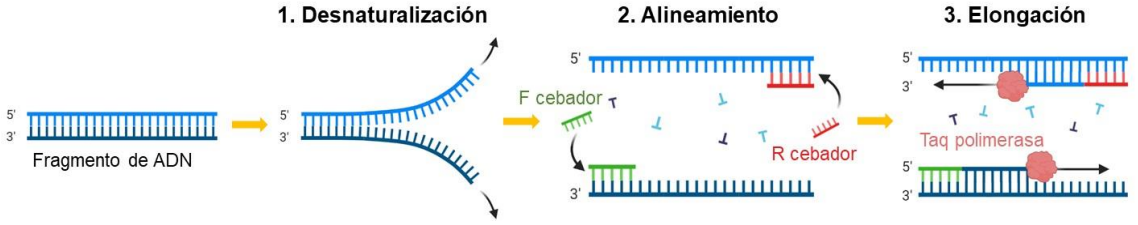



**Figura 4.34.** Diagrama de las etapas secuenciales durante el proceso de PCR. F cebador: cebador sentido. R cebador: cebador antisentido. Imagen elaborada a partir del fundamento de la técnica.

#### 4.4.4.1. PCR convencional

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

Para realizar la amplificación del ADN diana, se añadió un volumen equivalente a 0.5-1 µg de ADN genómico previamente purificado a un tubo de PCR, y se ajustó a 8 µl con agua ultrapura libre de nucleasas. Luego, se agregaron 1 µl de cebador *forward* y 1 µl de cebador *reverse* (con una concentración final de 0.2 µM para cada uno), 14 µl y 25 µl de la mezcla *AmpliTaq Gold 360 Master Mix* de Life Technologies, dando lugar a un volumen final de 50 µl. La mezcla *AmpliTaq Gold 360 Master Mix* es un tampón comercial optimizado para reacciones de PCR, que incluye la Taq polimerasa, los 4 dNTPs e iones $Mg^{2+}$. El tubo se agitó y se centrifugó unos segundos para asegurar que todo el volumen estuviera en el fondo. Se utilizó un tubo de control negativo en el que

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

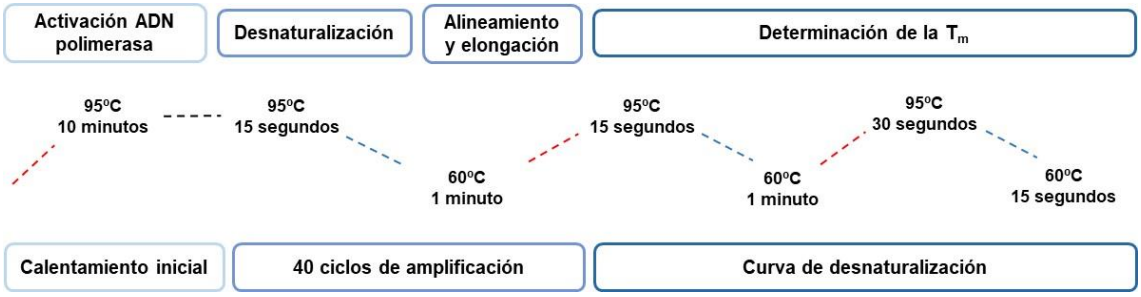



**Figura 4.35.** Esquema de las condiciones empleadas para los experimentos de PCR convencional. Imagen elaborada a partir del protocolo.

### 4.4.4.2. PCR cuantitativa, PCR en tiempo real o qPCR

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




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

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

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

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

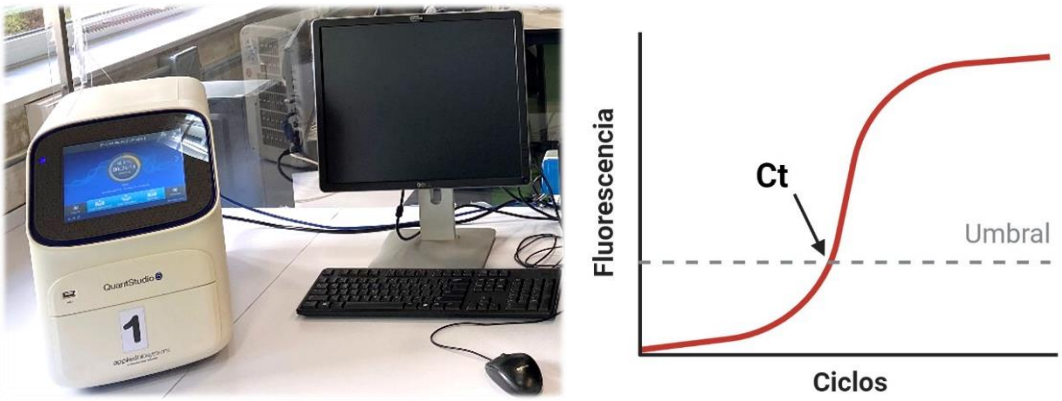



**Figura 4.37.** Equipo *QuantStudioTM 5 Flex* (izquierda) y representación de una curva de amplificación obtenida en una PCR en tiempo real (derecha). La imagen del dispositivo (izquierda) ha sido tomada en la Sección de Biología Molecular de la UM, mientras que la imagen de la curva de Ct ha sido elaborada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

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

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

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

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

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

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(condición\ control) - \Delta Ct(tratamiento)$$

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

$$a\ un\ tratamiento\ respecto\ al\ control\ no\ tratado$$

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

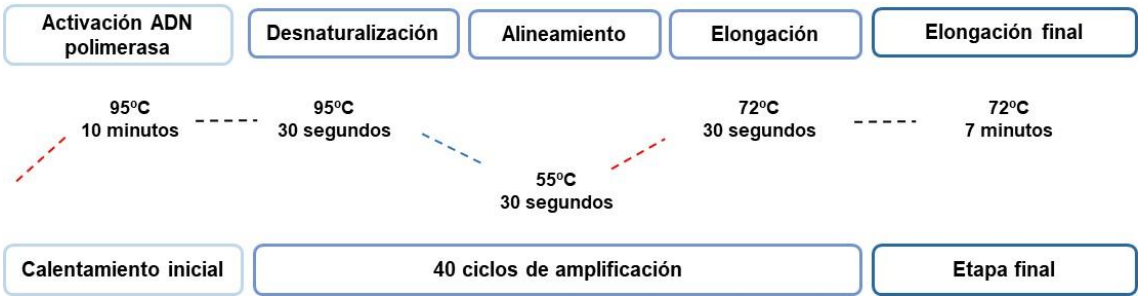



**Figura 4.38.** Esquema de las condiciones empleadas para los experimentos de PCR en tiempo real. Imagen elaborada a partir del protocolo.

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

### 4.4.5. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN GEL DE AGAROSA

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

**Preparación del gel y el tampón**

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

**Preparación de las muestras**

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

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

**Desarrollo de la electroforesis**

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

**Visualización y cuantificación**

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

### 4.4.6. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

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

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

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

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

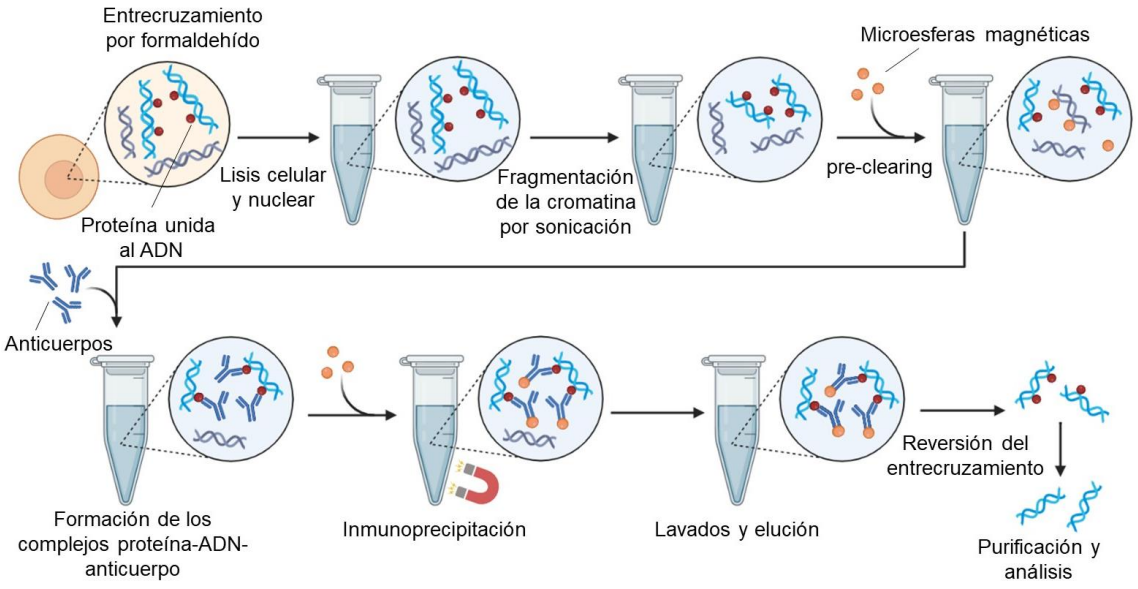



**Figura 4.39.** Diagrama de las principales etapas de la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Imagen elaborada a partir del protocolo.

## Entrecruzamiento ADN-proteínas y lisis de los núcleos

Para realizar los ensayos de ChIP se utilizaron suspensiones celulares con un recuento de más de cinco millones de células. Las células se cultivaron hasta una confluencia del 80% en frascos de 150 $cm^2$, con una capacidad máxima aproximada de 10 millones de células.

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

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

**Fragmentación de la cromatina**

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

**Inmunoprecipitación de los complejos proteína-ADN**

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

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

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

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

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

**Purificación del ADN**

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

**Análisis de los fragmentos de ADN purificado mediante qPCR**

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

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

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

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

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

### 4.4.7. SOBREEXPRESIÓN TRANSITORIA DE UN GEN

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

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

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

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




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

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

### 4.4.8. TRANSFECCIÓN ESTABLE DE ADN

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

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

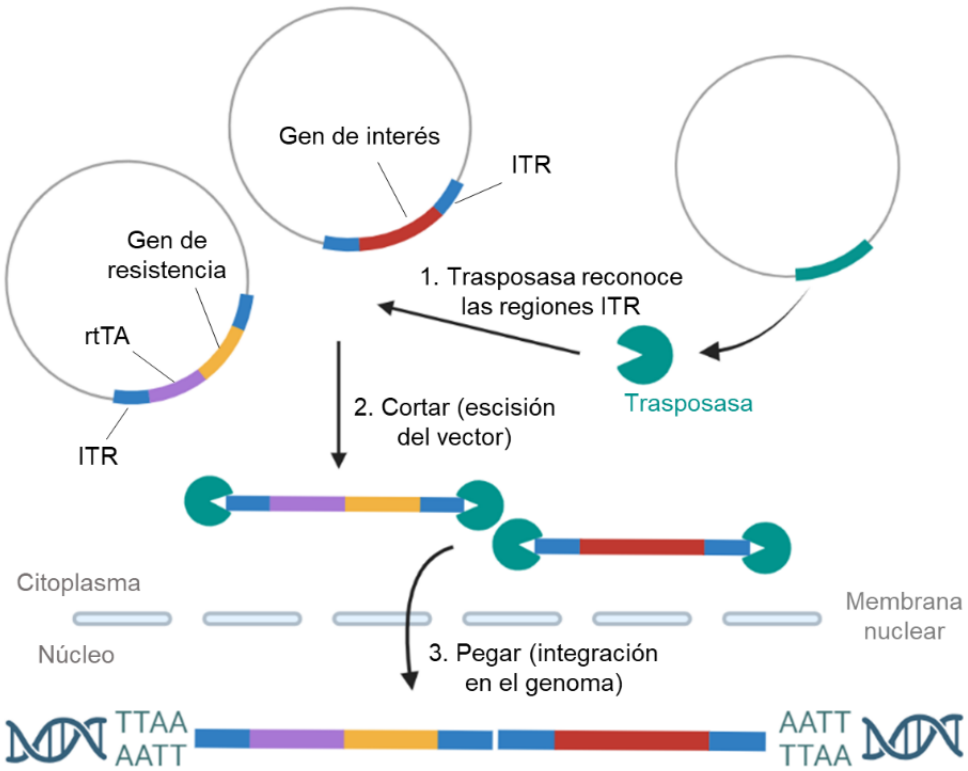



**Figura 4.41.** Diagrama de los principales pasos que se llevan a cabo con el sistema el sistema *PiggyBac* para integrar una o varias secuencias de ADN en el genoma de la célula. ITR: repetición terminal invertida. Imagen elaborada a partir del fundamento de la técnica.

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

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

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

### 4.4.9. SILENCIAMIENTO GÉNICO TRANSITORIO MEDIANTE INTERFERENCIA POR ARN

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

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

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

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

### 4.4.10. SILENCIAMIENTO GÉNICO ESTABLE MEDIANTE CRISPR/Cas9

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

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

**1. Plásmido knockout: Cas9 y ARN guía**

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

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

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

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

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

## 3. Plásmido HDR: reparación y selección

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

El sistema NHEJ es el mecanismo de reparación de ADN más activo y eficiente para las DSBs generadas por el complejo Cas9-ARNg, aunque es más propenso a cometer errores. A menudo, el NHEJ provoca pequeñas inserciones o deleciones en el sitio de la DSB pudiendo ocasionar cambios en la lectura del código genético durante la traducción, como la inserción o deleción de aminoácidos o la aparición prematura de un codón de parada. Idealmente, cualquiera de estos procesos resultaría en una pérdida de función de la proteína codificada, logrando así el silenciamiento efectivo del gen. La reparación de la DSB se llevará a cabo de manera diferente en cada célula, por lo que se obtiene una población transfectada policlonal en la cual el silenciamiento se debe a una mutación distinta. No obstante, el aislamiento de clones permitirá obtener una población homogénea en la cual el silenciamiento es consecuencia de una mutación específica.

Normalmente, los sistemas CRISPR comerciales ofrecen la opción de realizar la reparación de las DSBs de manera predeterminada mediante un segundo plásmido que contiene una secuencia molde para la reparación dirigida por homología (HDR, *homology directed repair*). Los “plásmidos HDR” presentan una secuencia que hibrida tanto aguas arriba como aguas abajo de la DSB generada por la enzima Cas9 y ARNg. Cuando se utiliza este sistema CRISPR, el marcador de selección se incorpora en el “plásmido HDR” en lugar de estar presente en el plásmido *knockout*. Es importante tener en cuenta que la eficiencia de la reparación mediante HDR es baja, generalmente inferior al 10%. Por lo tanto, si se desea obtener un clon en el que la reparación se haya realizado de acuerdo con algún molde concreto, se requiere de confirmación por secuenciación. Para nuestros diseños experimentales, no fue necesario obtener un clon con una secuencia de reparación específica, sino que simplemente con la selección de un clon con una mutación que causaba pérdida de función fue suficiente.

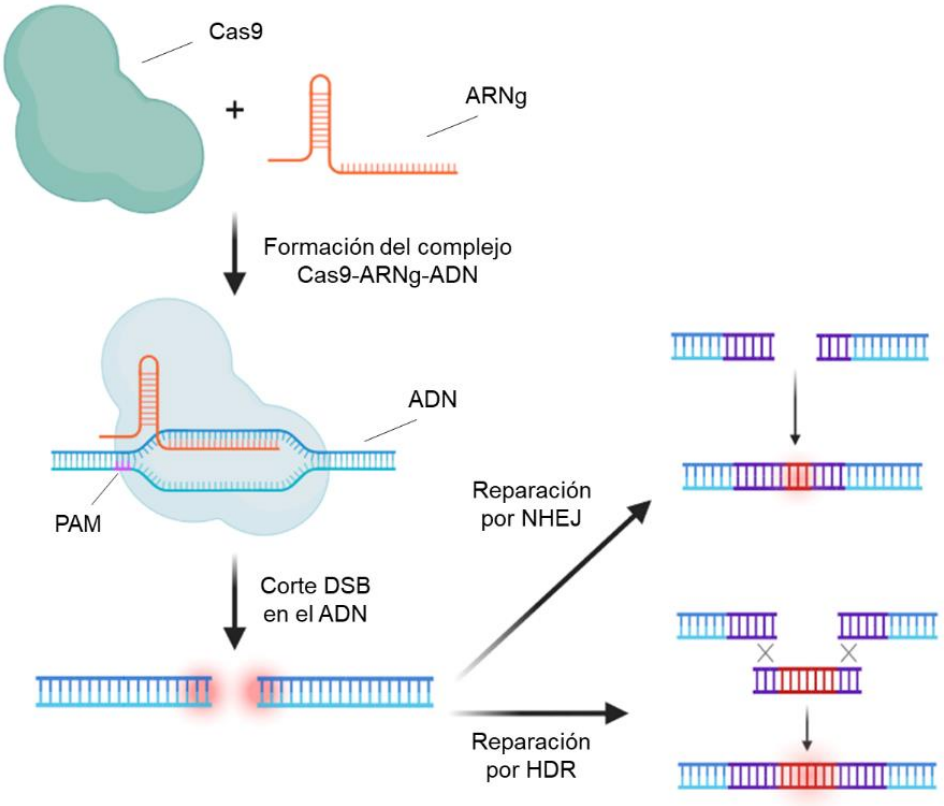



**Figura 4.42.** Diagrama simplificado del mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas9. HDR: reparación dirigida por homología, NHEJ: sistema de unión de extremos no homólogos. Imagen elaborada a partir del fundamento de la técnica.

Para el silenciamiento estable o *knockdown* de MITF y ADAM10 en células humanas y de ratón, se utilizaron los siguientes plásmidos de Santa Cruz Biotechnology: MITFh [sc-400401], MITFm [sc-421654] y ADAM10m [sc-418981]. En cada silenciamiento se utilizó un sistema con un "plásmido *knockout*" que consiste en un conjunto de tres plásmidos, donde todos expresan la endonucleasa Cas9 y la proteína de fluorescencia verde GFP, pero cada uno de ellos contiene un ARNg distinto. Por otro lado, el "plásmido HDR" también está compuesto por una combinación de 2-3 plásmidos, los cuales confieren resistencia a la puromicina y expresan la proteína de fluorescencia roja RFP (*red fluorescence protein*), pero cada uno de ellos contiene una secuencia molde diferente diseñada para la reparación de las DSBs en la región de unión de cada uno de los tres ARNg presentes en el "plásmido *knockout*" (**Figura 4.43**).

El protocolo que se llevó a cabo para realizar este silenciamiento se puede dividir en cinco etapas: transfección, selección, aislamiento de clones, confirmación del silenciamiento y verificación de la mutación de pérdida de función.

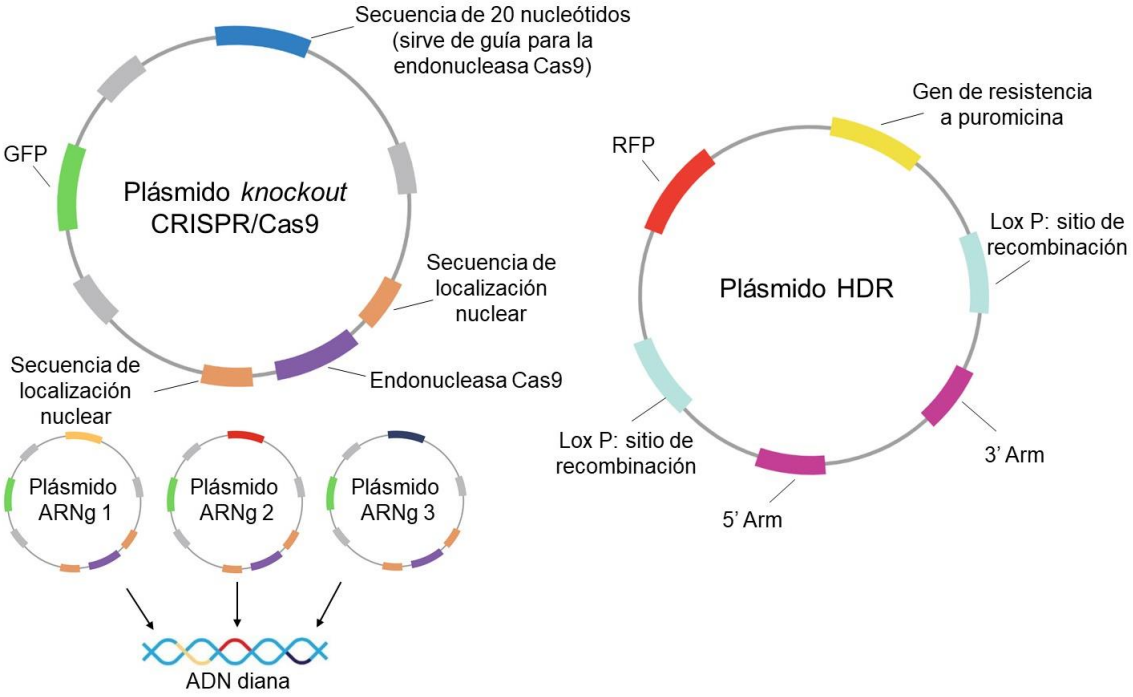



**Figura 4.43.** Estructura simplificada de los plásmidos utilizados para el silenciamiento estable de un gen mediante la técnica de CRISPR/Cas9. GFP: proteína verde fluorescente, HDR: reparación dirigida por homología, RFP: proteína roja fluorescente. Imagen elaborada a partir del fundamento de la técnica.

## Transfección

Para comenzar, se cultivaron células en placas de 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 50-70%. A continuación, se llevó a cabo la transfección utilizando los plásmidos *knockout* y HDR junto con el reactivo de transfección *Fugene 6* (Promega). Para cada pocillo, la relación utilizada entre la cantidad de ADN (µg) y el reactivo de transfección (µl) fue de 1:10. De esta forma, en un volumen final de 150 µl, se preparó la mezcla que contenía 1.5 µg de cada uno de los plásmidos *knockout* y HDR (1 µg/µl), 20 µl de Fugene y 127 µl de medio de transfección Opti-MEM (Thermo Scientific), se agitó suavemente y se dejó incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió esta mezcla gota a gota por toda la superficie del pocillo que contenía las células de interés.

## Selección

Transcurridas 48 horas de la transfección, se eliminó el medio de transfección y se sustituyó por medio de cultivo fresco que contenía el antibiótico puromicina a una concentración de 5 µg/ml para seleccionar a aquellas células que habían incorporado el plásmido de resistencia a dicho antibiótico. Previamente, pasadas 24 horas desde la transfección, se había evaluado la eficacia del proceso debido a las proteínas

fluorescente que codifican los plásmidos *knockout* y HDR del sistema CRISPR empleado. De esta forma, haciendo uso del microscopio de fluorescencia, se identificó la presencia de células que expresaban tanto GFP como RFP, lo que indicaba que habían incorporado ambos tipos de plásmido. El medio de selección se mantuvo durante 4-5 días.

**Aislamiento de clones**

Para el aislamiento de clones, se emplearon dos estrategias simultáneas: el aislamiento por dilución seriada y el aislamiento por dilución en placas de Petri.

En el aislamiento por dilución seriada, se procedió a la tripsinización del pocillo que contenía las células vivas después de la selección, obteniendo una suspensión celular. En una placa de 96 pocillos, se agregaron 200 µl de medio completo con puromicina a cada pocillo. En el pocillo A1 se añadieron 50 µl de la suspensión celular, se agitó todo el contenido con la micropipeta, y se transfirieron 50 µl de esta dilución al pocillo A2. Nuevamente, se mezcló bien el pocillo A2 y se pasaron 50 µl al pocillo A3, y así sucesivamente, realizando unas 10 diluciones seriadas. Este procedimiento se repitió en otras filas de la placa partiendo de diferentes volúmenes de la suspensión celular inicial. El objetivo de estas diluciones seriadas era aislar una única célula por pocillo, la cual posteriormente se multiplicaría dando origen a una población celular, también conocida como "clon".

En el aislamiento por dilución en placa de Petri, se cogieron 3-5 µl de la misma suspensión celular y se sembraron en una placa de Petri de 10 centímetros de diámetro. En este método, se busca una densidad celular muy baja con el fin de que las células queden separadas unas de otras durante la siembra. De esta manera, las colonias formadas posteriormente deben ser poblaciones celulares originadas a partir de una única célula. En los días siguientes, utilizando un microscopio invertido y una punta de micropipeta, se recogieron las colonias y se transfieren a una placa de 12 pocillos para que siguieran creciendo. A este proceso, se le conoce comúnmente como "picar colonias".

Las colonias aisladas mediante cualquiera de los dos métodos se cultivaron y se expandieron, utilizando placas de mayor tamaño en cada subcultivo, hasta llegar a crecer en frascos de 25 $cm^2$. Este escalado en el tamaño de las placas nos permite obtener una cantidad suficiente de masa celular para confirmar el éxito del silenciamiento mediante diversas técnicas.

**Confirmación del silenciamiento**

La confirmación del silenciamiento se realizó mediante distintos ensayos, como qPCR, Western blot e inmunocitofluorescencia específicamente para el gen silenciado en cada caso. Por un lado, mediante qPCR podemos determinar si la expresión del gen de interés se ha reducido significativamente en comparación con el control. El Western blot nos permite analizar si la cantidad de proteína ha disminuido en las células tratadas en comparación con las no tratadas. Por último, la inmunocitofluorescencia nos ayuda a determinar si se trata de una población homogénea de células en las que el gen de interés ha sido silenciado o si hay una mezcla de células silenciadas y no silenciadas. En el último caso, sería necesario repetir el proceso de aislamiento de clones (subclonar) para obtener una población más homogénea de células silenciadas. En cualquier caso, estos ensayos nos proporcionan información crucial para confirmar el éxito del silenciamiento y validar los resultados obtenidos.

**Verificación de la mutación de pérdida de función**

Una vez que tenemos una población homogénea que muestra silenciamiento, es necesario confirmar que ambos alelos del gen de interés han sido modificados, lo que resulta en la introducción de un codón de parada prematuro o en la generación de una proteína no funcional. Para llevar a cabo esta confirmación, se procedió a la extracción del ADN genómico de las células y se realizó la amplificación por PCR de la región de unión de cada uno de los tres ARNg que contenía el sistema CRISPR mediante el uso de cebadores específicos (**Tabla 4.2**). El producto resultante de la PCR fue purificado utilizando el *PureLink Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit* de Invitrogen. Además, se comprobó el tamaño adecuado de los fragmentos amplificados mediante la electroforesis en gel de agarosa y se secuenciaron por el método de Sanger, utilizando un solo cebador del par de cebadores utilizado en la PCR. Esta secuenciación, realizada en la Sección de Biología Molecular de la UM, permitió identificar el tipo de mutación que se había introducido en los alelos de la región estudiada en el gen de interés.

| Cebadores | Secuencia |
|---|---|
| MITF - **ARNg 1** Ratón FW | 5’ TAGCGTGAGGGTTGGAGTCT 3’ |
| MITF - **ARNg 1** Ratón RV | 5’ GAGCTGCGATCATTCACAAA 3’ |
| MITF - **ARNg 2 y 3** Ratón FW | 5’ CTCTGATGGAAGCCACGCAT 3’ |
| MITF - **ARNg 2 y 3** Ratón RV | 5’ TGATGGTAAGGCCTGGCGG 3’ |
| MITF - **ARNg 1** Humano FW | 5’ AGGAGTTGCACTAGCGGTGT 3’ |
| MITF - **ARNg 1** Humano RV | 5’ CACCACTCACCTGCTCTTCA 3’ |
| MITF - **ARNg 2** Humano FW | 5’ CTCGAAAACCCCACCAAGTA 3’ |
| MITF - **ARNg 2** Humano RV | 5’ CTCCCGTCATGTGCTCTACA 3’ |
| MITF - **ARNg 3** Humano FW | 5’ TTCATCTTTTGGTCAGATTCCA 3’ |
| MITF - **ARNg 3** Humano RV | 5’ AATCTTTGCAGCAACTTAGGG 3’ |
| ADAM10 - **ARNg 1** Ratón FW | 5’ AGGATTTGGATCCTTTAAATTTCTTT 3’ |
| ADAM10 - **ARNg 1** Ratón RV | 5’ CTTTAAATTCATCACTAAAAAGGGAAG 3’ |
| ADAM10 - **ARNg 2 y 3** Ratón FW | 5’ CAATGTGGATTCATTACACCAA 3’ |
| ADAM10 - **ARNg 2 y 3** Ratón RV | 5’ TTTACTCACCTTCCATGAGCA 3’ |

**Tabla 4.2.** Secuencia de los cebadores empleados para la amplificación por PCR de las regiones de unión de los ARNg y para la secuenciación de estas por el método de Sanger. ADAM10: proteína desintegrina y metaloproteasa 10, ARNg: ARN guía, MITF: factor de transcripción asociado a microftalmia.

### 4.4.11. GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS MUTANTES

Se utilizó el kit *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies) para generar un plásmido mutante empleado en los ensayos de luciferasa. Este kit emplea un sistema de mutagénesis dirigida con una eficiencia de mutación superior al 80%. La mutagénesis de sitio dirigido, conocida también como mutagénesis dirigida, es una técnica de biología molecular empleada para generar mutaciones específicas en una secuencia de ADN.

En primer lugar, se utilizó la plataforma *QuikChange Primer Design* de Agilent Technologies para diseñar los cebadores necesarios para llevar cabo la mutación de interés en la secuencia de unión a MITF (E-Box), cambiando CACGTG por CTGGTG. El plásmido del promotor de ADAM10 (RenSP, #S722690) fue empleado como molde. De esta forma, se obtuvieron los cebadores Mutante-*Forward* (5'-GCC CGC GCG TCA CCA GGT GAG GAA GGA G-3') y Mutante-*Reverse* (5'-CTC CTT CCT CAC CTG GTG ACG CGC GGG C-3'). Una vez que recibimos los cebadores, se procedió a la generación del plásmido mutante (**Figura 4.44**). Para ello, se mezclaron 0.4 µl de plásmido utilizado como molde (50-100 ng/µl), 0.6 µl de cada cebador (10 µM), 0.4 µl de dNTPs, 1.5 µl de la solución QuickChange, 0.5 µl de la enzima QuickChange Lightning y se completó con agua destilada hasta un volumen final de 20 µl. A continuación, se llevó a cabo la reacción en el termociclador con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 2

minutos a 95ºC, 18 ciclos de 3 minutos y 30 segundos cada uno (20 segundos a 95ºC, 60ºC a 10 segundos y 3 minutos a 68ºC) y 1 ciclo final de 68ºC durante 5 minutos. Una vez finalizada la reacción, se añadió 1 µl de enzima de restricción *Dnp* I durante 1 hora a 37ºC para digerir el plásmido molde. Transcurrido este tiempo, se cogieron 2 µl de la mezcla que contiene solamente el plásmido mutante y se siguió el protocolo de clonación de ADN descrito en el siguiente apartado (4.4.12. CLONACIÓN DE ADN EN BACTERIAS) utilizando las bacterias *XL10-Gold Ultracompetent Cells* suministradas por Agilent Technologies para llevar a cabo la transformación.

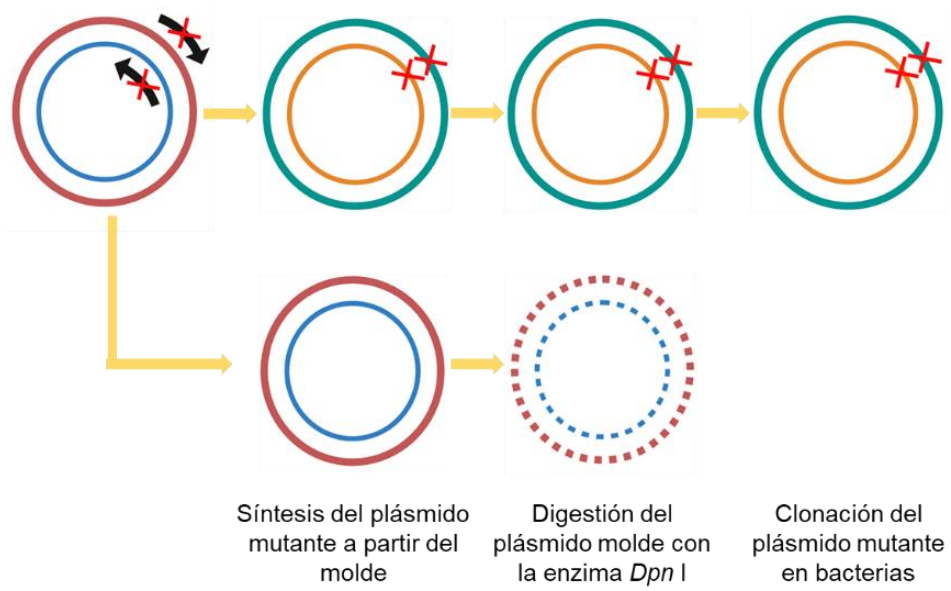



**Figura 4.44.** Diagrama de los principales pasos que ocurren con el kit *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies). Imagen elaborada a partir del fundamento de la técnica.

### 4.4.12. CLONACIÓN DE ADN EN BACTERIAS

La clonación de genes, también conocida como clonación molecular, es un conjunto de métodos experimentales ampliamente utilizados en biología molecular. Estos métodos se emplean para reproducir moléculas de ADN idénticas dentro de organismos receptores, siendo las bacterias y las levaduras los organismos más comúnmente utilizados. El término "clonación" hace referencia al proceso de copiar una molécula única de ADN a partir de una sola célula viva, generando así una población amplia de células que contienen copias idénticas del ADN original. En un experimento típico de clonación, se introduce en las bacterias un plásmido que contiene el fragmento de ADN de interés mediante un proceso llamado transformación. Posteriormente, las bacterias que han incorporado el plásmido son seleccionadas utilizando antibióticos, permitiendo obtener una población de células que contienen el ADN clonado.

En esta Tesis Doctoral se utilizó la técnica de clonación en bacterias principalmente para ampliar el reservorio de plásmidos necesarios para llevar a cabo algunos experimentos, como el plásmido pCMV14-3×FLAG-MITF empleado los ensayos de sobreexpresión transitoria.

En primer lugar, se empleó el método de choque térmico para llevar a cabo la transformación de la cepa DH5α de *Escherichia coli*. Este proceso permite incorporar un fragmento de ADN determinado en el interior de la bacteria. Para ello, se mezclaron 20 µl de la suspensión de estas bacterias, DH5α Competent Cells de Thermo Scientific (#18265-017), junto con 2 µl del plásmido de interés en un vial de 1.5 ml y se incubó durante 20 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo, rápidamente se puso el vial en un termobloque durante 30 segundos a 42ºC y seguidamente se colocó de nuevo en hielo. A continuación, se añadieron 250 µl de medio S.O.C (*Super Optimal Broth*, Thermo Scientific), un medio de crecimiento bacteriano rico en nutrientes que se utiliza para el cultivo microbiológico, generalmente de *Escherichia coli*. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 37ºC con agitación orbital. Luego, se cogieron 140 µl de la solución de bacterias y se sembraron en una placa de cultivo con agar que contenía ampicilina a una concentración de 0.2 mg/ml como antibiótico de selección. Las bacterias se dejaron crecer durante un día en la estufa de incubación a 37ºC. Al día siguiente, se cogió una colonia de bacterias arrastrando una punta de micropipeta estéril sobre el medio de cultivo y se introdujo en un matraz de 250 ml que contenía 200 ml de medio LB (*Luria-Bertani*) suplementado con 0.2 mg/ml de ampicilina. Las bacterias se dejaron crecer durante dos o tres días en la estufa de incubación a 37ºC con agitación orbital. Paralelamente se utilizó un matraz que contenía solo medio LB como control negativo. De esta manera, seguimos el crecimiento de nuestra suspensión de bacterias observando el nivel de turbidez del matraz. Cuando el medio con las bacterias mostró un grado de turbidez elevado se cogió la totalidad del volumen de la suspensión y se llevó a cabo la extracción del fragmento de ADN de interés siguiendo las instrucciones del kit *NZYMidiprep* de NZYTech.

## 4.5. TÉCNICAS DE ESTADÍSTICA

En esta Tesis Doctoral, los resultados de los experimentos se presentan como la media ± desviación estándar (SD, *standard deviation*) de un conjunto de mediciones realizadas en un rango de 2 a 8 repeticiones, dependiendo del experimento específico. Asimismo, destaca el uso de la técnica de ajuste de regresión lineal. La mayoría de los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando los programas informáticos *SigmaPlot*, *Microsoft Excel* y *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).

### 4.5.1. COMPARACIÓN DE DATOS

Los datos biológicos pueden tener distribuciones normales o no normales. Una distribución normal sigue una función de Gauss y se caracteriza por tener una forma de campana simétrica. En una distribución normal, el valor más frecuente coincide con la media (también con la mediana), y la probabilidad de obtener un valor disminuye a medida que se aleja de la media y se acerca a las colas laterales, lo cual se representa mediante la desviación estándar. Para comparar las diferencias estadísticas de los datos con distribución normal, como la comparación de medias entre los diferentes grupos experimentales, se utilizó el método paramétrico de la *t* de Student. En caso de que los datos no siguieran una distribución normal, se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, también conocida como prueba de la U de Mann-Whitney, con el fin de analizar las diferencias entre las medianas de los distintos grupos. En ambos casos, se consideró que existía una diferencia significativa entre los grupos cuando $p < 0.05$. En algunas ocasiones, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para comparar si un conjunto de datos se ajustaba a una distribución normal o no.

### 4.5.2. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

Se evaluó la intensidad de la correlación lineal o monótona entre dos variables mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson o el coeficiente de correlación de Spearman, en función de la distribución y características de los datos. Estos coeficientes varían en un rango de -1 a +1. Los valores negativos indican una asociación negativa, lo que significa que cuando una variable aumenta, la otra disminuye. Los valores positivos indican una asociación positiva, es decir, que cuando una variable aumenta, la otra también lo hace. Un valor de 0 indica que no existe una correlación lineal o monótona entre las variables. Cuanto más cercano sea el resultado a +1 o -1, más fuerte será la correlación positiva o negativa, respectivamente.

Para los análisis de correlación de expresión entre diferentes genes realizados en esta Tesis Doctoral se utilizó la base de datos del TCGA (*the cancer genome atlas*) mediante el programa *cBioPortal for Cancer Genomics*, el cual permite la visualización, análisis y obtención de datos genómicos a gran escala sobre cáncer. En concreto, se empleó la cohorte "skin cutaneous melanoma (TCGA, PanCancer Atlas)" que contaba con 448 muestras de pacientes con melanoma cutáneo.

### 4.5.3. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

Se utilizó el estimador Kaplan-Meier para analizar la supervivencia de los diferentes grupos experimentales. Este análisis se representa gráficamente mediante una función escalonada que muestra el porcentaje de supervivencia (eje de ordenadas) en función del tiempo (eje de abscisas). El porcentaje de supervivencia puede basarse en la supervivencia total (OS, *overall survival*) o en la supervivencia libre de enfermedad (DFS, *disease free survival*). Estas gráficas permiten visualizar la fracción de individuos que permanecen vivos en cada grupo experimental (grupo control, grupo 1, grupo 2, etc.) en momentos específicos. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Log-Rank utilizando el programa informático *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versión 6.0, y se consideró un criterio de significación de $p < 0,05$ para todas las comparaciones.

En los estudios de supervivencia en animales solo se evaluó el OS, donde el punto de inicio se estableció en el día de la inyección de células tumorales y el punto final fue el día de sacrificio del animal. Los ratones fueron sacrificados de acuerdo con las regulaciones vigentes, que establecen el sacrificio cuando se observan signos de malestar en el animal o cuando el tumor supera un volumen determinado.

### 4.5.4. ANÁLISIS DE MUTACIONES

Para analizar las secuencias de los genes de interés e identificar las mutaciones generadas mediante el sistema CRISPR/Cas9 se siguió el mismo esquema de trabajo. Los datos obtenidos del fragmento de ADN secuenciado se visualizaron mediante el programa informático *Chromas*, donde se obtuvo el cromatograma de secuencia, el cual nos daba una idea de la resolución de la secuenciación. Cuanto más ruido presenta el cromatograma, menor resolución. El programa *Chromas* también permitió guardar los datos de secuenciación en formato FASTA, un formato de fichero informático basado en texto, para su posterior análisis en el programa ApE (*A plasmid editor*). Tras obtener la secuencia codificadora del gen de interés original mediante la base de datos de *Ensembl genome browser*, utilizamos el ApE para hacer un alineamiento de ambas secuencias

(original y mutada) e identificar la posición de la mutación. A continuación, llevamos a cabo la traducción de la secuencia de ADN mutada a proteína para identificar los cambios generados por la mutación, normalmente la aparición de un codón de parada prematuro.

### 4.5.5. ANÁLISIS DE DATOS DE ChIP-seq

En la base de datos de Cistrome, donde se recopilan datos de accesibilidad de ChIP-seq y cromatina, se utilizó una herramienta bioinformática muy útil para los estudios de regulación epigenética y transcripción, *Cistrome Data Browser*. Este programa fue utilizado para comparar los datos de ChIP-seq disponibles de diferentes líneas celulares y realizar estudios de enriquecimiento para determinados genes. Asimismo, estos datos de ChIP-seq fueron analizados mediante la herramienta *Genome Browser* de la Universidad de California en Santa Cruz (UCSC) para identificar los sitios de unión de determinados factores de transcripción en sitios específicos del genoma.

# Capítulo 5

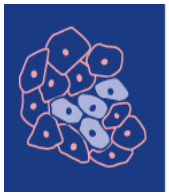
## Resultados y discusión

*«El éxito está justo después de ese momento en el que quieres rendirte»*

Eliud Kipchoge

# CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 5.1. ACRIFLAVINA, UN POTENTE INHIBIDOR DE HIF-1α, ALTERA EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y SUPRIME LAS VÍAS PROTECTORAS DE ATF4 EN EL MELANOMA EN CONDICIONES NO HIPÓXICAS



cancers

Los resultados del estudio del efecto de la acriflavina, un potente inhibidor de HIF-1α, sobre el metabolismo de la glucosa y las vías protectoras de ATF4 en el melanoma en condiciones con presencia de oxígeno se recogen en la publicación que se adjunta.

URL: https://www.mdpi.com/2072-6694/13/1/102

### 5.1.1. TÍTULO

*Acriflavine, a potent inhibitor of HIF-1α, disturbs glucose metabolism and suppresses ATF4-protective pathways in melanoma under non-hypoxic conditions.*

### 5.1.2. AUTORES

Román Martí-Díaz[1], María F. Montenegro[1], Juan Cabezas-Herrera[2], Colin R. Goding[3], José Neptuno Rodríguez-López[1] y Luis Sánchez-del-Campo[1].

[1]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, España.

[2]Grupo de investigación de Terapias Moleculares y Biomarcadores de Tumores Sólidos, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), 30120, Murcia, España.

[3]Ludwig Institute for Cancer Research, Nuffield Department of Clinical Medicine, Universidad de Oxford, Headington, Oxford OX3 7DQ, Reino Unido.

### 5.1.3. REFERENCIA

*Cancers* (2020), *13*, 102. https://doi.org/10.3390/cancers13010102

### 5.1.4. RESUMEN

El factor inducible por hipoxia (HIF-1α) se expresa de forma constitutiva en células de melanoma en condiciones normales de oxígeno (normoxia) y su elevada expresión se correlaciona con la agresividad de los tumores de melanoma. En este estudio, utilizamos la acriflavina, un potente inhibidor de la dimerización de HIF-1α, como herramienta para investigar si las vías reguladas por HIF-1α contribuyen al crecimiento de las células de melanoma en normoxia. Observamos que la acriflavina afectaba de forma diferencial a las dianas moleculares reguladas por HIF-1α en melanoma bajo condiciones de normoxia. Si bien el tratamiento con la acriflavina aumentaba la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), también reducía significativamente la expresión de la piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1), una diana bien conocida de HIF-1α. Consecuentemente, la disminución de PDK1, debido a la acriflavina redujo la disponibilidad de glucosa y suprimió el efecto Warburg en las células de melanoma. Además, al bloquear la fosforilación de AKT y RSK2, la acriflavina también evitó las vías protectoras necesarias para la supervivencia en condiciones de estrés oxidativo. En este sentido, demostramos que la acriflavina activaba la degradación del factor de transcripción activador 4 (ATF4) a través del proteasoma y, al mismo tiempo, reducía la expresión del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF), un regulador clave en el desarrollo de los melanocitos y un oncogén en el melanoma. Dado que el tratamiento con la acriflavina provoca la muerte de las células de melanoma, nuestros resultados sugieren que la inhibición de la función de HIF-1α en el melanoma podría ofrecer nuevas posibilidades en el tratamiento de esta enfermedad, independientemente de la presencia de hipoxia en el tumor.

cancers

MDPI

*Article*

# Acriflavine, a Potent Inhibitor of HIF-1α, Disturbs Glucose Metabolism and Suppresses ATF4-Protective Pathways in Melanoma under Non-Hypoxic Conditions

**Román Martí-Díaz [1], María F. Montenegro [1], Juan Cabezas-Herrera [2], Colin R. Goding [3], José Neptuno Rodríguez-López [1,*] and Luis Sánchez-del-Campo [1,*]**

[1] Department of Biochemistry and Molecular Biology A, School of Biology, IMIB-University of Murcia, 30100 Murcia, Spain; roman.marti@um.es (R.M.-D.); fermontenegro@um.es (M.F.M.)
[2] Translational Cancer Research Group, University Hospital Virgen de la Arrixaca, IMIB, 30120 Murcia, Spain; juan.cabezas@carm.es
[3] Ludwig Institute for Cancer Research, Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford, Headington, Oxford OX3 7DQ, UK; colin.goding@ludwig.ox.ac.uk
* Correspondence: neptuno@um.es (J.N.R.-L.); sancampo@um.es (L.S.-d.-C.)

**Simple Summary:** Hypoxia is a common feature in solid tumors such as melanoma, contributing locally and systemically to tumor progression. Although the hypoxia response in tumor cells is well understood, the role of constitutively activated hypoxia-inducible factor (HIF)-1α in normoxic conditions is less known. Here, we used acriflavine, a chemical inhibitor of HIF-1α, to investigate the role of this transcription factor on the progression of melanoma under normoxic conditions. The data indicated that acriflavine disturbs glucose metabolism and induces melanoma cell death under normoxia. As a result, we describe a possible clinical option that may target melanoma cells irrespective of the hypoxic microenvironment of the tumors. However, the translational importance of these findings should be confirmed in pre-clinical models.

**Abstract:** Hypoxia-inducible factor (HIF)-1α is constitutively expressed in melanoma cells under normoxic conditions and its elevated expression correlates with the aggressiveness of melanoma tumors. Here, we used acriflavine, a potent inhibitor of HIF-1α dimerization, as a tool to investigate whether HIF-1α-regulated pathways contribute to the growth of melanoma cells under normoxia. We observed that acriflavine differentially modulated HIF-1α-regulated targets in melanoma under normoxic conditions, although acriflavine treatment resulted in over-expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), its action clearly downregulated the expression of pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), a well-known target of HIF-1α. Consequently, downregulation of PDK1 by acrifavine resulted in reduced glucose availability and suppression of the Warburg effect in melanoma cells. In addition, by inhibiting the AKT and RSK2 phosphorylation, acriflavine also avoided protective pathways necessary for survival under conditions of oxidative stress. Interestingly, we show that acriflavine targets activating transcription factor 4 (ATF4) for proteasomal degradation while suppressing the expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF), a master regulator of melanocyte development and a melanoma oncogene. Since acriflavine treatment results in the consistent death of melanoma cells, our results suggest that inhibition of HIF-1α function in melanoma could open new avenues for the treatment of this deadly disease regardless of the hypoxic condition of the tumor.

**Keywords:** melanoma; acriflavine; MITF; HIF-1α; ATF4; glucose metabolism; oxygen homeostasis

check for updates

**Citation:** Martí-Díaz, R.; Montenegro, M.F.; Cabezas-Herrera, J.; Goding, C.R.; Rodríguez-López, J.N.; Sánchez-del-Campo, L. Acriflavine, a Potent Inhibitor of HIF-1α, Disturbs Glucose Metabolism and Suppresses ATF4-Protective Pathways in Melanoma under Non-hypoxic Conditions. *Cancers* **2021**, *13*, 102. https://doi.org/10.3390/cancers13010102

Received: 30 November 2020
Accepted: 28 December 2020
Published: 31 December 2020

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Copyright:** © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## 1. Introduction

HIF-1 is a transcription factor that regulates the expression of genes linked to angiogenesis, cell differentiation, and anaerobic metabolism induced by hypoxia [1]. This transcription factor is believed to activate between 60 and 100 target genes. In addition to

vascular endothelial growth factor (VEGF), HIF-1 controls the expression of several glycolytic enzymes and glucose transporters (such as GLUT1), required for elevated glucose uptake and metabolism [2]. HIF-1 thereby mediates the metabolic adaptation associated with conditions of reduced oxygen availability. As HIF-1 and the related factor HIF-2 regulate genes that play an important role in the progression of a wide range of tumors, modulating their activity could serve as a new approach in cancer therapeutics [3,4].

HIF-1 is a two subunit heterodimeric transcription factor made up of an α subunit (HIF-1α) and a β subunit (HIF-1β), both belonging to the family of transcription factors with bHLH/PAS domains (basic helix-loop-helix domain homologous to Per-ARNT-Sim) located at the N-terminus required for binding to DNA. HIF-1β is constitutively expressed in the nucleus; therefore, the activity of the HIF-1 complex is mainly mediated by the stability of the HIF-1α subunit. As with all proteins that play an important cellular function, the expression and activity of HIF-1 are subject to complex regulatory mechanisms that are directed, in this specific case, mainly to the HIF-1α subunit. Specifically, hydroxylation, ubiquitination, and acetylation control oxygen-dependent proteasome-mediated degradation of HIF-1α [5] with hydroxylation being especially important. Thus, under normoxic conditions, proline residues 402 and/or 564 are modified by prolyl hydroxylases (PHDs), allowing the recognition of HIF-1α by the Von Hippel–Lindau tumor suppressor that is part of an E3 ubiquitin protein ligase complex [5]. Conversely, under hypoxic conditions, HIF-1α is stabilized and translocates from the cytoplasm to the nucleus, where together with the HIF-1β protein forms the transcriptionally active form of HIF-1 that binds hypoxia response elements (HREs) in target genes. While the expression and function of HIF-1 under hypoxic conditions are well recognized, less is known about its function under normoxic conditions [6].

Hypoxic regions in solid tumors frequently give rise to a high growth tumor rate and allow for the generation of aberrant blood vessels [7]. Consequently, the risk of invasion, metastasis is increased by intratumor hypoxia, leading to elevated patient mortality [8]. However, while low oxygen clearly defines hypoxic domains within tumors, some tumors can activate the hypoxia response pathways even under normoxic conditions, a feature attributed to idiosyncratic metabolism. Melanoma, the most dangerous form of skin cancer, may represent one such tumor type [6]. Melanin-synthesis, a specialized differentiation-associated function of melanocytes, generates superoxide and hydrogen peroxide, which contribute to oxidative stress [9,10]. The mechanisms that allow melanocytes and melanoma cells to survive under this oxidative stress are unclear, however, some evidence points to the involvement of HIF-1α. Melanocytes respond to UV light by activating pro-survival pathways such as PI3K/AKT, CREB, and NFB, which ultimately lead to the expression of pro-survival proteins such as Bcl2 and the microphthalmia-associated transcription factor (MITF). Since MITF can activate HIF-1α transcription [11], it is plausible that a HIF-1-activated gene expression program would contribute to the resistance of melanocytes to oxidative stress [12]. Interestingly, it has been elegantly demonstrated that, in contrast to other tumor types, HIF activity can be constitutively activated in malignant melanoma cells even under normoxic conditions [13], and that elevated HIF-1α expression contributes to a harmful phenotype of human tumor cells under normoxic conditions [6]. Therefore, targeting HIF-1α function, regardless of the hypoxic condition of the tumor, may be a useful strategy to treat human melanoma.

Lee et al. [14] identified the antimicrobial drug acriflavine (ACF) as one of the most potent inhibitors of HIF-1 dimerization. Since the activity of ACF on melanoma cells has not been assayed in detail to date, here we examined the effect of this drug on the metabolism and progression of melanoma under normoxic expression of HIF-1α.

## 2. Results

### 2.1. Acriflavine Restricts Glucose Availability and Decreases Glycolysis in Melanoma Cells

Cancer cells exhibit altered metabolism with glucose being used as the primary energy source. In melanoma, enhanced glucose usage is favored through the hyper-activated MAPK pathway, which suppresses OXPHOS and stimulates glycolysis [15]. Here, we observed that ACF blocked cell growth in melanoma cells that had been cultured in the presence of physiological fasting concentrations of glucose in human blood (5 mM of glucose) (Figure 1A). Analysis of individual phases of the cell cycle indicated that ACF induces a substantial increase in the number of cells in the S/G2-phase and a decrease in the proportion of cells in the G1-phase in both mouse (B16/F10) and human (SK-MEL-28, IGR37) melanoma cell lines (Figure 1B and Figure S1). Since melanoma cells are dependent on high glucose levels for efficient growth [16] and ACF has been identified as a drug that perturbs intracellular glucose transport [17], we next examined the effect of ACF on the expression of several proteins involved in the transport and usage of glucose in mammalian cells. Interestingly, by western blot and confocal microscopy, we found that ACF induced a dose-dependent decrease in the total amount of GLUT1 in several melanoma cell lines (Figure 1C). In addition, we also observed that ACF induced a significant decrease in the expression of pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), an enzyme that inactivates the TCA cycle enzyme, pyruvate dehydrogenase (PDH), which converts pyruvate to acetyl-CoA (Figure 1D). Therefore, the decrease in GLUT1 and PDK1 activity, two well-recognized HIF-1α-regulated genes, could have a major impact on the transport and usage of glucose in melanoma cells. To validate this hypothesis, we used a non-radioactive assay, based on the detection of 2-deoxyglucose-6-phosphate (2DG6P), to determine the effects of ACF on the glucose uptake of melanoma cells growing under normoxia. As shown in Figure 1E, SK-MEL-28 melanoma cells treated with 2.5 μM ACF during 24 h showed dramatic changes in glucose uptake when compared with untreated control cells.

In addition to increasing energetic stress, glucose deprivation produces the selective death of cancer cells, but not normal cells. It is widely accepted that the main cause of this selective cell death is a reduction in the intracellular antioxidant power of cancer cells, since glucose deprivation decreases the rate of NADPH production from the pentose phosphate cycle and glucose-derived one-carbon metabolism. The reduction in antioxidant capacity then leads to an increase in intracellular reactive oxygen species (ROS) [18]. Since HIF-1α promotes glycolysis while repressing mitochondrial activity [19], we next asked whether ACF could affect glycolytic metabolism. Using a Seahorse platform, we observed in Figure 1F that ACF suppressed the Warburg effect in IGR37 melanoma cells, significantly decreasing basal and compensatory glycolysis under aerobic conditions (see also Figure S2 for other cell lines).

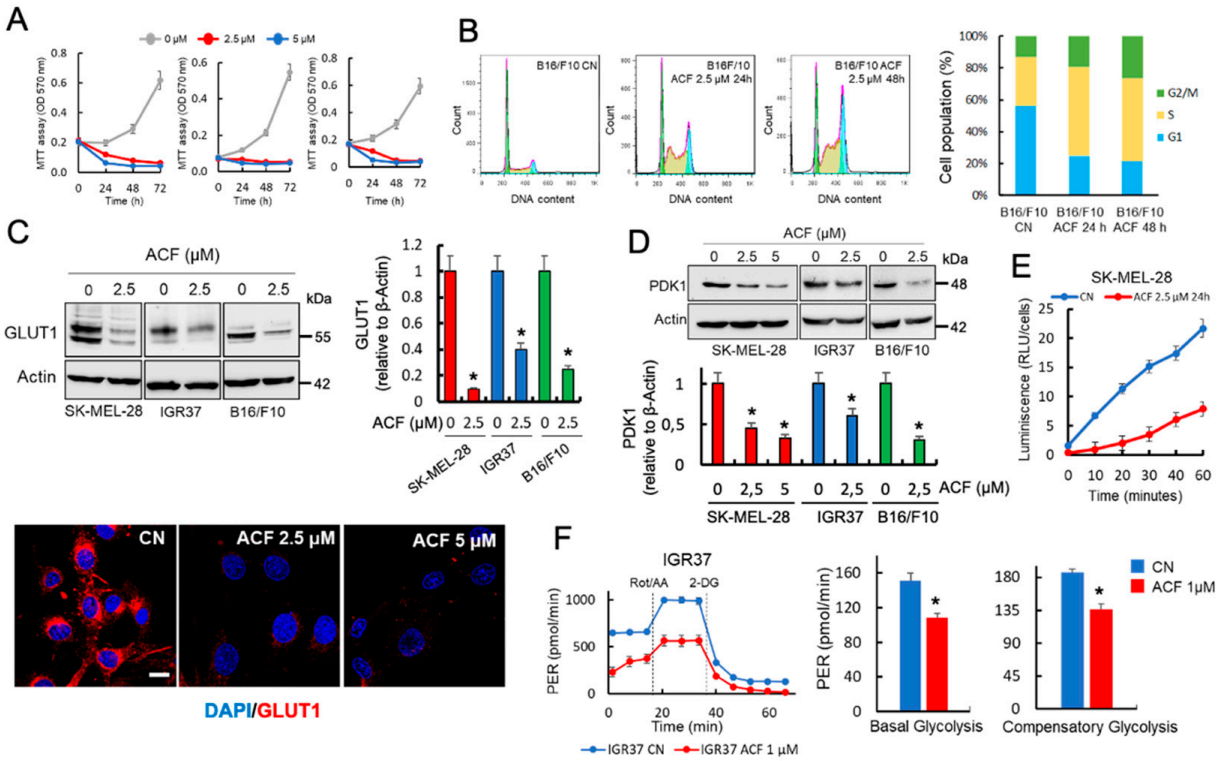



**Figure 1.** Acriflavine (ACF) restricts glucose availability and suppresses the Warburg effect in melanoma cells. (**A**) Effects of ACF on the growth of indicated melanoma cells. Viability was determined by the MTT assay. The number of surviving cells is directly proportional to the level of the formazan product created and the color can then be quantified at 570 nm. The data values represent the mean from two independent experiments performed in triplicate. (**B**) Cell cycle assays were performed using flow cytometry of B16/F10 cells following ACF indicated treatments. Assays were performed in triplicate, and differences in the cell cycle populations were found to be statistically significant ($p < 0.05$) when treated cells were compared with control cells (CN). (**C**) Western blot (upper panels) and confocal microscopy (63X magnification) (lower panels) showing the expression of GLUT1 in indicated melanoma cells subjected to ACF treatments. The results are representative of three independent experiments. Scale bar, 27 μM. GLUT1 protein expression (histogram) was estimated by integrated optical density (IOD) in western blots after normalization to the β-actin IOD. * $p < 0.05$ when compared with ACF-untreated controls. (**D**) The total levels of PDK1 was examined in indicated melanoma cells using western blot analysis following the indicated ACF treatments. The IOD values (histogram) represent the mean from two experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$ when compared with ACF-untreated control experiments. (**E**) Results of the Glucose Uptake-Glo Assay when SK-MEL-28 melanoma cells were treated with ACF. The values represent the mean from two experiments performed in triplicate and the reduction on glucose uptake after ACF was statistically significant at all-time tested ($p < 0.05$). (**F**) Glycolytic proton efflux rate (glycoPER) comparing untreated and ACF-treated IGR37 melanoma cells. The histograms represent individual parameters for basal glycolysis and compensatory glycolysis. IGR37 cells were treated with 1 μM ACF for 24 h and then incubated for 1 h in XF base medium. Each data point represents an ECAR measurement. Data are expressed as means ± SD, n = 5 technical replicates. The graphs are representative of three biological replicates. *p* values for significant differences (Student's *t*-test) are summarized by one asterisk (* $p < 0.001$) and groups are compared to ACF-untreated samples.

### 2.2. Acriflavine Differentially Modulates HIF-1α-Dependent Pathways in Melanoma under Normoxic Conditions

ACF has been identified as an efficient inhibitor of HIF-1α dimerization and consequently has potent inhibitory effects on tumor growth and vascularization [14]. However, since this transcription factor operates primarily under hypoxic conditions, most studies aimed at testing the efficacy of this drug in different cancer cell models have been carried out under oxygen-limiting conditions [14]. Here, and in addition to its proposed inhibitory activity, we also observed that ACF modulated the expression of HIF-1α under normoxic conditions (Figure 2AB). These results, together with the effect of MG132 treatment (Figure 2A) make it tempting to speculate that ACF could modulate the transcriptional activity of HIF-1α in normoxia when melanoma cells are growing under glucose-limiting conditions. To investigate this possibility, we analyzed the mRNA expression levels of PDK1 and VEGF, two well-known targets of HIF-1α [20,21]. Interestingly, as we observed for their protein levels (Figure 1D), ACF decreased PDK1-mRNA levels, but had an opposite effect on the expression of VEFG-mRNA (Figure 2C). To address the effect of ACF on the expression levels of PDK1 and VEGF in melanoma cells, we then conducted knock-down experiments of HIF-1α. Although effective silencing of HIF-1α (Figure 2D) clearly influenced the levels of PDK1-mRNA and eliminated the dose-dependent effect of ACF (Figure 2E), the increased expression of VEGF after ACF was diminished but not abolished after HIF-1α silencing (Figure 2E). Altogether, these results indicate that ACF differentially modulates HIF-1α-dependent pathways in melanoma, and suggests that under normoxic conditions VEGF expression could be regulated by HIF-1α-independent mechanisms. Since VEGF has been shown to be coordinately regulated by both HIF-1α and activating transcription factor 4 (ATF4) in normoxia [20,22], we next silenced ATF4 in cells treated with different concentrations of ACF (Figure 2F). The results showed that silencing ATF4 did not suppress ACF-dependent induction of VEGF, indicating that in normoxia, VEGF mRNA expression can be regulated by different mechanisms.

### 2.3. Acriflavine Decreases MITF Expression in Melanoma Cells in an ATF4-Independent Manner

Accumulating evidence suggests that a key determinant of melanoma phenotype is the expression and activity of the microphthalmia-associated transcription factor (MITF) [23]. MITF represents a major coordinator of melanoma cell biology. It promotes survival, differentiation, and proliferation, and plays a critical role in regulating melanoma metabolism [24–26]. Therefore, here, we evaluated the expression of MITF in the presence of ACF. As shown in Figure 3A,B, MITF protein levels were downregulated in a dose dependent manner by ACF in several melanoma cell lines as demonstrated by western blot and confocal microscopy. MG132, a specific proteasome inhibitor, partially recovered the MITF protein in the presence of ACF, potentially indicating that ACF decreased MITF protein stability in melanoma cells (Figure 3C). However, as demonstrated by qRT-PCR, ACF also regulates *MITF* transcription, since the amount of MITF-mRNA decreased dramatically after ACF treatment in a dose-dependent manner (Figure 3D). To decipher the effects of ACF on MITF expression, we next analyzed the phosphorylated forms of ERK1/2 and CREB in melanoma cells (Figure 3E,F). While p-CREB has been identified as a transcription factor that binds and activates the *MITF* promoter via the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element, ERK1/2 activation has been reported to drive MITF phosphorylation and degradation. The results indicate that ACF moderately increased ERK phosphorylation/activation, but also reduced CREB phosphorylation.

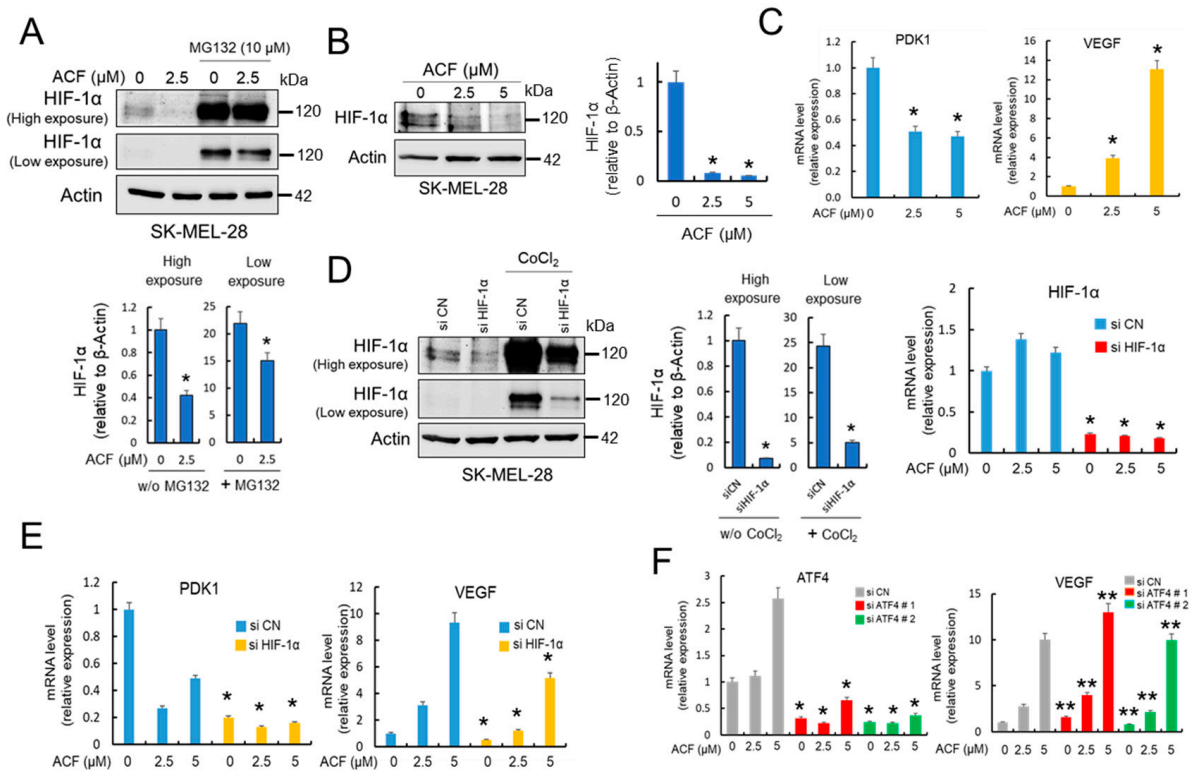



**Figure 2.** ACF differentially modulates PDK1 and VEGF transcription in melanoma cells. (**A**) Western blot experiments for the effect of ACF on HIF-1α expression in the absence or the presence of MG132. SK-MEL-28 cells were treated for 12 h with ACF alone or simultaneously co-treated with ACF and MG132. High and low exposure make reference to the exposure time during development of the chemiluminescent signal. HIF-1α expression in the absence of MG132 (w/o MG132) was quantified on high exposure membranes, while that of HIF-1α expression in the presence of MG132 was evaluated on low exposure membranes to avoid overexposure (histograms). In both cases, relative HIF-1α content in the ACF-treated samples was compared with untreated controls in membranes developed under the respective exposure conditions (* $p < 0.05$). (**B**) Dose-dependent effect of ACF (24 h) on HIF-1α and IOD quantification (histogram; * $p < 0.05$). (**C**) Semiquantitative determination of PDK1 and VEGF mRNAs in SK-MEL-28 cells. Relative levels of mRNA (with respect to β-actin) in ACF-treated samples (24 h) were compared to the expression levels in untreated controls (* $p < 0.05$). (**D**) Effective silencing of HIF-1α was determined by both western blot experiments and mRNA determinations in SK-MEL-28 melanoma cells. To visualize the silencing of HIF-1α in western blots, the protein was stabilized with $CoCl_2$ (200 μM). Images were obtained under high and low exposure as indicated in Figure 2A and quantified in indicated membranes (histograms) in the absence (w/o $CoCl_2$) or the presence of $CoCl_2$ (* $p < 0.05$). HIF-1α-mRNA in silenced samples were compared with their respective ACF treatments (24 h) in siControls (siCN) samples and differences were found statistically significant (* $p < 0.05$). (**E**) Semiquantitative determination of PDK1 and VEGF mRNAs in HIF-1α-silenced SK-MEL-28 cells. HIF-1α-mRNA in silenced samples were compared with their respective treatments in siCN samples (* $p < 0.05$). Although VEGF-mRNA decrease in siHIF-1α cells was found to be statistically significant with respect to siCNs, silencing of HIF-1α did not completely abolish ACF-dependent induction of VEGF. Cells were treated with ACF for 24 h. (**F**) Effective silencing of ATF4 with two different siRNAs (left panel) did not influence VEGF-mRNA expression in SK-MEL-28 cells. * $p < 0.05$ and ** not significant when compared with siATF4 samples with their respective treatments in siCN samples. When indicated, cells were treated with ACF for 24 h.

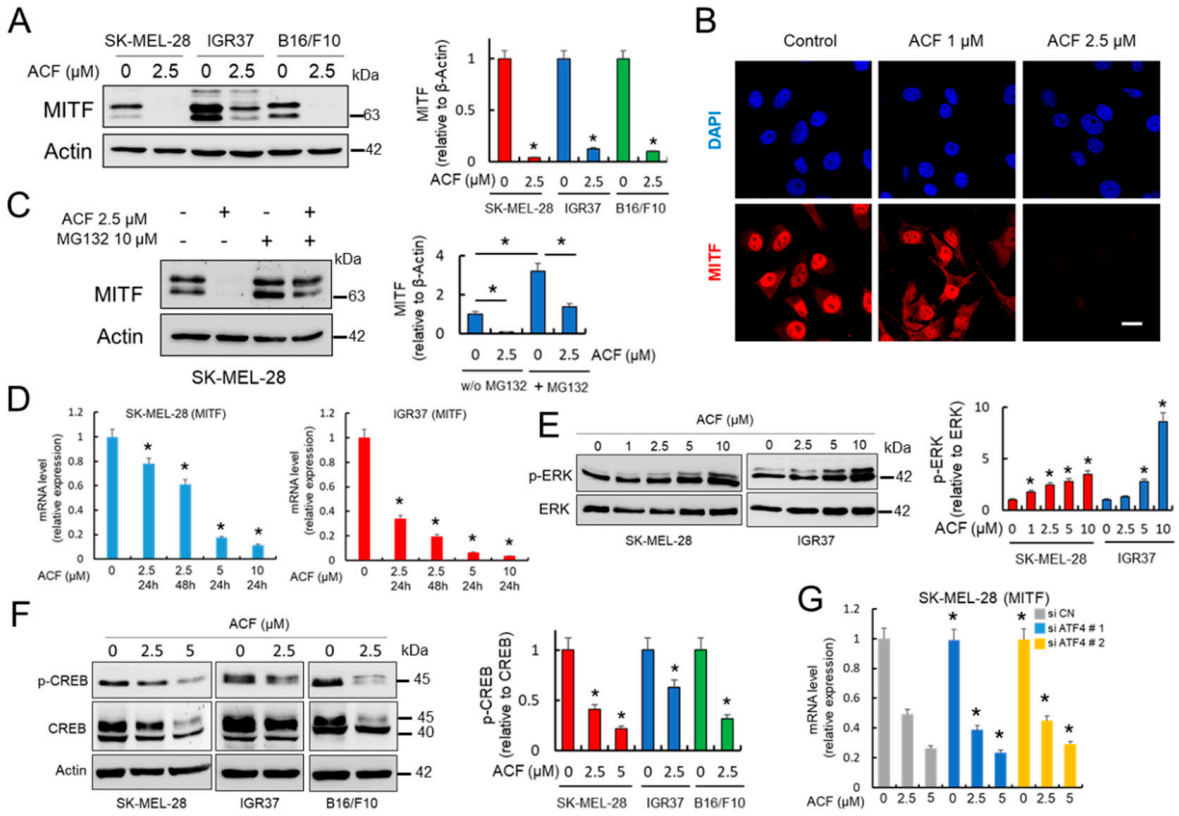



**Figure 3.** ACF decreases MITF expression in melanoma cells. (**A**) Effect of ACF (24 h) on MITF expression in melanoma cells analyzed by western blot. IOD quantification is shown (histogram; * $p < 0.05$ when compared with untreated controls). (**B**) Confocal microscopy analysis (63X magnification) of MITF in SK-MEL-28 melanoma cells under indicated conditions (cells were treated with ACF for 24 h). Bars, 27 μM. (**C**) Western blot experiments for the effect of ACF on MITF expression in the absence or the presence of MG132. SK-MEL-28 cells were treated for 12 h with ACF alone or simultaneously co-treated with ACF and MG132. * $p < 0.05$ when comparing indicated data groups. (**D**) qRT-PCR analysis of MITF mRNA in indicated melanoma cells before and after ACF treatments (24 h). Relative mRNA expression in treated cells was normalized with respect to untreated cells. * $p < 0.05$. (**E**) Effect of ACF (24 h) on the phosphorylation of ERK1/2 (p-ERK) in melanoma cells analyzed by western blot. Specific antibodies recognized the diphosphorylated forms of ERK1/2 (Thr183 and Tyr185 based in ERK2 nomenclature). Constitutive total ERK was used as a reference for p-ERK expression. IOD quantification is shown (histogram; * $p < 0.05$ when compared with untreated controls). (**F**) Effect of ACF (24 h) on Ser133 phosphorylation in CREB (p-CREB). Western blot of total CREB showed two clear bands at 40 and 45 kDa, corresponding to the upper band to phosphorylated CREB. IOD quantification is shown (histogram; * $p < 0.05$ when compared with untreated controls). (**G**) Effective silencing of ATF4 with two different siRNAs (Figure 2F) did not influence MITF-mRNA expression in SK-MEL-28 cells. * not significant when compared to siATF4 samples with their respective treatments in siCN samples. When indicated, cells were treated with ACF for 24 h.

ATF4 has been identified as a potent repressor of MITF mRNA expression [25], and glucose restriction promotes ROS-dependent induction of ATF4, which in turn can suppress MITF mRNA expression by competing with p-CREB binding to the CRE site of the *MITF* promoter [16]. Since ACF decreased glucose availability and affected the HIF-1α pathway under normoxic conditions, we hypothesized that the induction of an ER stress response pathway could be responsible for the ACF-dependent suppression of MITF in melanoma cells. To determine if ATF4 was involved in the decreased expression of MITF in the presence of ACF, we next analyzed MITF mRNA expression in ATF4 silenced cells. As shown in Figure 3G, ACF can induce a decrease in MITF expression in melanoma cells even in the absence of ATF4. Collectively, these results indicate that ACF is likely to decrease MITF levels in melanoma cells by modulating the phosphorylation of ERK1/2 and CREB in a mechanism independent of ATF4.

### 2.4. Acriflavine Activates Endoplasmic Reticulum Stress Pathways While Compromises ATF4 Stability in Melanoma Cells

Nutrient deprivation in tumor cells triggers endoplasmic reticulum (ER) stress with the subsequent activation of ATF4 [27,28]. Whether ACF induces ER stress and activates ATF4-dependent pathways was further investigated. That ACF activates an ER stress response in melanoma cells was evident from the analysis of the phosphorylation of eIF2α (Figure 4A), a stress-induced factor that blocks general protein synthesis and activates the translation of several stress-response and pro-apoptotic proteins. Consistent with induction of ER-stress, ACF significantly increased p-eIF2α in a dose-dependent manner. We next examined the levels of ATF4 in the controls and melanoma cells subjected to ACF treatments, since in contrast to global translation, which is downregulated by eIF2α phosphorylation, ATF4 translation is increased. Although ATF4 was detected in untreated cells, as observed in melanoma cells growing under low glucose conditions [16], unexpectedly, we found that ACF consistently induced a decrease in ATF4 protein in melanoma cell lines (Figure 4B,C). Since p-eIF2α reduces general translation initiation while facilitating the preferential translation of select transcripts such as that encoding ATF4, the results seem to indicate that ACF may lead to a destabilization of ATF4-protein in melanoma cells. In agreement, we observed that the ACF-dependent decrease of ATF4 protein in SK-MEL-28 cells was not accompanied by a concomitant decrease in ATF4-mRNA levels; instead, ACF increased the levels of ATF4-mRNA in this melanoma cell line (Figure 2E). Although we observed a high recovery of ATF4 after co-treatment of melanoma cells with ACF and MG132 (Figure 4D), suggesting ATF4 protein stability was reduced by ACF, MG132, per se, is an activator of the unfolded protein response (UPR), making interpretation of this experiment difficult. Interestingly, experiments designed to increase p-eIF2α with salubrinal, a specific inhibitor of eIF2α phosphatase, also seem to indicate that ACF induced destabilization of ATF4 protein in melanoma cells (Figure 4E).

In trying to explain the observed destabilization of ATF4 protein, we concentrated on RSK2 as phosphorylation of ATF4 by RSK2 stabilizes ATF4 and prevents its degradation by the proteasome [29]. The results in Figure 4F revealed that ACF significantly reduced phosphorylated (activated) RSK2 in melanoma cells. This observation might also explain the mechanism of action by which ACF reduces MITF expression in melanoma, since the RSK2 pathway also converges on CREB phosphorylation [30]. Interestingly, we also observed that ACF treatment promoted the inhibition of AKT phosphorylation (Figure 4G). Since phosphorylation of both AKT and RSK2 is governed by phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDPK1), the results suggest that ACF blocks the PI3K pathway upstream of AKT and RSK2 phosphorylation. As the PDPK1-AKT pathway, in addition to activating the transcription of HIF-1α [31,32], also promotes cell surface expression of GLUT1, inhibition of AKT phosphorylation by ACF might have a major impact on glucose metabolism in melanoma cells.

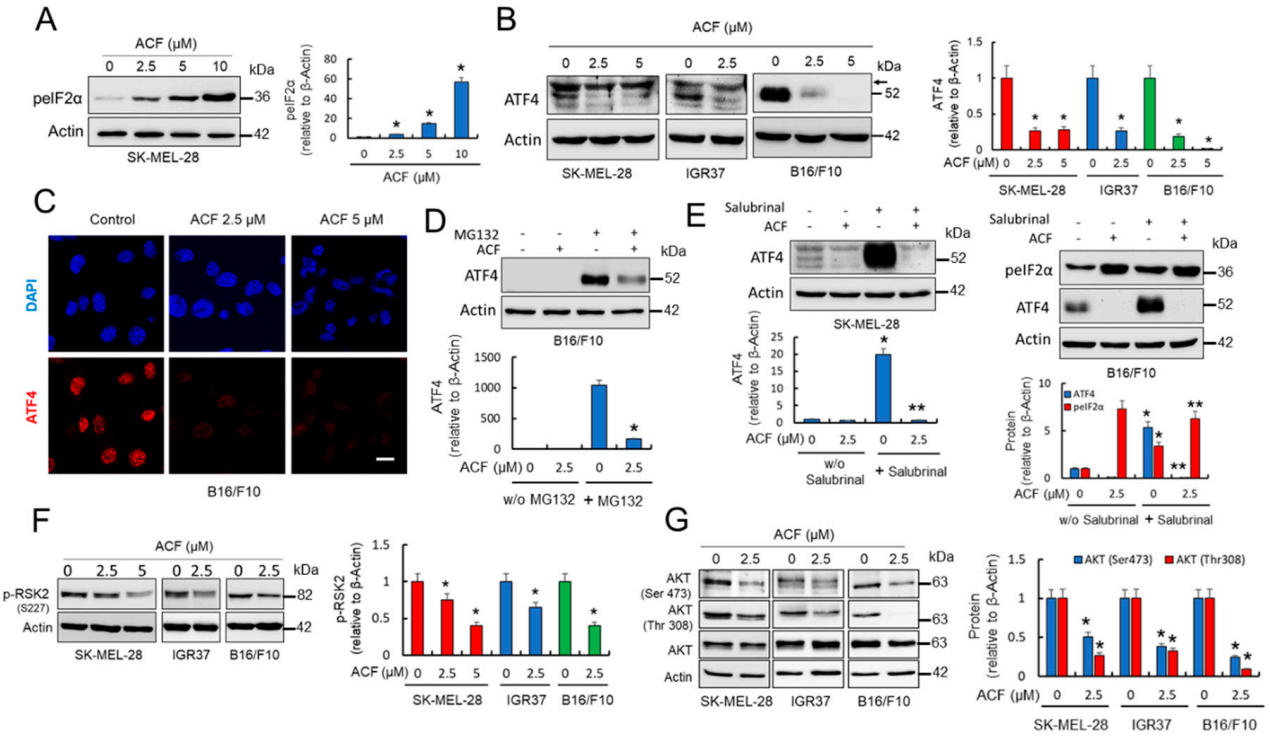



**Figure 4.** ACF compromises ATF4 protein stability in melanoma cells. (**A**) Effect of ACF (24 h) on p-eIF2α expression in SK-MEL-28 melanoma cells analyzed by western blot. IOD quantification is shown (histogram; * $p < 0.05$ when compared with untreated control). (**B**) Western blot analysis of ATF4 in melanoma cells under indicated conditions (cells were treated with ACF for 24 h). Histogram represents ATF4 protein levels (detected as a band at 52 kDa) estimated by IOD in western blots after normalization to the β-actin IOD. The values represent the mean from two experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$ when compared with ACF-untreated control experiments. Arrow indicates a nonspecific band observed in human samples at 58 kDa. (**C**) Confocal microscopy analysis (63X magnification) of ATF4 in control B16/F10 cells and those subjected to indicated ACF (24 h) treatments (bars, 27 μM). (**D**) Western blot experiments for the effect of ACF (2.5 μM) on ATF4 expression in the absence or the presence of MG132 (10 μM). SK-MEL-28 cells were treated for 12 h with ACF alone or simultaneously co-treated with ACF and MG132. MG132 significantly increased ATF4 in ACF-treated cells (* $p < 0.05$). (**E**) Western blot experiments for the effect of ACF (2.5 μM) on ATF4 expression in the absence or the presence of salubrinal (20 μM). Melanoma cells were treated during 24 h with ACF alone or simultaneously co-treated with ACF and salubrinal. As observed, ACF impedes ATF4 stabilization under forced stabilization of p-eIF2α * $p < 0.05$ and ** not significant when compared salubrinal treatments with their respective treatments without salubrinal (w/o salubrinal). (**F**) Effect of ACF (24 h) on the phosphorylation of RSK2 (p-RSK2) in melanoma cells analyzed by western blot. p-RSK2 (histogram) was estimated by integrated optical density (IOD) in western blots after normalization to the β-actin IOD. The values represent the mean from two experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$ when compared with the ACF-untreated control experiments. (**G**) AKT phosphorylation was examined in melanoma cell extracts and compared with the expression levels of total AKT and β-actin. IOD quantification is shown (histogram; * $p < 0.05$ when compared with their respective untreated controls).

### *2.5. Acriflavine Induces Melanoma Cell Death under Normoxic Conditions*

Cancer cells require a continuous supply of nutrients to maintain cell division [27]. In this context, the adaptation of these cancer cells to a limited availability of nutrients is facilitated by ATF4, one of the master regulators of the cellular stress response. Since ACF, by inhibiting HIF-1α-regulated pathways in normoxia, can reduce glucose availability and induce ER stress while suppressing ATF4 protective pathways, this drug could represent an efficient treatment against melanoma. We therefore analyzed the pro-apoptotic activity of ACF on several melanoma cell lines (Figure 5A,B). Indeed, we observed that blockage of cell growth (Figure 1A) was also accompanied by a substantial increase in melanoma apoptosis together with visible DNA damage, as reflected by an ACF-induced increase in p-γH2AX. In addition, melanoma cells treated with ACF exhibited a significant increase

in Bax/Bcl2 ratio, a predictive marker for therapy response (Figure 5C). Clear activation of caspase 7 and caspase 9 after ACF treatment (Figure 5D) also indicated that this drug induced cell death in melanoma cells under normoxic conditions.

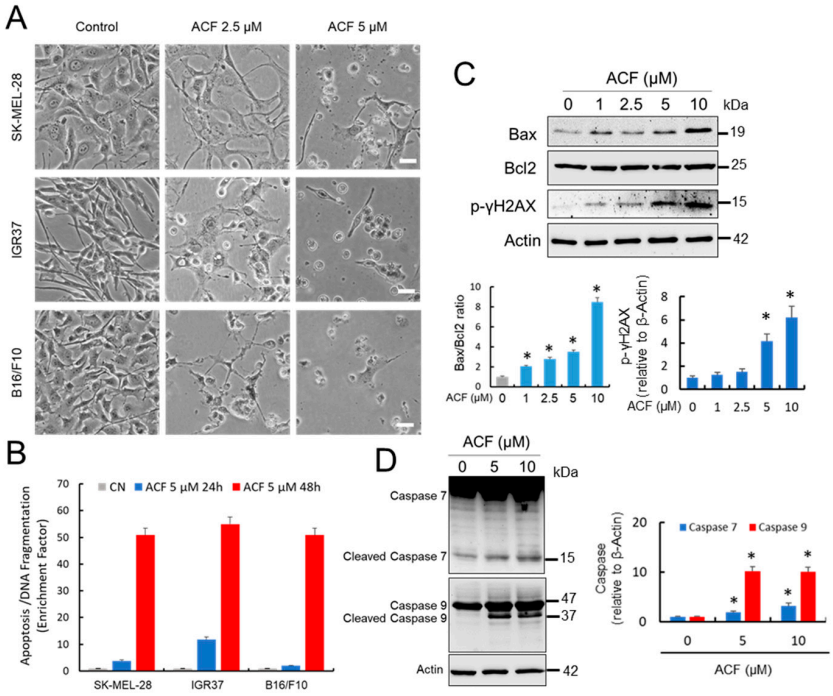



**Figure 5.** ACF induces apoptotic cell death in melanoma cells. (**A**) Morphological aspect of untreated melanoma cells compared with those subjected to 2-days of treatment with indicated concentrations of ACF (bars, 100 µM). 40× magnification (**B**) Apoptosis determination at different ACF concentrations in indicated melanoma cells after 24 and 48 h of treatment. Data were obtained in triplicate in two independent experiments. Differences in apoptosis in ACF-treated cells were significant with respect to untreated controls for each drug concentration and at any time ($p < 0.05$). (**C**) Western blots showing the effect of ACF on Bax, Bcl2, and p-γH2AX proteins. SK-MEL-28 cells were treated with different concentrations of ACF for two days. The ratios between Bax and Bcl2 and relative p-γH2AX are presented in the histograms (* $p < 0.05$ when compared with the untreated control). (**D**) Western blot analysis of caspase 7 and caspase 9 in the control SK-MEL-28 cells and those treated with indicated doses of ACF. IOD quantification is shown (histogram; * $p < 0.05$ when compared with their respective untreated controls).

## 3. Discussion

HIF-1 plays a predominant role in the response of cells to hypoxia, a microenvironmental condition that is particularly relevant during tumor development. However, whether HIF-1α-related pathways are operative under normoxia and whether cancer cells originating from different tissues are dependent of HIF-1α under non-hypoxic stress conditions are questions that remain to be elucidated [6]. In this respect, the use of HIF-1α inhibitors such as ACF could constitute a useful tool to identify HIF-1α pathways operating under normoxia that are essential for survival in response to cellular stresses such as nutrient deprivation or ROS production, among others. Here, we analyzed the effect of ACF, a HIF-1α inhibitor, on melanoma cells maintained at 5 mM glucose. Interestingly, melanoma cells grown at this glucose concentration, corresponding to fasting physiological concentrations, exhibit a high rate of ROS production, which leads to the activation of ATF4 [16]. The results of this study clearly indicated that competition between ATF4 and CREB for their localization at the *MITF* promoter resulted in repression of MITF expression. We therefore used this cellular model to elucidate the role of HIF-1α in cells subjected to oxidative metabolic stress under normoxia.

Another important issue is to understand whether the HIF-1α metabolic controlled pathways are different when they operate under normoxia or hypoxia. Although VEGF has been considered as a paradigm of genes controlled by HIF-1α under hypoxia, here, we observed that HIF-1α is not completely required for VEGF expression under normoxic conditions. Interestingly, it has been proposed that the interaction between ER stress and hypoxia response pathways can potentiate HIF-1 transcriptional activity at the *VEGF* gene [20], and oxidative stressors that induce ATF4-dependent VEGF mRNA transcription [22]. However, our results did not indicate that ATF4 could be responsible for VEGF mRNA induction after treatment with ACF. That HIF-1α-regulated pathways may differ when they operate under hypoxic or normoxic conditions could also be deduced from observations, suggesting that HIF-1α could regulate MITF transcriptional activity. Thus, a previous report has suggested that the pro-angiogenic response of melanoma to low levels of oxygen depends at least in part on HIF-1α mediated downregulation of MITF [33]. However, here, we did not find that HIF-1α downregulated MITF expression under normoxia; in fact, we observed that inhibition of HIF-1α by ACF resulted in a significant decrease in MITF expression. Since the repression of MITF by HIF-1α was shown to be controlled by the hypoxia-dependent recruitment of DEC1 to the *M-MITF* promoter, it is reasonable to speculate that hypoxia-dependent stabilization of factors necessary for HIF-1 activity may differentially regulate HIF-1 dependent pathways under normoxic or hypoxic conditions.

Collectively, the results presented indicate that ACF, by inhibiting the transcriptional activity of HIF-1 in normoxia, negatively regulates PDK1 in melanoma cells, which could explain many of the effects observed after ACF treatment (Figure 6). In recent years, PDK1 has been the focus of many studies aimed at blocking glucose metabolism in tumor cells [34]. Since PDK1 inhibits PDH, its action would facilitate the Warburg effect by reducing the levels of pyruvate entering the tricarboxylic acid cycle and affecting the rates of OXPHOS [35] (Figure 6A). In this scenario, HIF-1α upregulates PDK1 and increases glucose uptake by GLUT1 transporters. Therefore, by inhibiting HIF-1α, ACF suppresses the Warburg effect and impedes the adaptation of melanoma cells to oxidative stress (Figure 6A). In addition, several oncogenes have been identified as key players associated with the HIF-1α-mediated Warburg [36]. For instance, the signaling pathway composed of PI3K, AKT, and mTOR is associated with the upregulation of HIF-1α in normoxic conditions [32]. In this sense, in addition to activating HIF-1α dependent transcription of GLUT1 transporters, an active AKT pathway may also facilitate GLUT1 translocation to the plasma membrane [37,38]. Although there are reports suggesting that AKT activation can protect cells under glucose deprivation, regulation of this oncogenic pathway under glucose restriction has been shown to be sophisticated and specific to different cancer cells and backgrounds [39]. Thus, for example, AKT is activated in glioblastoma cells [40], but inhibited in ovarian cancer cells [41]. Here, we observed that the restriction of glucose availability to physiological concentrations favors an operative AKT pathway in melanoma cells; however, inhibition of the Warburg effect by ACF resulted in the inhibition of AKT phosphorylation, probably due to an excessive production of ROS levels that render cells closer to the threshold of ROS lethality (Figure 6A).

In addition to disturbing glucose metabolism in melanoma cells, the inhibition of the PI3K/PDPK1 pathway by ACF may also have important consequences for the pathobiology of these cells. On one hand, inactivation of AKT by ACF may be important to maintain the stability of MITF in melanoma cells. GSK3β phosphorylates MITF at 3 C-terminal phosphorylation sites, targeting MITF for proteasomal degradation [42]; therefore, inhibition of AKT by ACF would result in decreased MITF protein stability. On the other hand, we observed that ACF reduced the phosphorylation of RSK2, a kinase that is controlled through its phosphorylation by PDPK1 at Ser227 [43]. RSK2 might modulate ATF4-related pathways. Melanoma cells growing under limiting glucose concentration activate rescue routes to condition themselves to the nutritional conditions of the environment. Among these pathways, limiting glucose availability results in the expression of the transcription factor ATF4, which is

a known mediator of stress pathways including hypoxia/anoxia, nutrient deprivation, and endoplasmic reticulum stress [16]. Since the stabilization of the ATF4 protein is dependent on an active PDPK1/RSK2 pathway [29], inhibition of RSK2-mediated ATF4 phosphorylation by ACF may compromise the pro-survival activity of ATF4 (Figure 6B). In fact, we observed that ACF dramatically decreased the protein levels of ATF4 in melanoma cells. These results agree with other observations that suggest that ACF inhibits acquired drug-resistance by blocking the epithelial-to-mesenchymal transition and the UPR in pancreatic cancer cells [44]. However, it is important to note that our data were generated in cell lines in culture and whether the pathways identified operate in vivo requires validation in an in vivo model. Nevertheless, the observation that ACF indirectly targets ATF4 in melanoma cells could be interesting from a therapeutic point of view [45]. Since ATF4 is a poor drug target, but plays important functions in cancer progression and resistance to therapy, the action of a small molecule such as ACF that indirectly targets ATF4 for proteasomal degradation could open new avenues for the treatment of melanoma. Since ACF treatment clearly induced melanoma cell death in in vitro models, we are now interested in testing the action of this compound in pre-clinical models of melanoma. From these future results, we will be able to draw conclusions indicating whether ACF could be transferred to a clinical setting.

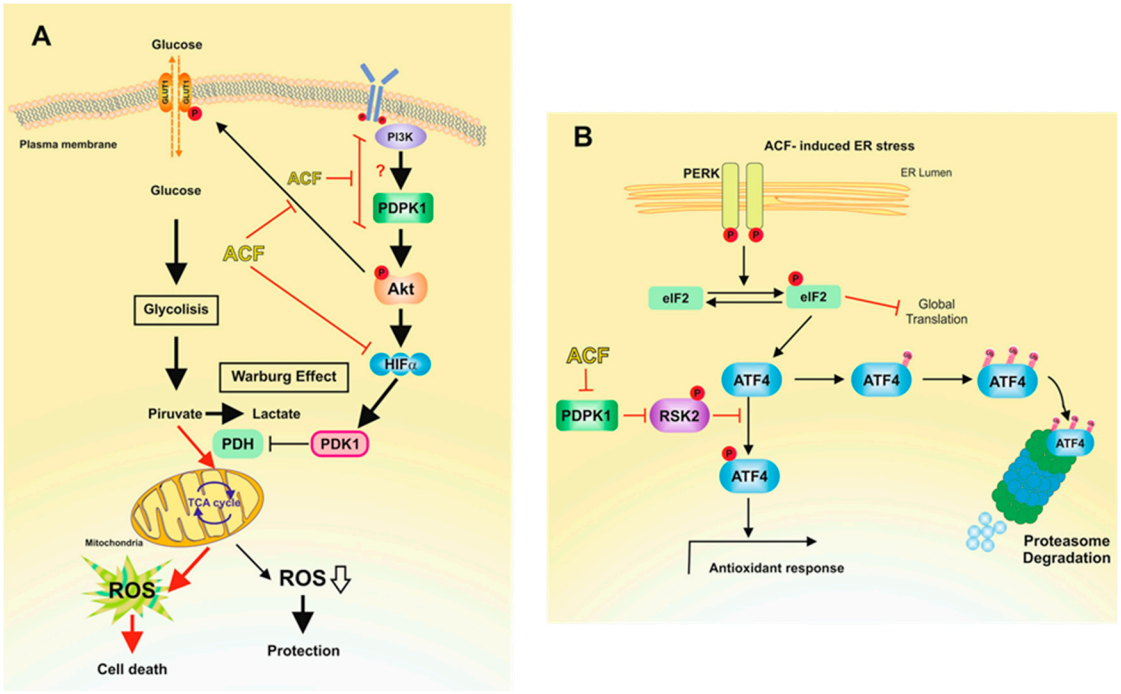



**Figure 6.** Proposed mechanisms for the action of ACF on melanoma cells under normoxic conditions. (**A**) This picture reproduces the adaptation of melanoma cells to physiological concentrations of glucose. Restriction of glucose availability to physiological concentrations induces the production of ROS [16], which activate HIF-1α [46]. Activated HIF-1α induces glycolysis upregulation in cancer cells, a phenomenon known as the Warburg effect [47]. Thus, by increasing the conversion of pyruvate to lactate, the Warburg effect reduces ROS production by the mitochondrial OXPHOS. Activated AKT pathway contributed to glucose transport through GLUT1 plasmatic membrane translocation and activation of HIF-1α. ACF, by inhibiting HIF-1α, impedes PDK1 transcription, resulting in enhanced ROS production. In this metabolic scenario, ACF blocks the PI3K/PDPK1 pathway, resulting in impaired phosphorylation of AKT. Consistently with our results (Figure 2A), inhibition of AKT phosphorylation by ACF would also result in reduced expression of HIF-1α [31] under normoxic conditions. Red arrows indicate favored pathways in the presence of ACF. (**B**) Increased ROS levels induces ER stress, leading to the UPR [48]. Although ACF induces the phosphorylation of eIF2α, this is not traduced in elevated expression of ATF4. Since protein stability of ATF4 is dependent of an operative PDPK1/RSK2 pathway [29], ACF induces the destabilization of ATF4 and, therefore, the inactivation of ATF4-adaptative pathways.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Chemicals

ACF, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), $CoCl_2$, salubrinal, and MG132 were obtained from Merck (Madrid, Spain). Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, penicillin, and streptomycin were purchased from Gibco (Thermo-Fisher, Barcelona, Spain). Antibodies used in this study are indicated in the Supplementary Materials (Table S1).

### 4.2. Cell Cultures

Authentication of the SK-MEL-28, IGR37 human melanoma cells, and mouse B16/F10 melanoma cells was performed using STR profiling. All cell lines were mycoplasma free and cultured at 37 °C and 5% $CO_2$ in EMEM without phenol red supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, and 1% penicillin and streptomycin.

### 4.3. Cell Viability Assays

The cell viability was determined using the MTT assay. Cells (1000–2000) were plated in 96-well flat-bottom plates. The next day, once cells were attached, they were treated with ACF and maintained in culture for the indicated times. MTT reagent was dissolved in culture medium (5 mg/mL), added to the cells to a final concentration of 1 mg per well, and incubated for two hours. Formazan crystals were dissolved using DMSO and absorbance was measured on a microplate reader (Fluostar-Omega, BMG Labtech., Ortenberg, Germany) at 540 nm using a 650 nm wavelength measured as background reference.

### 4.4. Cell Cycle Analysis and Flow cytometry

Experiments were performed in a 6-well plate format. Cells were treated with ACF 2.5 μM for 24 h and 48 h. After treatment, cells were washed in PBS, fixed with 70% ethanol for 1 h at 4 °C and incubated for 30 min at 37 °C in propidium iodide staining solution (50 μg/mL RNase A, 50 μg/mL propidium iodide, and 0.05% Triton X-100 in PBS). DNA fluorescence was measured with a FACSort cytometer (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and cell cycle phases evaluated using FlowJo software (FlowJo, Ashland, OR, USA).

### 4.5. Apoptosis

The effect of ACF on apoptosis induction of melanoma cells was determined using an ELISA assay (Cell Death Detection ELISA PLUS, Roche Diagnostics, Barcelona, Spain). This is a photometric enzyme immunoassay that quantifies the presence of histone associated DNA fragments (nucleosomes) present in the cytoplasm of apoptotic cells using anti histone-biotin and anti-DNA-peroxidase conjugated antibodies. The assay was developed in 96-well flat-bottom plates and cells treated with ACF 5 μM for 24 h and 48 h. Next, cells were lysed and plates were centrifuged. The load of nucleosomes in the cytoplasm of cells was analyzed by measuring the absorbance at 405 nm using ABTS as a substrate in a microplate reader (Fluostar-Omega, BMG Labtech., Ortenberg, Germany). Apoptosis fold was calculated relative to untreated cells considering the number of cells.

### 4.6. Western Blotting

Protein samples were obtained directly from cell lysis in Laemmli buffer or extracted using lysis buffer (50 mM TRIS-HCl pH 8.0, 180 mM NaCl, 1% NP-40) followed by dilution in Laemmli buffer. After denaturation at 95 °C for 5 min, proteins were resolved by electrophoresis SDS-PAGE using 10% acrylamide gels. After separation, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Merck) in a Bio-Rad transfer system and membranes were blocked in 5% nonfat milk and incubated overnight with the indicated primary antibodies diluted in blocking solution. After washing, membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (anti-mouse, anti-rabbit, or anti-rat IgG) diluted 1:10,000 in blocking solution for one hour. Following extensive washing, the signal was

detected by incubation of the membranes with an ECL detection kit (WesternBright Quantum, Advansta, San Jose, CA, USA). Bands were visualized and images were recorded with a Bio-Rad ChemiDoc scanning densitometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The original western blotting figures can be found in Figure S3.

### 4.7. Confocal Microscopy

Cells were grown on glass coverslips and fixed and permeabilized using 100% methanol for 5 min and washed with PBS. Coverslips were blocked with 5% BSA in PBS for 20 min and probed with the indicated primary antibodies (ATF4, MITF, and GLUT1) at 4 °C. After washing the excess of antibody solution with PBS, proteins were detected with Alexa Fluor Dyes (Alexa Fluor 633 rabbit anti-mouse IgG (H+L) and Alexa Fluor 633 goat anti-rabbit IgG (H+L) both from Thermo Fisher Scientific) and imaged using a Leica TCS 4D confocal microscope (Wetzlar, Germany).

### 4.8. Glucose Uptake Assay

The non-radioactive, plated-based bioluminescent assay Glucose Uptake-Glo™ (Promega, Madison, WI, USA) based on the detection of 2-deoxyglucose-6-phosphate was used for measuring glucose uptake in the melanoma cells. Reactions were developed in 96 well-plates following the manufacturer's recommended protocol. Glucose uptake was determined over time for the control and ACF-treated cells measuring the luminescent signal produced with a multiplate luminescence recorder (Fluostar-Omega).

### 4.9. Real Time Quantitative RT-PCR

Extraction of RNA from melanoma cells was performed using the NZY total RNA Isolation Kit (Nzytech, Lisboa, Portugal) and cDNA prepared using the NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (Nzytech). Primers used in this study are included in the Supplementary Materials (Table S2). Primers were designed using Primer Blast software (NCBI) and obtained from Thermo-Fisher. mRNA expression levels were evaluated by qRT-PCR (QuantStudio 5 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the SYBR green master mix (Applied Biosystems) and normalized to β-actin.

### 4.10. Metabolic Assay: Glycolytic Rate Assay

Glycolytic proton efflux rate (GlycoPER) was measured using the Seahorse XFe96 extracellular flux analyzer (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA). Cells were seeded in XF96 well plates at a density from 5000 to 15,000 cells per well to reach approximately 75% confluence. Cell were allowed to attach to the bottom of the well at room temperature before going into the incubator at 37 °C in 5% $CO_2$ to ensure their homogeneous distribution. The next day, cells were treated with 1 μM ACF for 24 h prior to the assay. One hour before the glycolytic rate analysis, the medium was replaced with fresh Seahorse XF DMEM medium without phenol red supplemented with 1 mM pyruvate, 2 mM glutamine, and 10 mM glucose. ECAR and OCR were both measured in the Seahorse XFe96 analyzer at basal conditions and after the sequential injections of 0.5 μM Rotenone plus Antimycin A (Rot/AA) and 50 mM 2-deoxyglucose (2-DG) (XF Glycolytic Rate Assay Kit). Values were normalized to cell number.

### 4.11. siRNA and Cell Transfection

HIF-1α-siRNA (s6539), ATF4-siRNA [siATF4#1 (s62689) and siATF4#2 (s62691)] and non-silencing siRNA (4390843) were purchased from Ambion (Thermo-Fisher). Cells were seeded on six/well culture dishes to approximately 70% confluence. Transient transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Thermo-Fisher) following the manufacturer's instructions. Cells were incubated with transfection mixtures containing HIF-1α-siRNA, ATF4-siRNA, or non-silencing siRNA for 72 h.

### *4.12. Statistical Analysis*

Western blot and confocal microscopy experiments were repeated at least three times. The results of one of the experiments are shown in the figures. For other assays, the mean ± S.D of three determinations carried out in triplicate were calculated. Statistical significance was determined using Mann–Whitney tests for comparisons of means in SPPS statistical software for Microsoft Windows, release 6.0 (Professional Statistic, Chicago, IL, USA). Individual comparisons were made using the Student's two-tailed, unpaired *t*-tests. Criterion for significance was $p < 0.05$ for all comparisons.

## 5. Conclusions

The incidence of melanomas is increasing and, despite advances in targeted and immunotherapies, the prognosis for many patients with advanced disease is not very promising. Without a doubt, understanding tumor cell oncometabolism may generate new opportunities to generate new, more effective, and safer therapies against epithelial tumors. Here, we describe the mechanism of action of a drug, ACF, which could modulate the metabolism of melanoma cells, independently of the hypoxic conditions of the tumor. Interestingly, by inhibiting the HIF-1α/PDK1 axis, ACF modulates the metabolism of glucose in melanoma cells. In addition, by inhibiting the PI3K/PDPK1 pathway, ACF also blocks important adaptive mechanisms necessary for cell survival under metabolic stress.

**Supplementary Materials:** The following are available online at https://www.mdpi.com/2072-6694/13/1/102/s1, Figure S1. Cell cycle assays of SK-MEL-28 (A) and IGR37 (B) cells following ACF indicated treatments. Assays were performed as indicated in Figure 1B. Figure S2. Glycolytic proton efflux rate (glycoPER) comparing untreated and ACF-treated melanoma cells. (A) SK-MEL-28, (B) B16/F10. Assays were performed as indicated in Figure 1F. Figure S3: Uncropped western blotting figures. Table S1. Used primary antibodies. Table S2. The following primers for human genes were used.

**Author Contributions:** Conceived and designed the experiments: J.N.R.-L. and L.S.-d.-C. Performed the experiments: L.S.-d.-C., R.M.-D., M.F.M. and J.C.-H. Analyzed the data: J.N.R.-L., L.S.-d.-C. and R.M.-D. Contributed reagents/materials/analysis tools: J.C.-H. Wrote the paper: C.R.G., J.N.R.-L. and L.S.-d.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by grants from the Ministerio de Economia y Competitividad (MINECO; Co-financing with Fondos FEDER) (SAF2016-77241-R), and the Fundación Séneca, the Región de Murcia (FS-RM) (20809/PI/18). L.S.-d.-C. is contracted by the Ramon y Cajal Program (RYC-2016-20036). R.M.D. is contracted by the eRYC-2016-20036 project. C.R.G is funded by the Ludwig Institute for Cancer Research.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study and not included within the Supplementary Materials are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** We thank M.A. Bernabeu (ACTI, University of Murcia) and A. Caro-Maldonado (Agilent Technologies) for their valuable advice and technical help during the development and analysis of the Seahorse experiments.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Majmundar, A.J.; Wong, W.J.; Simon, M.C. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol. Cell* **2010**, *40*, 294–309. [CrossRef] [PubMed]
2. Jun, J.C.; Rathore, A.; Younas, H.; Gilkes, D.; Polotsky, V.Y. Hypoxia-Inducible Factors and Cancer. *Curr. Sleep Med. Rep.* **2017**, *3*, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
3. Wigerup, C.; Påhlman, S.; Bexell, D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *164*, 152–169. [CrossRef] [PubMed]
4. Powis, G.; Kirkpatrick, L. Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 647–654.

5. Strowitzki, M.J.; Cummins, E.P.; Taylor, C.T. Protein Hydroxylation by Hypoxia-Inducible Factor (HIF) Hydroxylases: Unique or Ubiquitous? *Cells* **2019**, *8*, 384. [CrossRef]
6. Mills, C.N.; Joshi, S.S.; Niles, R.M. Expression and function of hypoxia inducible factor-1 alpha in human melanoma under non-hypoxic conditions. *Mol. Cancer* **2009**, *8*, 104. [CrossRef]
7. Petrova, V.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; Melino, G.; Amelio, I. The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis* **2018**, *7*, 10. [CrossRef]
8. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factors: Mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 207–214. [CrossRef]
9. Denat, L.; Kadekaro, A.L.; Marrot, L.; Leachman, S.A.; Abdel-Malek, Z.A. Melanocytes as instigators and victims of oxidative stress. *J. Investig. Dermatol.* **2014**, *134*, 1512–1518. [CrossRef]
10. Muñoz-Muñoz, J.L.; García-Molina, F.; Varón, R.; Tudela, J.; García-Cánovas, F.; Rodríguez-López, J.N. Generation of hydrogen peroxide in the melanin biosynthesis pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1794*, 1017–1029. [CrossRef]
11. Buscà, R.; Berra, E.; Gaggioli, C.; Khaled, M.; Bille, K.; Marchetti, B.; Thyss, R.; Fitsialos, G.; Larribère, L.; Bertolotto, C.; et al. Hypoxia-inducible factor 1-alpha is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in melanoma cells. *J. Cell Biol.* **2005**, *170*, 49–59. [CrossRef] [PubMed]
12. Bedogni, B.; Powell, M.B. Hypoxia, melanocytes and melanoma—Survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2009**, *22*, 166–174. [CrossRef] [PubMed]
13. Kuphal, S.; Winklmeier, A.; Warnecke, C.; Bosserhoff, A.K. Constitutive HIF-1 activity in malignant melanoma. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 1159–1169. [CrossRef] [PubMed]
14. Lee, K.; Zhang, H.; Qian, D.Z.; Rey, S.; Liu, J.O.; Semenza, G.L. Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 17910–17915. [CrossRef]
15. Haq, R.; Shoag, J.; Andreu-Perez, P.; Yokoyama, S.; Edelman, H.; Rowe, G.C.; Frederick, D.T.; Hurley, A.D.; Nellore, A.; Kung, A.L.; et al. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1α and MITF. *Cancer Cell* **2013**, *23*, 302–315. [CrossRef]
16. Ferguson, J.; Smith, M.; Zudaire, I.; Wellbrock, C.; Arozarena, I. Glucose availability controls ATF4-mediated MITF suppression to drive melanoma cell growth. *Oncotarget* **2017**, *8*, 32946–32959. [CrossRef]
17. Kim, S.G.; Kim, C.W.; Ahn, E.T.; Lee, K.Y.; Hong, E.K.; Yoo, B.I.; Han, Y.B. Enhanced anti-tumour effects of acriflavine in combination with guanosine in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, *49*, 216–222. [CrossRef]
18. Hay, N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: Can it be exploited for cancer therapy? *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 635–649. [CrossRef]
19. Hulse, M.; Caruso, L.B.; Madzo, J.; Tan, Y.; Johnson, S.; Tempera, I. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 is necessary for coactivating hypoxia-inducible factor-1-dependent gene expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1007394. [CrossRef]
20. Pereira, E.R.; Frudd, K.; Awad, W.; Hendershot, L.M. Endoplasmic reticulum (ER) stress and hypoxia response pathways interact to potentiate hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) transcriptional activity on targets like vascular endothelial growth factor (VEGF). *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 3352–3364. [CrossRef]
21. Kim, J.W.; Tchernyshyov, I.; Semenza, G.L.; Dang, C.V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* **2006**, *3*, 177–185. [CrossRef] [PubMed]
22. Roybal, C.N.; Hunsaker, L.A.; Barbash, O.; Vander Jagt, D.L.; Abcouwer, S.F. The oxidative stressor arsenite activates vascular endothelial growth factor mRNA transcription by an ATF4-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 20331–20339. [CrossRef] [PubMed]
23. Goding, C.R.; Arnheiter, H. MITF-The first 25 years. *Genes Dev.* **2019**, *33*, 983–1007. [CrossRef] [PubMed]
24. Louphrasitthiphol, P.; Ledaki, I.; Chauhan, J.; Falletta, P.; Siddaway, R.; Buffa, F.M.; Mole, D.R.; Soga, T.; Goding, C.R. MITF controls the TCA cycle to modulate the melanoma hypoxia response. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2019**, *32*, 792–808. [CrossRef]
25. Falletta, P.; Sanchez-Del-Campo, L.; Chauhan, J.; Effern, M.; Kenyon, A.; Kershaw, C.J.; Siddaway, R.; Lisle, R.; Freter, R.; Daniels, M.J.; et al. Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. *Genes Dev.* **2017**, *31*, 18–33. [CrossRef]
26. Vivas-Garcia, Y.; Falletta, P.; Liebing, J.; Louphrasitthiphol, P.; Feng, Y.; Chauhan, J.; Scott, D.A.; Glodde, N.; Chocarro-Calvo, A.; Bonham, S.; et al. Lineage-Restricted Regulation of SCD and Fatty Acid Saturation by MITF Controls Melanoma Phenotypic Plasticity. *Mol. Cell* **2020**, *77*, 120–139. [CrossRef]
27. Wortel, I.M.N.; van der Meer, L.T.; Kilberg, M.S.; van Leeuwen, F.N. Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. *Trends Endocrinol. Metab.* **2017**, *28*, 794–806. [CrossRef]
28. Iurlaro, R.; Püschel, F.; León-Annicchiarico, C.L.; O'Connor, H.; Martin, S.J.; Palou-Gramón, D.; Lucendo, E.; Muñoz-Pinedo, C. Glucose Deprivation Induces ATF4-Mediated Apoptosis through TRAIL Death Receptors. *Mol. Cell Biol.* **2017**, *37*, e00479-16. [CrossRef]
29. Yang, X.; Matsuda, K.; Bialek, P.; Jacquot, S.; Masuoka, H.C.; Schinke, T.; Li, L.; Brancorsini, S.; Sassone-Corsi, P.; Townes, T.M.; et al. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* **2004**, *117*, 387–398. [CrossRef]
30. Zeniou-Meyer, M.; Gambino, F.; Ammar, M.R.; Humeau, Y.; Vitale, N. The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 and neurosecretion. *Cell Mol. Neurobiol.* **2010**, *30*, 1401–1406. [CrossRef]

31. Befani, C.D.; Vlachostergios, P.J.; Hatzidaki, E.; Patrikidou, A.; Bonanou, S.; Simos, G.; Papandreou, C.N.; Liakos, P. Bortezomib represses HIF-1α protein expression and nuclear accumulation by inhibiting both PI3K/Akt/TOR and MAPK pathways in prostate cancer cells. *J. Mol. Med.* **2012**, *90*, 45–54. [CrossRef] [PubMed]
32. Agani, F.; Jiang, B.H. Oxygen-independent regulation of HIF-1: Novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* **2013**, *13*, 245–251. [CrossRef] [PubMed]
33. Feige, E.; Yokoyama, S.; Levy, C.; Khaled, M.; Igras, V.; Lin, R.J.; Lee, S.; Widlund, H.R.; Granter, S.R.; Kung, A.L.; et al. Hypoxia-induced transcriptional repression of the melanoma-associated oncogene MITF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, E924–E933. [CrossRef] [PubMed]
34. Guo, R.; Sun, L.; Li, Y.; Liu, Y. Pyruvate dehydrogenase kinase 1 interferes with glucose metabolism reprogramming and mitochondrial quality control to aggravate stress damage in cancer. *J. Cancer* **2020**, *11*, 962–973.
35. Papandreou, I.; Cairns, R.A.; Fontana, L.; Lim, A.L.; Denko, N.C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* **2006**, *3*, 187–197. [CrossRef] [PubMed]
36. Woo, Y.M.; Shin, Y.; Lee, E.J.; Lee, S.; Jeong, S.H.; Kong, H.K.; Park, E.Y.; Kim, H.K.; Han, J.; Chang, M.; et al. Inhibition of Aerobic Glycolysis Represses Akt/mTOR/HIF-1α Axis and Restores Tamoxifen Sensitivity in Antiestrogen-Resistant Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0132285. [CrossRef]
37. Phadngam, S.; Castiglioni, A.; Ferraresi, A.; Morani, F.; Follo, C.; Isidoro, C. PTEN dephosphorylates AKT to prevent the expression of GLUT1 on plasmamembrane and to limit glucose consumption in cancer cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 84999–85020. [CrossRef]
38. Wieman, H.L.; Wofford, J.A.; Rathmell, J.C. Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 1437–1446. [CrossRef]
39. Zhao, Y.; Hu, X.; Liu, Y.; Dong, S.; Wen, Z.; He, W.; Zhang, S.; Huang, Q.; Shi, M. ROS signaling under metabolic stress: Cross-talk between AMPK and AKT pathway. *Mol. Cancer* **2017**, *16*, 79. [CrossRef]
40. Elstrom, R.L.; Bauer, D.E.; Buzzai, M.; Karnauskas, R.; Harris, M.H.; Plas, D.R.; Zhuang, H.; Cinalli, R.M.; Alavi, A.; Rudin, C.M. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3892–3899. [CrossRef]
41. Priebe, A.; Tan, L.; Wahl, H.; Kueck, A.; He, G.; Kwok, R.; Opipari, A.; Liu, J.R. Glucose deprivation activates AMPK and induces cell death through modulation of Akt in ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.* **2011**, *122*, 389–395. [CrossRef] [PubMed]
42. Ploper, D.; Taelman, V.F.; Robert, L.; Perez, B.S.; Titz, B.; Chen, H.W.; Graeber, T.G.; von Euw, E.; Ribas, A.; De Robertis, E.M. MITF drives endolysosomal biogenesis and potentiates Wnt signaling in melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E420–E429. [CrossRef] [PubMed]
43. Deng, X.; Wang, Q.; Cheng, M.; Chen, Y.; Yan, X.; Frödin, M.; Jensen, C.J.; Merienne, K.; Gammeltoft, S. A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. *EMBO J.* **2000**, *19*, 2924–2934.
44. Dekervel, J.; Bulle, A.; Windmolders, P.; Lambrechts, D.; Van Cutsem, E.; Verslype, C.; van Pelt, J. Acriflavine Inhibits Acquired Drug Resistance by Blocking the Epithelial-to-Mesenchymal Transition and the Unfolded Protein Response. *Transl. Oncol.* **2017**, *10*, 59–69. [CrossRef] [PubMed]
45. Singleton, D.C.; Harris, A.L. Targeting the ATF4 pathway in cancer therapy. *Expert. Opin. Ther. Targets* **2012**, *16*, 1189–1202. [CrossRef]
46. Jung, S.N.; Yang, W.K.; Kim, J.; Kim, H.S.; Kim, E.J.; Yun, H.; Park, H.; Kim, S.S.; Choe, W.; Kang, I.; et al. Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 713–721. [CrossRef]
47. Ghanbari Movahed, Z.; Rastegari-Pouyani, M.; Mohammadi, M.H.; Mansouri, K. Cancer cells change their glucose metabolism to overcome increased ROS: One step from cancer cell to cancer stem cell? *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *112*, 108690. [CrossRef]
48. Banerjee, A.; Banerjee, V.; Czinn, S.; Blanchard, T. Increased reactive oxygen species levels cause ER stress and cytotoxicity in andrographolide treated colon cancer cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 26142–26153. [CrossRef]

cancers

MDPI

*Article*

# Acriflavine, a potent inhibitor of HIF1α, disturbs glucose metabolism and suppresses ATF4-protective pathways in melanoma under non-hypoxic conditions

**Román Martí-Díaz, María F. Montenegro, Juan Cabezas-Herrera, Colin R. Goding, José Neptuno Rodríguez-López and Luis Sánchez-del-Campo**

## Supplementary Material

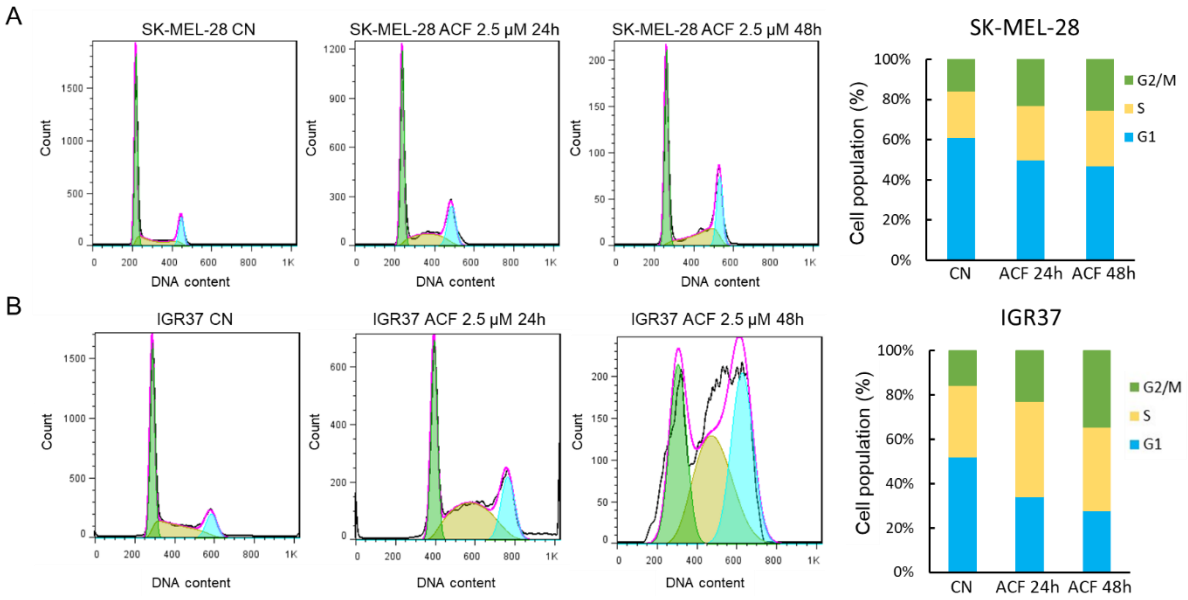



**Figure S1.** Cell cycle assays of SK-MEL-28 (A) and IGR37 (B) cells following ACF indicated treatments. Assays were performed as indicated in Figure 1B.

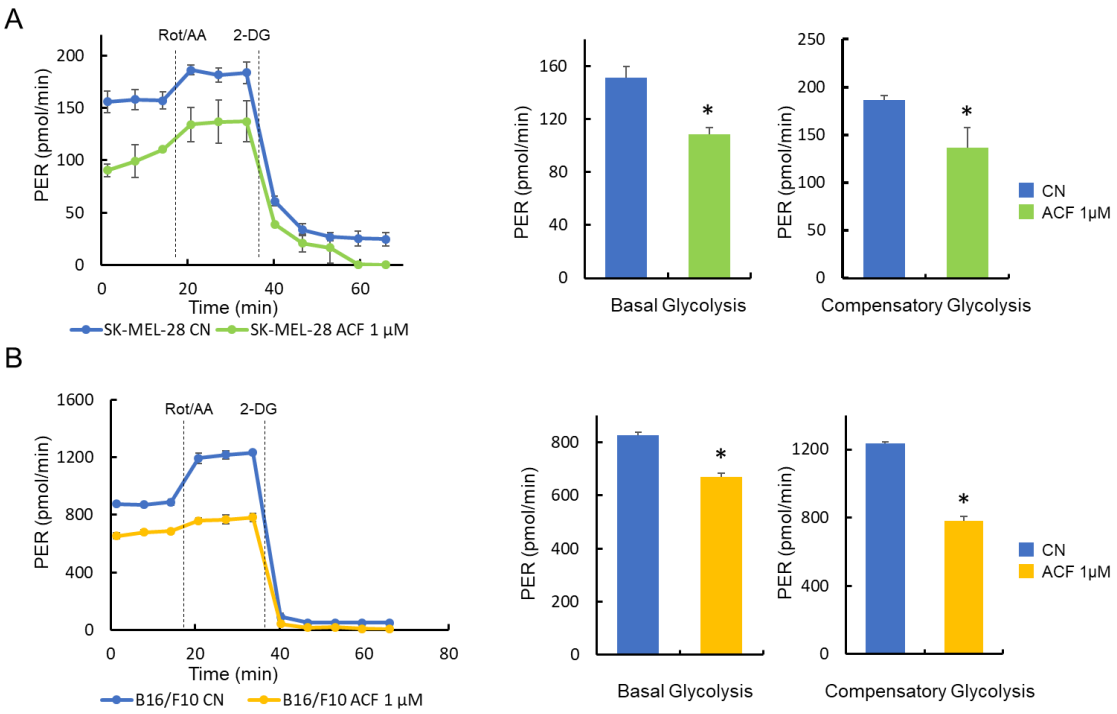
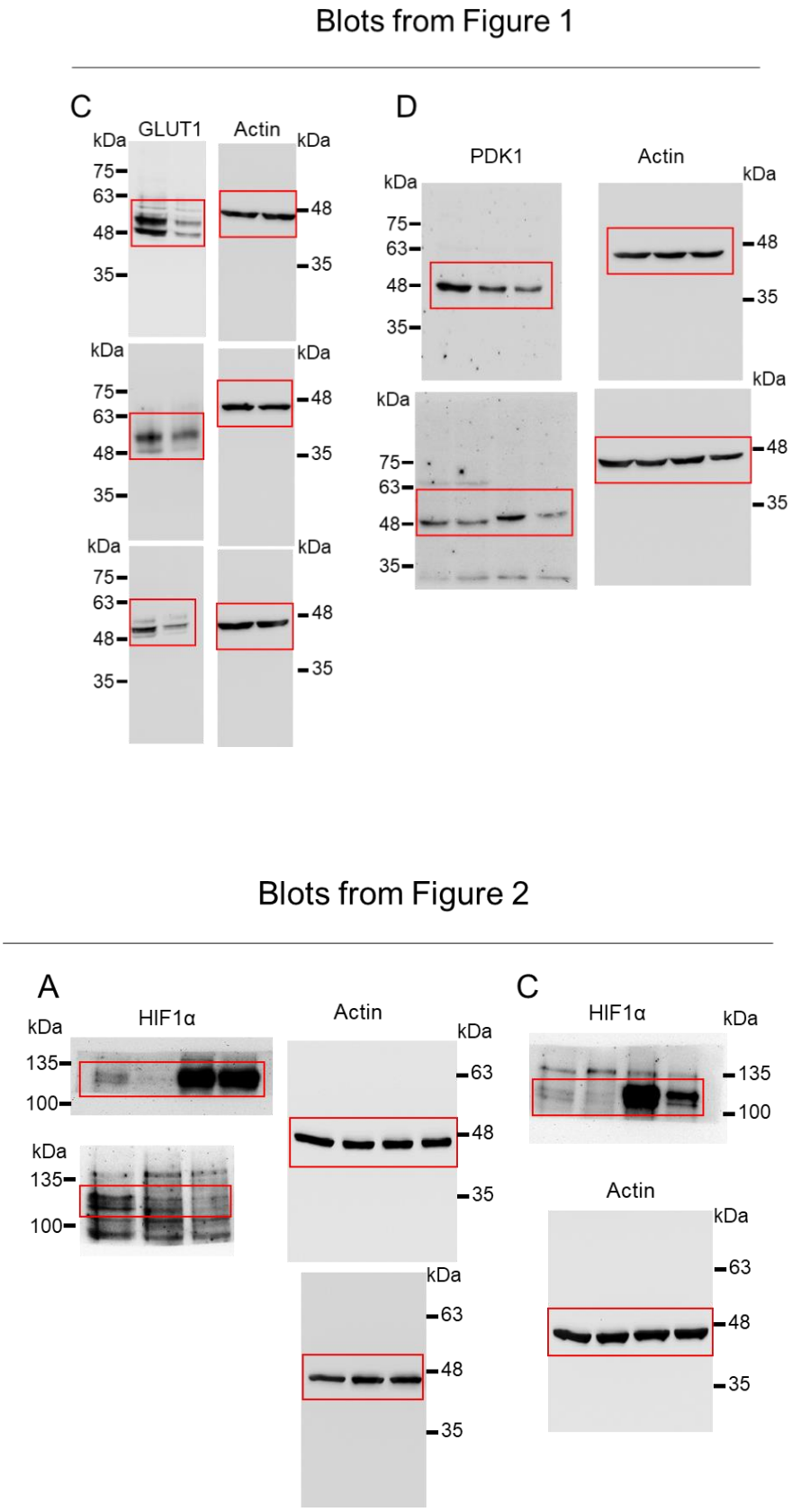
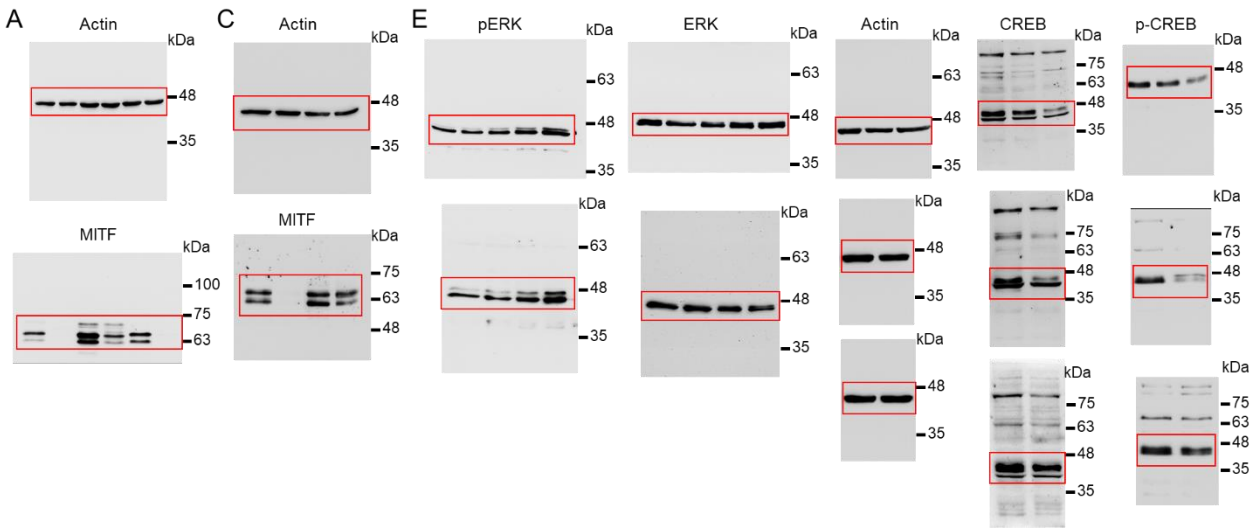



**Figure S2.** Glycolytic proton efflux rate (glycoPER) comparing untreated and ACF-treated melanoma cells. (A) SK-MEL-28 (B) B16/F10. Assays were performed as indicated in Figure 1F. P values for significant differences (Student's t-test) are summarized by one asterisk ($P < 0.05$) and groups are compared to ACF-untreated samples.

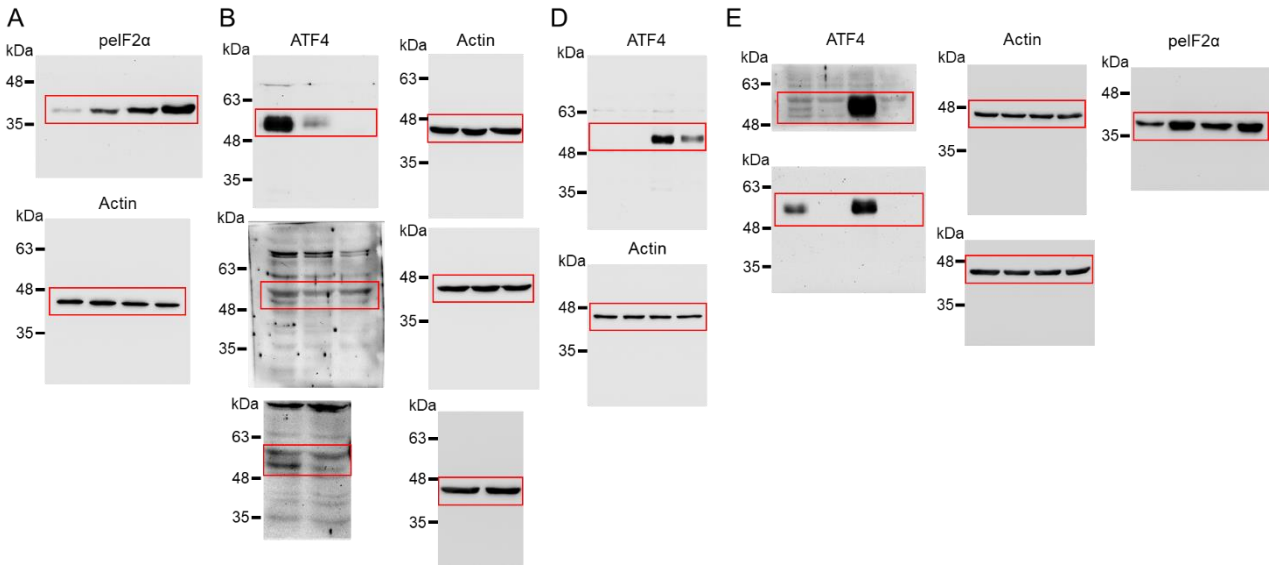
**Figure S3.** Uncropped Western blots for indicated Figures



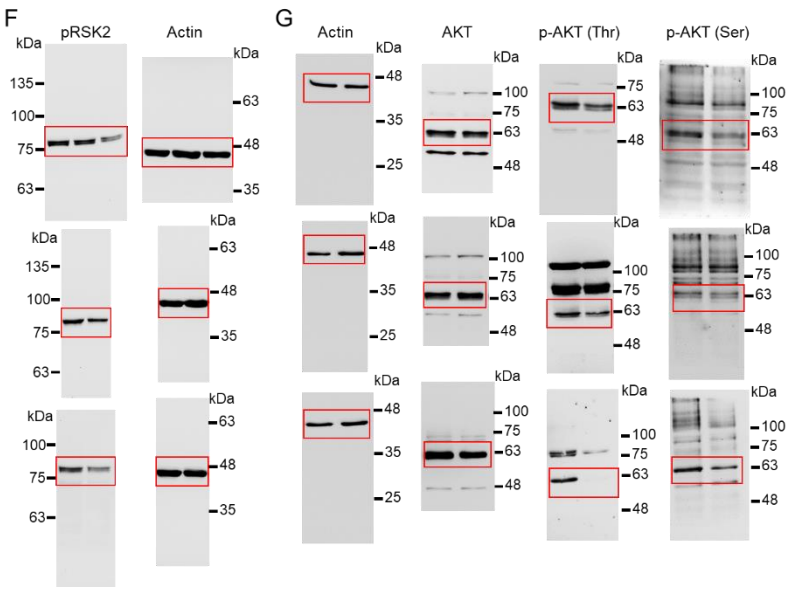
## Blots from Figure 3




## Blots from Figure 4 (A-E)




## Blots from Figure 4 (F-G)



# Blots from Figure 5

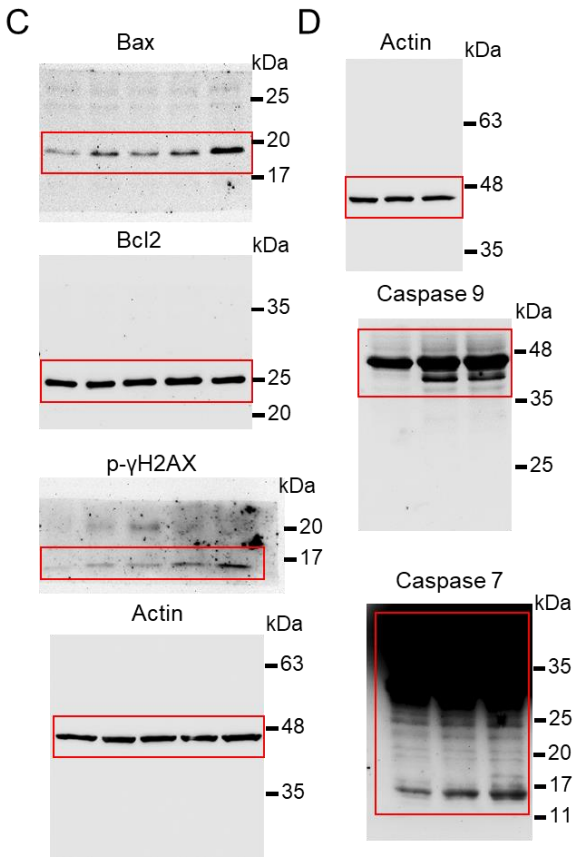


**Table S1.** Used primary antibodies.

| Antibody | Source | Catalogue number |
|---|---|---|
| Mouse monoclonal anti-β-Actin (AC-15) | Merck/Sigma | Cat# A5441 |
| Rabbit polyclonal anti-pCREB (Ser133) | Merck/Millipore | Cat# 06-519 |
| Mouse monoclonal anti-pERK1/2 | Merck/Sigma | Cat# M9692 |
| Rabbit monoclonal anti-ATF4 (D4B8) | Cell Signaling | Cat# 11815 |
| Mouse monoclonal p-γH2AX (Ser139) | Merck/Millipore | Cat# 05-636 |
| Mouse monoclonal anti-MITF | Merck/Millipore | Cat# MAB3747 |
| Mouse monoclonal anti-BCL2 | Merck/Sigma | Cat# B 3170 |
| Rabbit polyclonal anti-BAX | Santa Cruz | Cat# sc-493 |
| Mouse monoclonal anti-HIF1$\alpha$ | Novus | Cat# NB100-105 |
| Rabbit monoclonal anti-peIF2$\alpha$ (Ser51) | Cell Signaling | Cat# 3597 |
| Rabbit polyclonal anti-ERK2 | Santa Cruz | Cat# sc-154 |
| Rabbit polyclonal anti-CREB | Merck/Millipore | Cat# 06-863 |
| Mouse monoclonal anti-Caspase-9 | Santa Cruz | Cat# sc-17784 |
| Rat monoclonal anti-Caspase-7 | Merck/Sigma | Cat# C 1104 |
| Mouse monoclonal anti-GLUT1 | Abcam | Cat# ab40084 |
| Rabbit monoclonal anti-p-RSK2 | Abcam | Cat# ab75820 |
| Mouse monoclonal anti-p-AKT (Thr308) | Santa Cruz | Cat# sc-271966 |
| Mouse monoclonal anti-p-AKT (Ser473) | Merck/Millipore | Cat# 05-1003 |
| Rabbit monoclonal anti-AKT | Abcam | Cat# ab200195 |
| Mouse monoclonal anti-PDK1 | Thermo Fisher | Cat# MA5-15797 |

**Table S2.** The following primers for human genes were used.

| Genes | Source |
|---|---|
| MITF RT qPCR primers | Thermo-Fisher |
| F 5′-3′: GCGCAAAAGAACTTGAAAAC | |
| R 5′-3′: CGTGGATGGAATAAGGGAAA | |
| ATF4 RT qPCR primers | Thermo-Fisher |
| F 5′-3′: TCAAACCTCATGGGTTCTCC | |
| R 5′-3′: GTGTCATCCAACGTGGTCAG | |
| PDK1 RT qPCR primers | Thermo-Fisher |
| F 5′-3′: CGGATCAGAAACCGACACA | |
| R 5′-3′: ACTGAACATTCTGGCTGGTGA | |
| HIF1$\alpha$ RT qPCR primers | Thermo-Fisher |
| F 5′-3′: GAGATGTTAGCTCCCTATATCCCA | |
| R 5′-3′: TAGGTTCTTGTATTTGAGTCTGCTG | |
| VEGFA RT qPCR primers | Thermo-Fisher |
| F 5′-3′: TACTGCCATCCAATCGAGAC | |
| R 5′-3′: GCATGGTGATGTTGGACT | |
| β-Actin RT qPCR primers | Thermo-Fisher |
| F 5′-3′: AGAAAATCTGGCACCACACC | |
| R 5′-3′: GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA | |

## 5.2. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ASOCIADO A MICROFTALMIA (MITF) INDUCE EL ESCAPE DEL SISTEMA INMUNE INNATO EN EL MELANOMA




Los resultados del estudio de la función del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) sobre la evasión del sistema inmunitario innato en el melanoma se recogen en la publicación que se adjunta.

URL: https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-021-01916-8

### 5.2.1. TÍTULO

*MITF induces escape from innate immunity in melanoma.*

### 5.2.2. AUTORES

Luis Sánchez-del-Campo[1]*, Román Martí-Díaz[1]*, María F. Montenegro[1], Rebeca González-Guerrero[1], Trinidad Hernández-Caselles[4], Enrique Martínez-Barba[5], Antonio Piñero-Madrona[6], Juan Cabezas-Herrera[2], Colin R. Goding[3] y José Neptuno Rodríguez-López[1].

*Autores principales.

[1]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, España.

[2]Grupo de investigación de Terapias Moleculares y Biomarcadores de Tumores Sólidos, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), 30120, Murcia, España.

[3]Ludwig Institute for Cancer Research, Nuffield Department of Clinical Medicine, Universidad de Oxford, Headington, Oxford OX3 7DQ, Reino Unido.

[4]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, España.

[5]Departamento de Patología, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), 30120, Murcia, España.

[6]Departamento de Cirugía, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), 30120, Murcia, España.

### 5.2.3. REFERENCIA

*Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2021) *CR*, *40*, 117.

https://doi.org/10.1186/s13046-021-01916-8

### 5.2.4. RESUMEN

El uso de la inmunoterapia ha revolucionado el tratamiento del cáncer. Sin embargo, aún se desconoce cómo el sistema inmune responde ante la diversidad fenotípica presente en los tumores. En el caso del melanoma, uno de los principales determinantes de la identidad fenotípica es el oncogén de supervivencia de linaje MITF, que integra diversas señales microambientales para coordinar procesos implicados en la fisiopatología del melanoma y que incluyen su supervivencia, la evasión de la senescencia, la diferenciación, la proliferación, la invasión, el metabolismo y la reparación de daños en el ADN. Sin embargo, hasta hoy se desconoce el papel de MITF en la respuesta inmunitaria. Mediante el uso de varios modelos de melanoma de ratón, exploramos el posible papel de MITF en la modulación de la respuesta inmune contra el melanoma. Se emplearon técnicas como ChIP-seq, Western blot, microscopía confocal, edición genómica mediante CRISPR/Cas9 y pruebas de luciferasa, entre otras, para determinar los mecanismos subyacentes por los que la plasticidad fenotípica impulsada por MITF modula la respuesta mediada por células NK en melanoma. Los resultados mostraron que MITF regulaba la expresión de ADAM10, una enzima que corta los ligandos MIC-A/B, claves para la interacción con las células NK. Mediante el control del reconocimiento del melanoma por las células NK, MITF es capaz de regular la respuesta del melanoma al sistema inmunitario innato. En consecuencia, mientras que las células de melanoma con bajos niveles de expresión de MITF pueden ser eliminadas eficientemente por las células NK, las células de melanoma con una mayor expresión de MITF logran escapar a la vigilancia de las células NK. Como conclusión, nuestros resultados indican que la modulación de MITF es un factor significativo en la respuesta inmune contra el melanoma que debería ser tenido en cuenta al aplicar terapias inmunitarias específicas para el tratamiento del melanoma.

Sánchez-del-Campo et al. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research (2021) 40:117
https://doi.org/10.1186/s13046-021-01916-8

Journal of Experimental & Clinical Cancer Research

RESEARCH Open Access

# MITF induces escape from innate immunity in melanoma

Luis Sánchez-del-Campo[1*†], Román Martí-Díaz[1†], María F. Montenegro[1], Rebeca González-Guerrero[1], Trinidad Hernández-Caselles[2], Enrique Martínez-Barba[3], Antonio Piñero-Madrona[4], Juan Cabezas-Herrera[5], Colin R. Goding[6] and José Neptuno Rodríguez-López[1*]

## Abstract

**Background:** The application of immune-based therapies has revolutionized cancer treatment. Yet how the immune system responds to phenotypically heterogeneous populations within tumors is poorly understood. In melanoma, one of the major determinants of phenotypic identity is the lineage survival oncogene MITF that integrates diverse microenvironmental cues to coordinate melanoma survival, senescence bypass, differentiation, proliferation, invasion, metabolism and DNA damage repair. Whether MITF also controls the immune response is unknown.

**Methods:** By using several mouse melanoma models, we examine the potential role of MITF to modulate the anti-melanoma immune response. ChIP-seq data analysis, ChIP-qPCR, CRISPR-Cas9 genome editing, and luciferase reporter assays were utilized to identify ADAM10 as a direct MITF target gene. Western blotting, confocal microscopy, flow cytometry, and natural killer (NK) cytotoxicity assays were used to determine the underlying mechanisms by which MITF-driven phenotypic plasticity modulates melanoma NK cell-mediated killing.

**Results:** Here we show that MITF regulates expression of ADAM10, a key sheddase that cleaves the MICA/B family of ligands for NK cells. By controlling melanoma recognition by NK-cells MITF thereby controls the melanoma response to the innate immune system. Consequently, while melanoma MITF$^{Low}$ cells can be effectively suppressed by NK-mediated killing, MITF-expressing cells escape NK cell surveillance.

**Conclusion:** Our results reveal how modulation of MITF activity can impact the anti-melanoma immune response with implications for the application of anti-melanoma immunotherapies.

**Keywords:** MITF, Melanoma, ADAM10, NK-cells, Anti-tumor immunity

## Background

Cancer is characterized by deregulated cell proliferation driven by activation of pro-proliferative signaling and senescence bypass [1]. As tumors expand, the probability of metastatic dissemination increases with metastases being the major cause of cancer-related death [2]. Over recent years therapeutic options for many cancers have evolved away from non-specific chemotherapies, toward drugs targeting specific driver pathways and more recently a variety of immunotherapies, many of which target immune checkpoints [3]. Yet despite a significant increase in the effectiveness of anti-cancer therapies, many challenges remain, including understanding how the interaction between cancer cells and the immune system modulate the anti-cancer immune response.

Melanoma, a highly aggressive skin cancer originating from melanocytes, represents an excellent model to

* Correspondence: sancampo@um.es; neptuno@um.es
†Luis Sánchez-del-Campo and Román Martí-Díaz contributed equally to this work.
[1]Department of Biochemistry and Molecular Biology A, School of Biology, IMIB-University of Murcia, 30100 Murcia, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

examine the bidirectional interaction between cancer cells and the immune system. Cutaneous melanoma exhibits one of the highest mutation burdens of any cancer, especially C > T UV signature mutations [4] reflecting the fact that exposure to solar UV represents one of the primary causes of melanoma initiation. Although early stage melanoma can be effectively cured by surgical excision, metastatic melanoma has historically had a dismal prognosis; once the disease has spread to the main organs, the survival rate can be as low as 7% largely owing to resistance to conventional chemotherapy [5]. Although therapies targeting activated BRAF, a key driver in around 50% of cutaneous melanomas [6], can have a major therapeutic benefit, resistance almost inevitably emerges within a few months [7]. More recently therapies aimed at enhancing the anti-tumor T-cell responses by blocking immune checkpoints or using adoptive T-cell therapy have been employed with considerable success in several tumor types [8], yet a high proportion of patients still fail to exhibit a durable response in melanoma as well as in other cancer types [9].

One of the key determinants of the response to immune checkpoint blockade is the combination of tumor mutation burden together with the degree of intratumor genetic heterogeneity. Evidence suggests that while tumor mutation burden may be important in generating neoantigens, increased genetic heterogeneity may lead to a less favorable outcome with reduced T-cell reactivity [10]. However, although intratumor genetic heterogeneity is important, it may be insufficient to explain how resistance emerges to both immune and targeted therapies [11, 12]. Increasing evidence from a variety of cancer types including melanoma, suggests that plasticity encoded by the cancer genome endows cells with a capacity to switch phenotypes in response to changes in the microenvironment [2, 13, 14], with some phenotypic states able to tolerate exposure to multiple therapeutic modalities. In melanoma, several distinct phenotypic states have been identified [12] with a variety of microenvironmental cues, including hypoxia [15, 16], nutrient limitation [17, 18], BRAF inhibition [19], inflammation and immunotherapy [17, 20], able to induce cells to de-differentiate and become invasive and therapy-resistant. Understanding how different phenotypes are established and maintained is therefore important if this non-genetic barrier to effective therapy is to be overcome.

A key determinant of melanoma phenotype is the expression and activity of the microphthalmia-associated transcription factor MITF [21]. MITF represents a major coordinator of melanoma cell biology. It promotes survival, differentiation and proliferation, and plays a critical role in regulating melanoma metabolism [22]. Significantly, MITF expression is transcriptionally and translationally suppressed by several microenvironmental signals such that $MITF^{Low}$ cells adopt an invasive, tumor-initiating and drug and immunotherapy-resistant state [12]. Indeed, modulating MITF activity can alter the ability of melanoma cells to respond to therapy [23]. However, whether MITF might control sensitivity of melanoma cells to the immune system remains unclear, and whether modulation of MITF levels using currently available therapeutic modalities might impact the immune response is unknown. This is important since it is possible that different phenotypic subpopulations characterized by distinct MITF levels would respond differently to the innate versus adaptive immune system with major implications for anti-cancer immunotherapies. To address these key issues we developed an immunogenic mouse model, and examined the effect of MITF knockout on the anti-melanoma immune response. The results reveal a critical role for MITF in determining the response to the innate immune system by controlling the shedding of the ligands for natural killer (NK) cells.

## Methods

### Antibodies

Antibodies against the following proteins were used: β-Actin (Merck, Madrid, Spain; monoclonal clone AC-15; #A5441), ADAM10 (Abcam, Cambridge, UK; rabbit polyclonal; #ab1997), N-Cadherin (Merck; rabbit monoclonal; #04–1126), Calreticulin (Thermo-Fisher, Barcelona, Spain; mouse monoclonal; #MA5–11723), CD19-PE-Cy5 (Biolegend, San Diego, CA, USA; clone 6D5; # 115509), CD3ε- FITC (Biolegend; clone 145-2C11; # 100305), CD314 (NKG2D)-PerCP-eFluor 710 (Thermo-Fisher; clone CX5; #46–5882-80), CD335 (NKp46)-APC (Biolegend; clone 29A1.4; #137607), CD45-PerCP-Cy5.5 (Biolegend; clone 30–711; Cat# 103131), CD8a-PE (Thermo-Fisher; clone 53.6.7; # 12–0081-82), F4/80-APC (eBioscience, San Diego, CA, USA; clone BM8; #17–4801-30), FLAG (Merck; monoclonal clone M2; #F1804), HIF1α (Novus, St Charles, MO, USA; monoclonal clone H1alpha67; #NB100–105), MLANA (Abcam, Cambridge, UK; mouse monoclonal; #ab200544), MITF (Millipore; mouse monoclonal; #MAB3747), Rae1δ (Thermo-Fisher; mouse monoclonal; #14–5756-81), HLA-ABC (Thermo-Fisher; mouse monoclonal; #MA5–11723), HLA-E (Thermo-Fisher; mouse monoclonal; #14–9953-80).

### Cell cultures and treatments

HEK293 and melanoma cell lines (IGR37, IGR39, 501mel, A375, SK-MEL-28, G361, and SK-MEL-2) were tested for mycoplasma and authenticated using genotype profiling according to the ATCC guidelines. YAC-1 cells were kindly provided by Dr. Detlef Schuppan (Institute of Translational Immunology and Research Center for Immunotherapy, University Medical Center Mainz,

Mainz, Germany) [24]. B16/F10-luc2 mouse melanoma cells were obtained from Caliper Life Sciences (Hopkinton, MA, USA). Cells were cultured in 10% $CO_2$ at 37 °C with 1% penicillin–streptomycin EMEM plus 10% fetal bovine serum (FBS). Cell proliferation was evaluated using colorimetric assays to analyze mitochondrial functions (MTT; Merck). For these assays, cells were plated in 96-well plates at a density of 1000–2000 cells/well. For ionizing radiation assays, the cells were irradiated using an Andrex SMART 200E machine (YXLON International, Hamburg, Germany) operating at 200 kV, 4.5 mA with a focus-object distance of 20 cm at room temperature and at a dose rate of 10 Gy. The radiation doses were monitored using a UNIDOS universal dosimeter in a PTW Farme ionization chamber TW 30010 (PTW-Freiburg, Freiburg, Germany) in a radiation cabin. Cobalt chloride ($CoCl_2$; Merck) treatment effectively induced the stabilization of HIF1α in melanoma cells. A fresh stock solution 0.4 M $CoCl_2$ was prepared in water and added to the medium to obtain desired final concentrations. Cells were incubated with 200 μM $CoCl_2$ for indicated periods of time. For glutamine deprived experiments cells were cultured in EMEM without glutamine plus 10% dialyzed FBS.

### CRISPR/Cas9 MITF and ADAM10-knockout

IGR37-MITF-KO, B16/F10-luc2-MITF-KO and B16/F10-luc2-ADAM10-KO cells were generated using the CRISPR/Cas9 technique. Cells were grown up to 60–70% confluency in a 6-well plate and transfected with the Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) plasmids MITF or ADAM10 CRISPR/Cas9 containing the specifics gRNA sequences and the Cas9 ribonuclease (MITFh #SC-400401-KO-2, MITFm #SC-421654-KO-2, ADAM10m #SC-418981) and their HDR plasmids containing the puromycin resistance gene for selection (MITFh #SC-400401-HDR, MITFm #SC-421654-HDR, ADAM10m #SC-418981-HDR) using the FuGENE6 transfection reagent (Promega, Madison, WI, USA) and a 1:3 DNA/FuGENE6 ratio. The transfection medium was maintained for 48 h. At day 2, medium was changed with fresh medium and puromycin was added at 5 μg/mL. Cells were allowed to grow for three more days. After 5–6 days, single cell colonies were isolated and cell colonies were expanded. Positives clones were characterized by genomic DNA extraction followed by Sanger sequencing and western blot experiments.

### Stealth RNA transfections

Specific Stealth siRNAs for MITF (#HSS142939 and #HSS142940) were obtained from Thermo-Fisher and transfected into melanoma cells using Lipofectamine 2000. Stealth RNA-negative control duplexes (Thermo-Fisher) were used as control oligonucleotides, and the ability of the Stealth RNA oligonucleotides to knockdown the expression of selected genes was analyzed using western blot analysis at 72 h after siRNA transfection.

### PCR analysis

mRNA extraction, cDNA synthesis, and conventional and quantitative real-time RT-PCR were performed under standard conditions [25]. Primers were designed using Primer Express version 2.0 software and synthesized by Thermo Fisher Scientific. The following primers for human genes were used: MITF (forward: 5′-GCG CAA AAG AAC TTG AAA AC-3′; reverse: 5′- CGT GGA TGG AAT AAG GGA AA-3′), ADAM10 (forward: 5′-CTG CCC AGC ATC TGA CCC TAA-3′; reverse: 5′-TTG CCA TCA GAA CTG GCA CAC-3′), HLA-A (forward: 5′-AAA AGG AGG GAG TTA CAC TCA GG-3′; reverse: 5′-GCT GTG AGG GAC ACA TCA GAG-3′), HLA-B (forward: 5′-CTA CCC TGC GGA GAT CA-3′; reverse: 5′-ACA GCC AGG CCA GCA ACA-3′), HLA-C (forward: 5′-ATC GTT GCT GGC CTG GCT GTC CT-3′; reverse: 5′-TCA TCA GAG CCC TGG GCA CTG TT-3′), HLA-E (forward: 5′-CCT ACG ACG GCA AGG $A^{-3}$′; reverse: 5′-CCC TTC TCC AGG TAT TTG TG-3′), β-actin (forward: 5′-AGA AAA TCT GGC ACC ACA CC-3′; reverse: 5′-GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA-3′). Reactions were done in SYBR Green mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and relative mRNA expression levels were normalized to β-actin.

### Confocal microscopy

Imaging of fluorescence staining was done by confocal imaging of fixed cells with a laser-scanning confocal inverted microscope (Leica TCS 4D, Wetzlar, Germany), and a 63×/1.4 numerical aperture oil objective was used to image the samples. For indirect immunofluorescence studies, cells were grown on 100-$mm^2$ coverslips, fixed in 3% paraformaldehyde and permeabilized (when necessary) with 0.2% Triton X-100. Coverslips were incubated in 5% bovine serum albumin (BSA) for 20 min and probed with primary antibodies (diluted 1:200 in PBS containing 5% BSA) for 2 h at room temperature. Cells were washed three times in PBS and incubated for 1 h at room temperature with Alexa Fluor Dyes [Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H + L) (#A11001) and Alexa Fluor 633 goat anti-rabbit IgG (H + L) (#A21071) both from Thermo-Fisher]. Coverslips were permanently mounted to the slides using fluorescent mounting medium (PROLONG-GOLD, Thermo Fisher Scientific).

### Western blots

Whole-cell lysates were collected by adding SDS-PAGE sample loading buffer. After sonication, the samples were boiled (10 min) and proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and analyzed using immunoblotting (WesternBright Quantum, Advansta, San Jose, CA, USA).

### Flow Cytometry

Samples were analyzed using flow cytometry in a FACSort cytometer (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and Cell Quest (BD) and by FlowJo software version 10.2 (FlowJo, Ashland, OR, USA) [26]. Analysis of the immunoinfiltrate in mice lungs was performed by Flow cytometry of single cell suspensions. For this, lungs were collected, washed in PBS, minced and digested using Collagenase IV (Merck) at 37 °C for 30 min. After incubation, the remaining tissues were filtered through a 70 μm filter (BD) and washed in complete EMEM medium. After isolation by Ficoll density gradient, leukocyte were stained for flow cytometry analysis. Briefly, $0.3 \times 10^6$ cells were incubated with anti-CD3-FITC, anti-NKp46-APC and anti-CD45-PerCP-Cy5.5 antibodies for 15 min in the dark, fixed (1x BD lysis solution), washed (PBS) and then were acquired in a LSR Fortessa X-20 Cytometer (BD). To analyse data, lymphocyte region was selected on the forward scatter versus side scatter plot and then gated on the CD45+ cells to exclude cell debris and non-hematopoietic cells. NK cells were identified as CD3 −/NKp46+ cells.

### ChIP assays

The ChIP assays were performed with the Magna ChIP kit (#17–10,085) from Merck according to the manufacturer's instructions. Briefly, 501mel or IGR37 melanoma cells were cross-linked with formaldehyde 0.4% and the reaction was stopped by adding glycine to final concentration 0.2 M. Cells where lysated and DNA was sheared by sonication to give an average size of 300 to 3000 bp. The cross-linked chromatin was then used for immunoprecipitation with MITF antibody, HDAC3 antibody (positive control) or mouse IgG (negative control). DNA from lysates prior to immunoprecipitation was used as positive input controls. After washing, elution, and DNA purification, the DNA solution (2 μl) was used as a template for real-time PCR amplification using specific human primers: ADAM10 (forward: 5′-GCG CGT CAC GTG GTG AGG AA-3′; reverse: 5′-CCC TGG CAG GAG AAA CGG CG-3′); and GAPDH (forward: 5′-CAA TTC CCC ATC TCA GTC GT-3′; reverse: 5′-TAG TAG CCG GGC CCT ACT TT-3′). Negative control region for SILV (forward: 5′-CAT GGA GAA CTT CCA AAA GGT GG-3′; reverse: 5′-TAC TCT CCC CAG GGA GTA TAA GT-3′) were also used for PCR amplification. Standard curves were generated for all primer set to confirm linearity of signals over the experimentally measured ranges.

### Luciferase assay

ADAM10 LightSwitch Promoter Reporter GoClones (RenSP, #S722690) and empty promoter vectors (#S790005) were obtained from SwitchGear Genomics (Menlo Park, CA, USA) and transfected into HEK293 cells using FuGENE6 according to the manufacturer's instructions. MITF-FLAG was made by cloning the MITF-M cDNA into p3xFLAG-CMV-14 (Merck). Cells were lysated 48 h after transfections and luciferase activity was measured in triplicates using LightSwitch luciferase Assay Reagent (SwitchGear Genomics) and Fluostar Omega plate reader (BMG Labtech., Ortenberg, Germany). The mutant for the ADAM10 promoter reporter was made using its LightSwitch Promoter Reporter as template, changing CACGTG to CTGGTG in the MITF binding sequence (E-Box). Point mutations were created using the QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) following the manufacturer's recommendations together with the following mutagenesis primers: M-F, 5′-GCC CGC GCG TCA CCA GGT GAG GAA GGA G-3′ and M-R, 5′-CTC CTT CCT CAC CTG GTG ACG CGC GGG C-3′.

### Isolation of NK cells and NK cytotoxicity assays

Murine NK cells were isolated from spleens of C57BL/6 or Nude-Foxn1nu mice. Spleens were mechanically dissociated, and mononuclear cells were isolated by Ficoll density gradient centrifugation. Cells were washed with PBS and NK cells were enriched by negative selection using the Mouse NK Cell Isolation Kit II (#130–096-892, Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA). Cells were then incubated with anti-NKp46-APC, anti-CD3-FITC and -anti-CD19-PE-Cy5 to confirm the correct NK cell purification. When mice were no previously immunized, NK cells were activated with 200 units/ml IL-2 (Thermo-Fisher). Target cells were labeled for 1.5 h with 100 μCi of $^{51}Cr/10^6$ cells in 0.2 ml of media in a 5% $CO_2$, 95% humidified atmosphere incubator at 37 °C. To determine the experimental release of $^{51}Cr$ (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA), NK cells were added in an equal volume, but at different ratios. To determine maximum and spontaneous release of $^{51}Cr$, target cells were mixed with an equal volume of 2% Triton-X100 in PBS or an equal volume of media, respectively. Plates were then spun for 1 min at 1000 rpm. NK cells and target cells were incubated for 4 h at 37 °C 5% $CO_2$. After incubation, plates were centrifuged (2000 rpm, 5 min) and 100 μl of supernatant was collected, mixed with scintillation fluid, and radioactivity was quantified using

a MicroBeta2 reader (Perkin Elmer). Specific killing ($^{51}$Cr release) was calculated using the following formula: 100 x (Experimental release - Spontaneous release)/(Maximum release - Spontaneous release).

### ELISA assays

Soluble forms of NKG2D ligands MICA and MICB were quantified in cell free supernatants using sandwich ELISA following the manufacturer's instruction (Human MICA #RAB0358 from Merck and Human MICB #BMS2303 from Thermo-Fisher). Absorbance was measured at 450 nm with a reference wavelength of 620 nm in a Bio-Rad Filter-based microplate spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). ELISA absorbance values were proportional to the concentration of protein stablished with lyophilized standards. Apoptosis was quantified using a Cell Death Detection ELISA$^{PLUS}$ kit (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) following manufacture's protocol.

### Mice

Female C57BL/6, Rag2−/− Il2rg−/−, Athymic Nude-Foxn1nu mice, 4–5 weeks of age, were all obtained from Envigo (Barcelona, Spain). Mice were housed under aseptic conditions (positive air pressure in a designated mouse room with microisolator tops), in the specific pathogen free animal facility at University of Murcia and all mouse handling procedures were carried out under a laminar flow hood. Primary tumors were stablished subcutaneously with $5 \times 10^5$ B16/F10 cells with luciferase expression. For metastases colonization experiments, $5 \times 10^5$ B16/F10 cells expressing luciferase were injected intravenously into mice through the tail vein. Primary tumors and metastases were analyzed using the IVIS Imaging System (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA). For CD8+ T cell depletion experiments, 250 μg anti-CD8 (Bio-XCell, West Lebanon, NH, USA; clone 2.43; #BE0117) per mouse was delivered four times by i.p. injection every 3 days. We made every attempt to reach the conclusion using as small sample size as possible. We usually exclude samples if we observe any abnormality in terms of size, weight or apparent disease symptoms in mice before performing experiments. However, we did not exclude any animals here, as we did not observe any abnormalities in the present study. Neither randomization nor blinding was performed in this study.

### Histology and immunohistochemistry

Mice were sacrified 3 weeks after tail vein injections when the presence or absence of metastases was assayed using the IVIS imaging System. Lungs were removed, washed in PBS and fixed in 10% formalin. Routine hematoxylin and eosin (H&E) staining was performed on serial sections of paraffin embedded tissues. Light microscope photographs of the stained sections were collected using a Nikon Eclipse 90i microscope and images were analyzed using ImageJ software. For immunohistochemistry, paraffin sections were deparaffinized and subjected to antigen retrieval in sodium citrate buffer (pH 6.0). Tissue endogenous peroxidase was inactivated with 5% hydrogen peroxide. Slides were blocked and incubated with a NKp46 primary antibody (#PA5–79720, Thermo-Fisher) overnight at 4 °C. Next, slides were incubated with secoundary antibodies conjugated with peroxidase and specific reaction was developed with 0.2% diaminobenzidine tetrahydrochloride and hydrogen peroxide.

### Quantification and statistical analysis

Western blot analyses and analyses of microscopy data were performed as we have previously described [26]. Analyses were repeated at least three times, with similar results. The results from one experiment are shown. To quantify the results, the western blots were scanned using a Bio-Rad ChemiDoc scanning densitometer (Bio-Rad Laboratories). Fluorescence intensity versus cell number analysis in confocal microscopy experiments was performed with ImageJ-NIH (Bethesda, MD, USA). For other experiments, the mean ± S. D of three measurements performed in triplicate were calculated. Numerical data were analyzed to determine statistical significance using Mann–Whitney tests for comparisons of means in the SPPS statistical software for Microsoft Windows, release 6.0 (Professional Statistic, Chicago, IL, USA). Individual comparisons were made using Student's two-tailed, unpaired t-tests. The criterion for significance was $p < 0.05$ for all comparisons. Normality was tested using the Shapiro-Wilk test.

## Results

### Ex vivo irradiation induces immune suppression of melanoma tumor formation

One of the defining features of human melanoma is its unusually high mutation burden that is thought to increase its potential recognition by the immune system. However, mouse melanomas in general are poorly immunogenic. For example, the widely used B16/F10 melanoma cell line has been defined as poorly immunogenic based on its ability to form consistent subcutaneous tumors in syngeneic C57BL/6 mice [27]. However, irradiation of mouse melanoma cell lines can generate neoantigens that improve immune recognition and recapitulate the genetic heterogeneity associated with the human disease [10]. As a first step in assessing the potential impact of MITF on the anti-melanoma immune response, we developed an immunogenic B16/F10 melanoma model that accurately reflects the human disease by subjecting cells to irradiation prior to inoculation into

immunocompetent mice. To this end, we injected cells into the tail vein of syngeneic C57BL/6 mice either naïve B16/F10 luciferase-expressing melanoma cells or those exposed to 10 Gy 24 h prior to injection, and assessed their ability to initiate colonies within the lung. The results were striking. In immunecompetent C57BL/6 mice, non-irradiated cells readily colonized the lungs, the initial destination of tail vein injected cells (Fig. 1a). By contrast, using irradiated B16/F10 cells, we observed a complete reduction of tumor load. Compared with animals injected with untreated B16/F10 cells, mice injected with irradiated cells were free of disease and with a longer and indefinite time of survival. To determine whether this effect was mediated by the immune system and not due to reduced viability and/or colonization capacity of the irradiated cells, cells were also injected into an athymic nude mouse model (Hsd: Athymic Nude-Foxn1nu), lacking T cells but maintaining the functionality of B and NK cells. In this model the effectiveness of cell irradiation in suppressing lung colonization was severely reduced, resulting in rapid tumor formation (Fig. 1b). In agreement with this observation, inactivation of CD8+ T cells using a specific antibody (Fig. S1) abolished some of the effect of irradiated cells in immunecompetent mice, resulting in tumor growth but with a delayed formation that resulted in prolonged survival (Fig. 1c). These observations indicate that irradiated melanoma cells elicit an anti-melanoma immune response mediated in part by the adaptive immune system.

To confirm that irradiation modulated the immune responsiveness of melanoma cells, we next examined the effect of irradiation on the expression of MHC class I genes that are required for antigen presentation and immune recognition. Using an anti-HLA-ABC antibody, we observed that IR increased the expression of these MHC class I molecules as detected by immunofluorescence (Fig. S2a) that was reflected in elevated cell surface expression detected by flow cytometry (Fig. S2b) of both HLA-ABC as well as HLA-E. Using qRT-PCR to determine the mRNA levels of these four MHC class I molecules in melanoma cells after IR, demonstrated a significant increase of HLA-A and-E mRNA, but not for HLA-B and -C mRNA (Fig. S2c). We also noted a substantial increase in cell surface expression of calreticulin (Fig. S2d) in human SK-MEL-28 melanoma cells, and especially in the IGR39 cell line that is known to be BRAF inhibitor tolerant and displays gene expression signatures linked to immunotherapy resistance [28]. Since cell-surface expression of calreticulin is important for recognition by dendritic cells [29], the increased expression of calreticulin would also be consistent with an

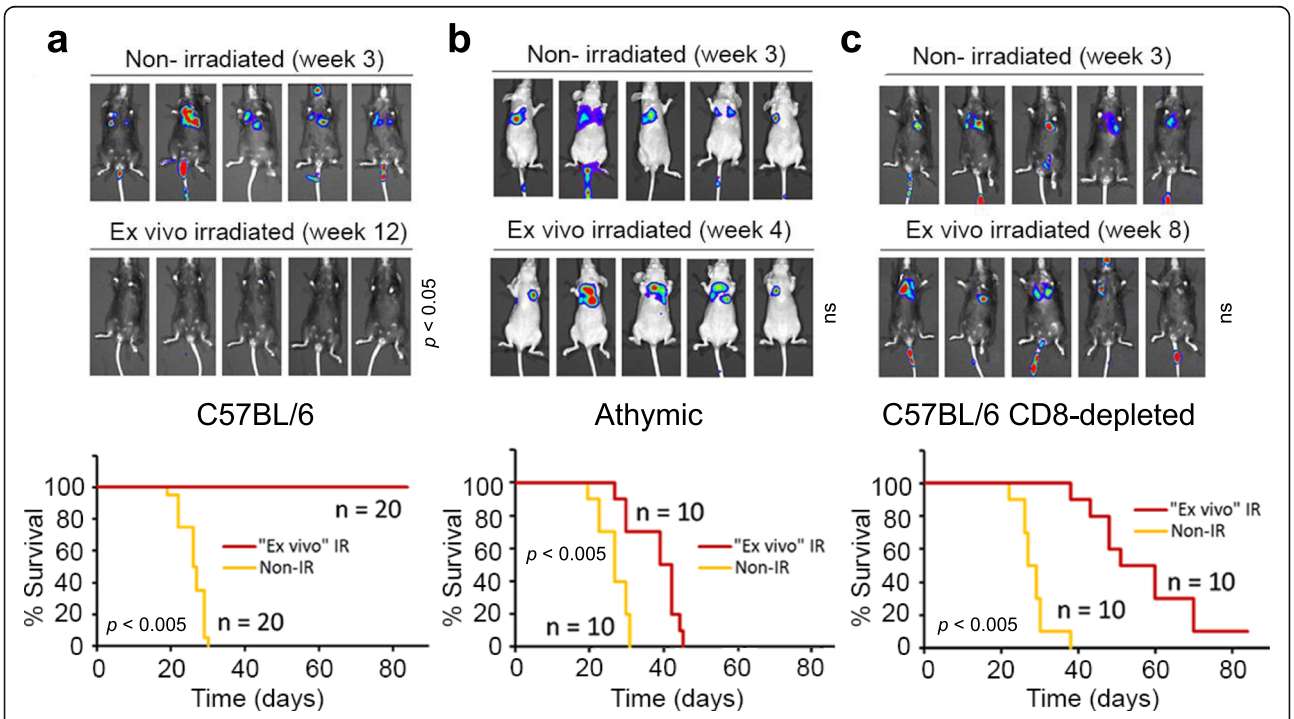



**Fig. 1** The effect of ex vivo irradiation on the immune response against melanoma. **a to c** Luciferase imaging of C57BL/6 **a, c** and athymic **b** mice injected in the tail vein with B16/F10 cells. When indicated, cells were irradiated ex vivo (10 Gy; 24 h) or mice were treated with an anti-CD8 antibody **c**. Total flux (photons/s) analyzes were compared between ex vivo irradiated and non-irradiated groups (ns, no significant). Survival in the melanoma mouse models was examined (Graphs below).*p*-values indicate significant differences in survival when compared both tested groups. Color scale was set to Min = 1.00e6; Max = 1.00e7 for all pictures

elevated anti-melanoma cell immune response to irradiated cells.

### Ionizing irradiation activates MITF

Our results indicate that irradiation of B16/F10 melanoma cells increases their immunogenicity, likely in part via increased MHC class-I mediated antigen presentation, raised calreticulin expression to promote recognition by dendritic cells, and elevated expression of melanoma-associated antigens such as MLANA (Fig. S2d). The melanoma-associated antigen recognized by T-cells (MLANA) encoded by the *MLANA* gene is one of the major melanoma tumor antigens linked to immune recognition [30]. Since expression of MLANA, a differentiation-associated melanosomal protein, is regulated by MITF [31], our results suggested that irradiation might also induce MITF expression, and that MITF could play a role in immune recognition of melanoma cells.

To investigate this possibility, we undertook flow cytometry analysis of the B16/F10 melanoma cells used for the tumor formation assays, using antibodies specific for MITF and MLANA. The results (Fig. 2a, top panels) revealed that irradiation increased expression of both proteins, a result also reflected in the radiation-induced increased expression of MITF and MLANA in human SK-MEL-28 melanoma cells (Fig. 2a, lower panels). Western blotting in both SK-MEL-28 and IGR37 cells confirmed the transient nature of the irradiation-dependent induction of MITF (Fig. 2b), with MLANA expression increasing after that of MITF, consistent with it being an MITF target gene. The effects of radiation were also dose dependent (Fig. 2b, right panel). In addition to the $MITF^{High}$ (IGR37, SK-MEL-28) cell lines we also used the $MITF^{Low}$ mesenchymal phenotype melanoma IGR39 cell line. Remarkably, although this cell line expresses extremely low levels of MITF, irradiation induced robust MITF protein expression within 4 h as detected by western blotting (Fig. 2c) or immunofluorescence (Fig. 2d). The changes in MITF protein levels in IGR37 and IGR39 cells were reflected in a moderate increase in mRNA following irradiation (Fig. 2e). The

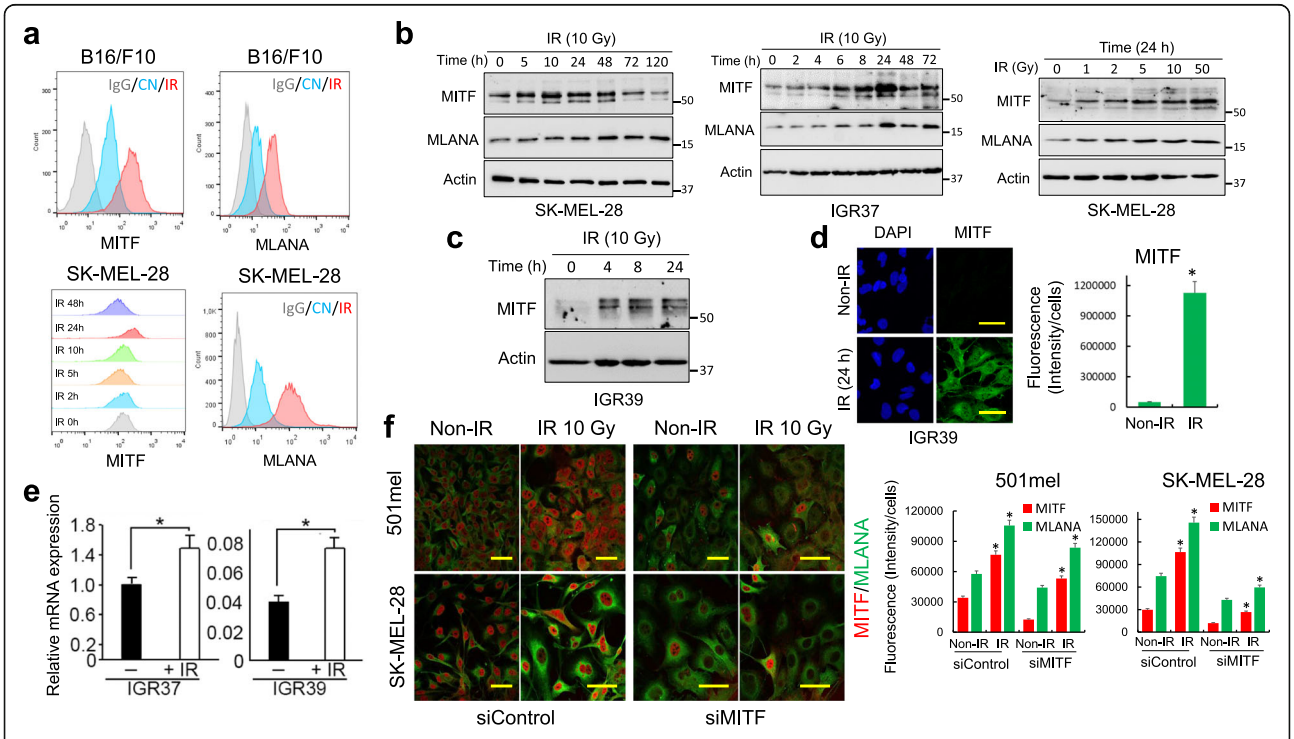



**Fig. 2** Effect of IR on MITF expression. **a** Flow cytometry analysis of MITF and MLANA in different melanoma cell lines and effect of IR (10 Gy, 24 h). Quantitative analysis is showed in Fig. S7. **b** Time and dosage effect of IR on the expression of MITF and MLANA analyzed by Western blot. In all cases, β-actin was used as a load control. **c** Effect of IR on MITF expression in IGR39 melanoma cells analyzed by Western blot. **d** Confocal microscopy analysis of MITF in IGR39 melanoma cells under indicated conditions (IR, 10 Gy). (Bars, 15 μm). *$p < 0.05$ when compared fluorescence in IR vesrsus non-IR groups. **e** qRT-PCR analysis of MITF mRNA in indicated melanoma cells before and after IR (10 Gy; 24 h). Relative mRNA expression in IGR39 cells was normalized with respect to untreated IGR37 cells. *$p < 0.05$. **f** Confocal microscopy analysis of MITF and MLANA before and after IR (24 h) in siControl and siMITF transfected melanoma cells. (Bars, 15 μm). Histograms represent the fluorescent intensity per cell in different assayed conditions. *$p < 0.05$ when compared fluorescence in IR versus non-IR groups. Quantification of blots presented in this figure can be visualized in Fig. S8. The groupings blots in this figure were cropped from different gels. Full blots are shown in the Supplementary Information, Fig. S9

induction of MLANA was confirmed to be dependent on MITF, since depletion of MITF using siRNA prevented the irradiation-dependent increase in MLANA expression in human melanoma cell lines (Fig. 2f). Collectively these observations indicate that MITF can be induced in response to irradiation, with increased MLANA antigen expression correlating with the irradiation-induced immune response that prevented tumor formation in mice.

### MITF-depleted melanoma cells are susceptible to a T cell-independent immune response

To examine the potential role of MITF in the immune response to melanoma, we generated MITF knockout cell lines (B16/F10-MITF-KO and IGR37-MITF-KO) using CRISPR-Cas9. The mutated sequences are shown in Fig. S3a and Fig. S3b, and lack of MITF expression was detected by Western blot in Fig. S3c. Knockout of MITF in either IGR37 or B16/F10 cells led to an altered cell morphology (Fig. S3d), moderately reduced proliferation (Fig. S3e, left panels) but no increased apoptosis, with doxorubicin treatment used as a positive control (Fig. S3e, right panels). As expected, the B16/F10-MITF-KO cell line failed to induce MITF following irradiation (Fig. S3f). Since MITF has been associated with regulation of pro-proliferative and pro-survival genes [22], we verified that the B16/F10-MITF-KO cells (clone 3–1) were able to form tumors in different experimental models. First, we observed that both parental and B16/F10-MITF-KO cells were consistently able to induce lung tumors in tail vein injected Rag2/IL2RG mice (R2G2), a double knockout mouse with an ultra immunodeficient phenotype, independently of their irradiation status (Fig. S4a). In addition, like the parental cell line, B16/F10-MITF-KO cells consistently formed tumors when they were injected subcutaneously (Fig. S4b). To rule out any potential immunogenicity of the product of the puromycin resistance gene used to select for CRISPR MITF-KO cells or luciferase expressed protein, B16/F10-luc2 parental cells were transfected with the same puromycin selection plasmid as the KO cells. After selection, irradiated cells were injected into the tail vein of athymic nude mice. As expected lung metastases developed similar to those injected with irradiated parental cells (Fig. S4c).

However, and despite the ability of B16/F10-MITF-KO cells to form tumors in vivo, when these cells were injected into the tail vein of immunecompetent C57BL/6 mice, we observed a similar response to that seen after the injection of parental cells (Fig. 3a), namely that irradiated cells failed to colonize the lungs. By contrast, a remarkably different response was observed after injection of irradiated B16/F10-MITF-KO cells into athymic nude mice (Fig. 3b) where non-irradiated cells readily formed lung tumors, but no tumor formation was observed after injection of irradiated MITF-KO cells. Since parental cells expressing MITF readily form tumors in the athymic mice (Fig. 1b), these results indicate that the response of animals to irradiated B16/F10-MITF-KO cells was T-cell-independent. To confirm this hypothesis we carried out two independent experimental strategies. First, we depleted CD8+ T cells activity using specific antibodies in animals injected with B16/F10-MITF-KO cells (the knockdown effect of the CD8 antibody can be visualized in Fig. S1). As expected, and in contrast to the MITF-positive parental cells (Fig. 1c), inactivation of CD8+ T cells did not increase tumor load in mice injected with irradiated B16/F10-MITF-KO cells (Fig. 3c). We next employed a vaccination assay where animals were immunized 4 weeks before by tail vein injection of irradiated B16/F10 cells. In this case, immunization demonstrated a substantial protective immune response against the subcutaneously inoculated non-irradiated B16/F10 cells (Fig. 3d; compare Group 1 to Group 2). By contrast, protection was substantially reduced if irradiated B16/F10-MITF-KO cells were used for prior immunization (Fig. 3d; compare Group 3 to Group 2). Immunization with irradiated B16/F10-MITF-KO cells also failed to protect against tumor growth following subcutaneous inoculation of B16/F10-MITF-KO cells (Fig. 3d; compare Groups 4 and 5). The immunization experiments indicate that loss of MITF reduces the ability of B16/F10 cells to induce immunological memory and to be targeted by an immune response elicited by parental B16/F10 cells.

### MITF modulates the response of the immune system toward melanoma cells

To better understand the differential response of mice to melanoma injected cells, we next carried out macroscopic and microscopic analysis of the lungs from mouse injected with non-irradiated or ex vivo irradiated cells. As expected, the lungs of mice injected with non-irradiated cells (B16/F10 or B16/F10-MITF-KO cells) showed consistent melanoma tumors (Fig. 3e and Fig. 3f). Although infiltration of immune cells in these H&E preparations was not evident, a cytometry study to detect NKp46-positive cells in extracts of lungs demonstrated that the NK population was diminished in the lungs of mice injected with B16/F10 parental cells when compared with the NK population in the lungs of the vehicle- or B16/F10-MITF-KO-treated mice (Fig. 3g). It is well known that NK cells become progressively exhausted in the context of melanoma progression [32], and these data would be consistent with expression of MITF in melanoma cells influencing the exhaustion of these innate immune cells. Whether the maintenance of this NK population in lungs of B16/F10-MITF-KO-treated mice is responsible for a slower colonization of

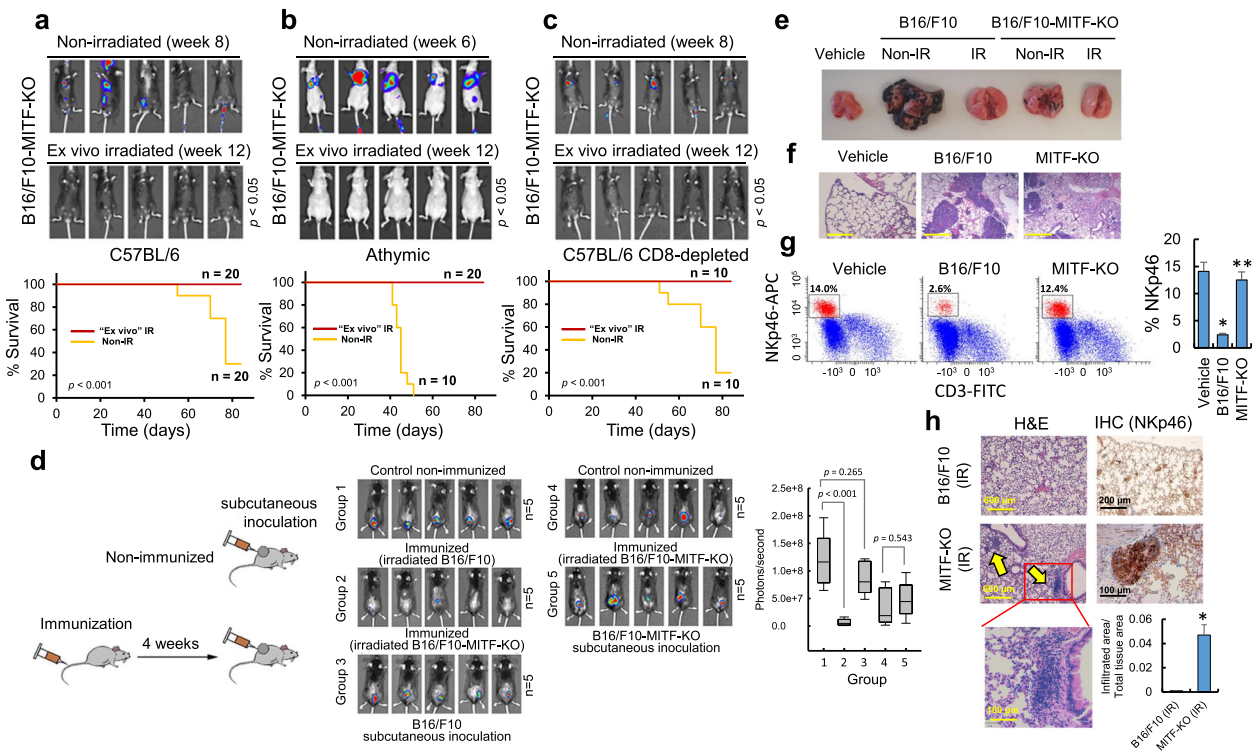



**Fig. 3** Effect of MITF on the anti-melanoma immune response. **a to c** Luciferase imaging of C57BL/6 **a, c** and athymic **b** mice after tail vein injection with B16/F10-MITF-KO cells. The experimental conditions were as those described in Fig. 1. **d** Vaccination assay. Tumors in non-immunized animals subcutaneously injected with irradiated B16/F10 and B16/F10-MITF-KO cells (Groups 1 and 4, respectively). Animals in Group 2 were immunized with ex vivo irradiated B16/F10 cells. After 4 weeks, non-irradiated B16/F10 cells were injected subdermally. Groups 3 and 5 were immunized with ex vivo irradiated B16/F10-MITF-KO cells. After 4 weeks, non-irradiated B16/F10 (Group 3) or non-irradiated B16/F10-MITF-KO (Group 5) cells were injected subdermally. Analysis of primary tumors was carried out 4 weeks after subcutaneous injection. Color scale for Groups 1–3 (Min = 1.00e6; Max = 1.00e7) and for Groups 4–5 (Min = 5.00e4; Max = 5.00e5). **e** Lungs from mice injected in the tail vein with vehicle (PBS) or indicated cells. **f** Microscopic view of the lung tissue structure (H&E stain, × 100) (Bars, 600 µm). **g** Analysis and quantification (histogram) of NKp46-positive cells in mouse lungs performed by flow cytometry of single cell suspensions. *$p < 0.005$ when compared with vehicle-treated group. **$p < 0.005$ when compared with B16/F10-treated group. **h** H&E stain and IHC (with anti-NKp46) of lung tissues. Yellow arrows indicate areas of immune infiltration. The proportion of infiltrated area per total area of lung H&E slide (× 40) was calculated by using ImageJ software (histogram). Quantification was carried out on three different areas of each lung and in 3 animals per group (*$p = 0.0026$). In panels **e to h**, lungs were obtained 3 weeks after vehicle/cells injection and $n = 3$ per group

the lungs when compared to the parental cells (Fig. 3e) or is more related to MITF's pro-proliferative role are aspects that remain to be investigated.

On the other hand, and consistent with the lack of macroscopic evidence of tumor colonization in the lungs of mice injected with ex vivo irradiated B16/F10 cells (Fig. 3e), histologic analysis indicated that these lungs showed evident signs neither of microlesions nor increased inflammatory infiltrates when compared when the lungs of vehicle-treated controls (Fig. 3f and Fig. 3h). However, the lungs of mice injected with ex vivo irradiated B16/F10-MITF-KO cells, although free of melanoma lesions (Fig. 3e), showed evident areas infiltrated with immune cells (Fig. 3h). Immunohistochemical study with NKp46 antibody was performed in both cell-irradiated groups. Positive NKp46 cells were evident in the inflammatory foci found in the B16/F10-MITF-KO irradiated group whereas the sample with irradiated B16/F10 did not show NK positivity in the lung (Fig. 3h). Collectively, the results indicate that the presence of MITF could differentially modulate the response of the immune system toward irradiated melanoma cells. Thus, although the T-cell-mediated immune response responsible for the elimination of the irradiated B16/F10 cells may prevent the colonization of the lung parenchyma, the presence of NK-positive immune infiltrates in the lung parenchyma of mice injected with B16/F10-MITF-KO might be better explained by immunological activation of NK cells.

### MITF promotes NKG2D ligand shedding in melanoma cells

The results indicate that MITF shapes the anti-tumor immune response; MITF-KO cells are targeted

preferentially by the innate immune response, whereas MITF-expressing cells are primarily targeted by T-cells. To investigate the underlying mechanism, we examined the ability of MITF-KO vs MITF parental cells to be engaged by natural killer (NK) cells that represent critical components of the innate immune response and in particular the ability of MITF to regulate melanoma cell surface expression of the MICA and MICB NK-cell ligands. MICA and MICB (Rae1 in mouse) have a key role in the recognition of tumor cells by the innate immune system [33] where their engagement with NKG2D receptors on NK cells triggers NK cell-mediated cytotoxicity. However, advanced cancers frequently escape this immune mechanism by proteolytic shedding of cell surface-bound MICA and MICB molecules through the coordinate action of ERp5 and several cell surface proteases [34]. Consistent with this, high serum concentrations of shed MICA are associated with disease progression in many human cancers, including melanoma [35], where vemurafenib and histone deacetylase inhibitors (such as sodium butyrate) differentially modulate expression of NKG2D ligands such as MICA [36].

Given the critical role of MICA and MICB in the innate immune response to melanoma, we initially used an ELISA assay to examine the amount of MICA in the medium of irradiated cells compared to the non-irradiated control. The results (Fig. 4a), revealed that irradiation induced a substantial increase in shed MICA over time. Significantly, siRNA-mediated depletion of MITF blocked the radiation-induced increase in extracellular MICB (Fig. 4b), consistent with MITF knockdown preventing the shedding of NKG2D ligands in melanoma. To confirm the effect of MITF on NKG2D ligands, we analyzed by flow cytometry cell surface expression of Rae1δ, one of several known murine NKG2D ligands in parental B16/F10 cells or those lacking MITF. The results (Fig. 4c), revealed that when compared with the irradiated parental cell line, knockout of MITF in B16/F10 cells resulted in increased basal levels of Rae1δ as well as in greater accumulation of membrane-bound Rae1δ after IR.

Since MITF induced the proteolytic cleavage of NKG2D ligands, we next examined the activity of NK cells against melanoma cells lacking MITF. To this end, irradiated B16/F10 cells were injected into the tail vein of either C57BL/6 or athymic nude mice. After 1 week, NK cells from these mice were purified from their spleens and co-cultured at two different effector/target ratios (E/T) with irradiated B16/F10, or B16/F10-MITF-KO cells, as well as with the moloney leukemia virus-transformed mouse lymphoma cell line YAC-1 used as a control [24]. Cytotoxicity was determined using a $^{51}$Cr-release assay. The results (Fig 4d) revealed that NK cells obtained from both C57BL/6 and athymic nude mice were significantly more active toward YAC-1 and B16/F10-MITF-KO cells, while the cytotoxicity of NK cells on B16/F10 parental cells was rather low.

### ADAM10 is a direct MITF target gene

Our results indicate that loss of MITF reduces the shedding of the NKG2D ligands and enhances NK cell-mediated killing of melanoma cells. Key to the cleavage of the MICA and MICB NKG2D ligands is the ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) family of metalloproteases, membrane anchored enzymes that are involved in various biological events, such as cell adhesion, cell fusion, cell migration, membrane protein cleavage and proteolysis [37, 38]. Indeed, some ADAMs are expressed in malignant tumors and participate in cancer pathology with ADAM10 and ADAM17 playing a prominent role for this mechanism of tumor immune-evasion by controlling MICA and MICB [39]. Notably, a high percentage of melanoma cells are positive for ADAM10, suggesting that it may regulate the immune response during the onset and progression of melanoma [39].

Interestingly, both the mouse and human ADAM10 promoter, but not that of ADAM17, contain an E-Box consensus sequence (CCACGTGA) that matches the core MITF binding sequence including a 3′ A residue that enhances MITF binding (Fig. 5a). Examination of a duplicate MITF ChIP-seq dataset [40] revealed that ADAM10 is bound both within the promoter as well as in a 3′ intron (Fig. 5a), although only the promoter binding site contained the MITF consensus sequence. Binding to the intronic sequence may indicate indirect binding by MITF, for example by gene looping. Similar binding by MITF to the same site in the *ADAM10* gene was also confirmed in an independent ChIP-seq dataset [41] (Fig. S5a). To validate the ChIP-seq data, we performed chromatin immunoprecipitation experiments on the MITF$^{High}$ IGR37 and 501mel melanoma lines using an anti-MITF antibody, and then performed PCR assays using primers specific to the *ADAM10* promoter region spanning the binding site identified in the ChIP-seq experiments. As shown in Fig. 5b, specific enrichment of the *ADAM10* promoter region was detected using the anti-MITF antibody that was not observed using an IgG control. As a second negative control, no amplification was observed after anti-MITF chromatin immunoprecipitation across an intron of the *SILV* gene where MITF has no binding capacity. Using an *ADAM10* promoter-luciferase reporter we confirmed that transfecting increasing amounts of an MITF expression vector led to increased promoter activity (Fig. 5c). These data indicate that MITF directly binds and regulates *ADAM10* gene expression.

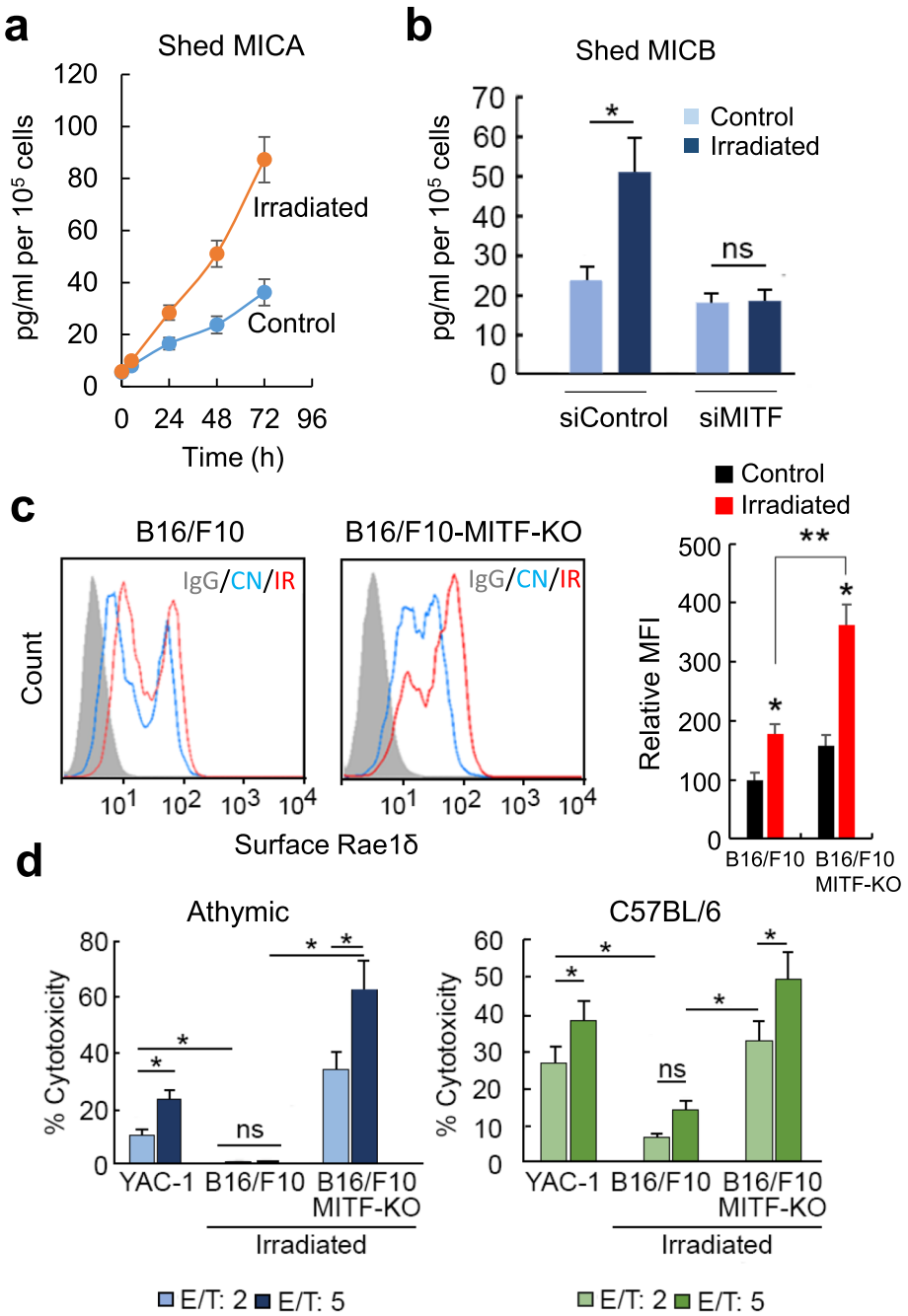



**Fig. 4** MITF promotes NKG2D ligand shedding in melanoma cells. **a** ELISA assay in SK-MEL-28 cells to determine the concentration of MICA in the extracellular medium. The data show the mean ± SD and the variation in the concentration of MICA after irradiation (IR, 10 Gy) was statistically significant with respect to the control at all times tested ($p < 0.05$). **b** ELISA assay in SK-MEL-28 cells to determine the concentration of MICB in the extracellular medium (*$p < 0.05$; ns, no significant) MICB was determined at the same time (24 h) in control and irradiated (IR, 10 Gy) cells. **c** Flow cytometry determination of Rae1δ in B16/F10 and effects of MITF depletion. Cells were non-irradiated or irradiated (IR, 10 Gy, 24 h). Histogram represents MFI (Mean Fluorescence Intensity) in assayed conditions. *$p < 0.05$ when compared with their respective non-irradiated cells. **$p < 0.005$ when comparing both irradiated cells. **d** Athymic (Fox1nu) and C57BL/6 mice were immunized by injection in the tail vein with ex vivo irradiated B16/F10 cells (10 Gy; 24 h). One week after the injection, animal were sacrificed and NK cells were purified from their spleens. Purified NKs were co-cultured with YAC-1 cells, irradiated B16/F10 or irradiated B16/F10-MITF-KO. NK cytotoxicity was evaluated by a $^{51}$Cr-release assay at two effector/target ratios (E/T). The results are representative of three independent experiments (*$p < 0.05$)

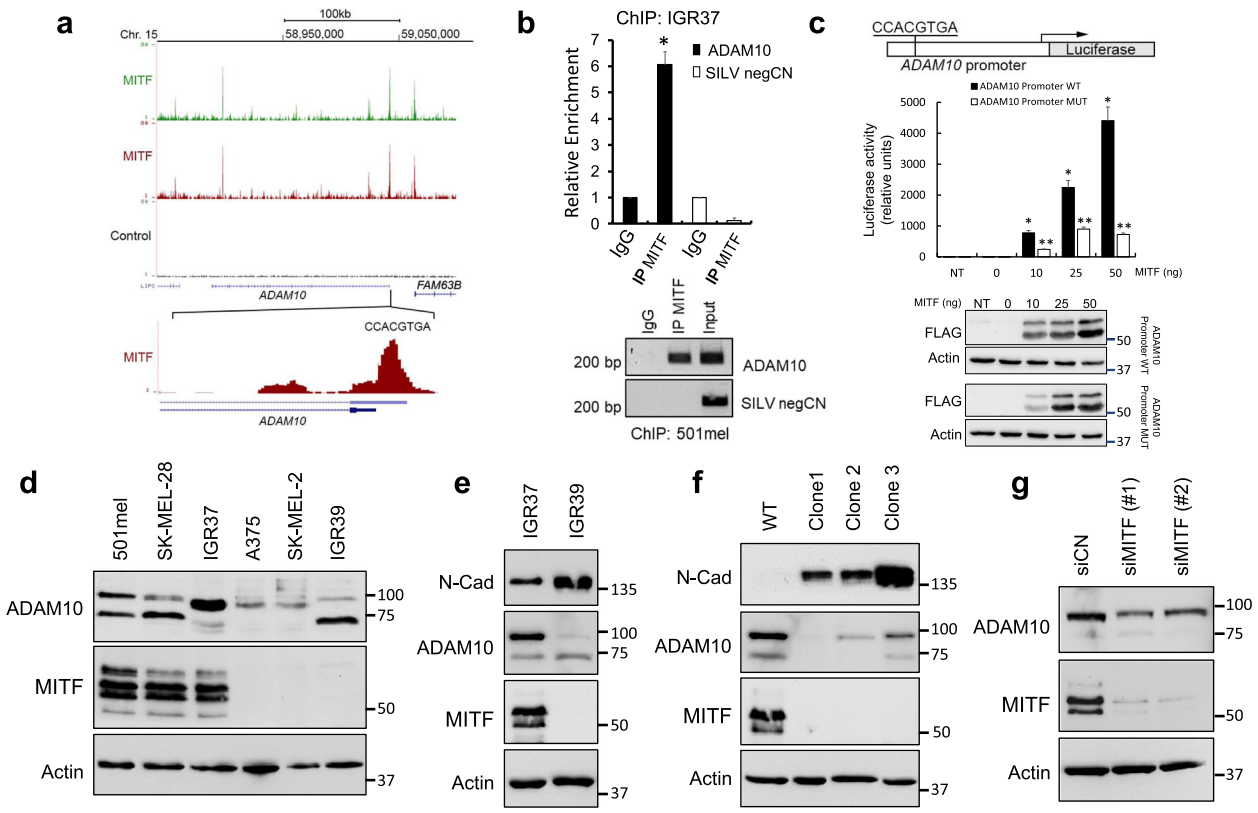



**Fig. 5** MITF binds to the ADAM10 promoter. **a** UCSC genome browser screenshot showing a biological replicate ChIP-seq of MITF bound to the *ADAM10* locus [40]. **b** Histogram represents ChIP assays in IG37 cells (*$p < 0.05$). Agarose gels using the PCR products of the ChIP experiments on 501mel cell lines are presented. **c** HEK293 cells were transfected either with a plasmid containing the promoter sequence of ADAM10 upstream of the luciferase-coding sequence (Promoter WT) or with a plasmid contained an ADAM10-mutated promotor sequence (Promoter MUT) in the absence or the presence of overexpressed MITF. The analysis of MITF expression was carried out by western blot assays by using an anti-FLAG antibody, while actin protein was used as load control. *$p < 0.05$ when compared with MITF negative cells. **$p < 0.05$ when compared with promoter WT. NT, negative transfected cells. **d** Western blots of different melanoma cell lines, both MITF positive (501mel, SK-MEL-28 and IGR37) and MITF negative (A375, SK-MEL-2, and IGR39) to analyze the levels of MITF and ADAM10 proteins. **e** Western blots to analyze N-Cad, MITF, and ADAM10 proteins in IGR37 cells (MITF positive) and IGR39 cells (MITF negative). **f** Western blots to analyze N-Cad, MITF, and ADAM10 proteins in IGR37 cells and several MITF-KO clones. **g** Effect of MITF silencing on the expression of N-Cad, MITF, and ADAM10 in SK-MEL-28 cells. Blots in this figure were cropped from different gels. Full blots are shown in Fig. S9 and quantified in Fig. S8

The observation that MITF controls ADAM10 expression highlights the importance of melanoma phenotype on recognition by the immune system. Analysis of the normalized expression data from the 479 samples in TCGA melanoma cohort (RNA-seq) showed a clear positive correlation between the expression of MITF and ADAM10 with a Spearman coefficient of 0.34 ($p = 1.44e^{-14}$) and a Pearson coefficient of 0.37 ($p = 6.57e^{-17}$) (Fig. S5b). This degree of positive correlation is similar to that between expression of *MITF* and its classical target genes such as *TYR* and *MLANA*. Consistent with this, RT-PCR analysis of a panel of several melanoma cell lines showed a clear relationship between MITF and ADAM10 mRNA expression (Fig. S5c). Cell lines expressing higher levels of MITF (501mel, G631, IGR37, SK-MEL-28) also expressed more ADAM10, whereas SK-MEL-2, A375, and IGR39 cells with very low expression of MITF were found to have the lowest expression of ADAM10, with expression highly correlated (Fig S5c). The relationship between ADAM10 and MITF mRNA levels was recapitulated at the protein level (Fig. 5d). Of note, the IGR37 and IGR39 cell lines are derived from the same patient, with the non-invasive $MITF^{High}$ IGR37 line being isolated from a metastatic lymph node whereas the invasive $MITF^{Low}$ IGR39 line originates from the primary tumor. Consistent with this, the IGR39 cells also express high levels of N-cadherin, a hallmark of an invasive phenotype in melanoma (Fig. 5e). To gain further insight in the regulation of ADAM10 by MITF, we established human IGR37 melanoma cells in which *MITF* was knocked out using CRISPR/Cas9 (Fig. S3b). Compared to the parental cell line, in three different knockout clones low MITF substantially increased N-cadherin expression, but also strongly down-regulated

ADAM10 (Fig. 5f). Similarly, silencing of MITF in SK-MEL-28 cells using two different siRNAs also resulted in a significant reduction of ADAM10 protein (Fig 5g).

### MITF-driven phenotypic plasticity modulates melanoma NK cell-mediated killing

The results so far suggested that MITF would modulate the innate NK cell-mediated immune response via the ability of MITF to induce ADAM10 expression. Since irradiation induces MITF expression, and ADAM10 is an MITF target gene we would expect ADAM10 levels to increase following irradiation. To test this, SK-MEL-28 cells were subjected to a dose of 10 Gy and the levels of MITF and ADAM10 mRNA were analyzed at different time post-IR by qRT-PCR (Fig. 6a) and protein levels by Western blotting (Fig. 6b). The results confirmed that ADAM10 mRNA and protein levels were increased by irradiation. These results could in part explain the increased proteolytic cleavage of NKG2D ligands in irradiated melanoma cells (Figs. 4a-c) and the highly susceptibility of B16/F10-MITF-KO cells to NK-mediated cytotoxicity (Fig. 4d).

Tumor expansion coupled with a poorly organized tumor vasculature often results in areas of limited nutrient supply and hypoxia and variations in the nutritional microenvironment contribute to tumor heterogeneity and therapeutic response [2]. Many microenvironmental stresses can suppress MITF expression including hypoxia, inflammatory signaling, and reduced glucose or glutamine availability [15, 17, 18]. We therefore asked whether decreased MITF expression mediated by $CoCl_2$, to mimic hypoxia, or glutamine limitation could suppress ADAM10 expression. We observed that reduced glutamine in SK-MEL-28 cells reduced both MITF and ADAM10 expression (Fig. 6c, left panel). $CoCl_2$ increased HIF1α expression and decreased MITF and

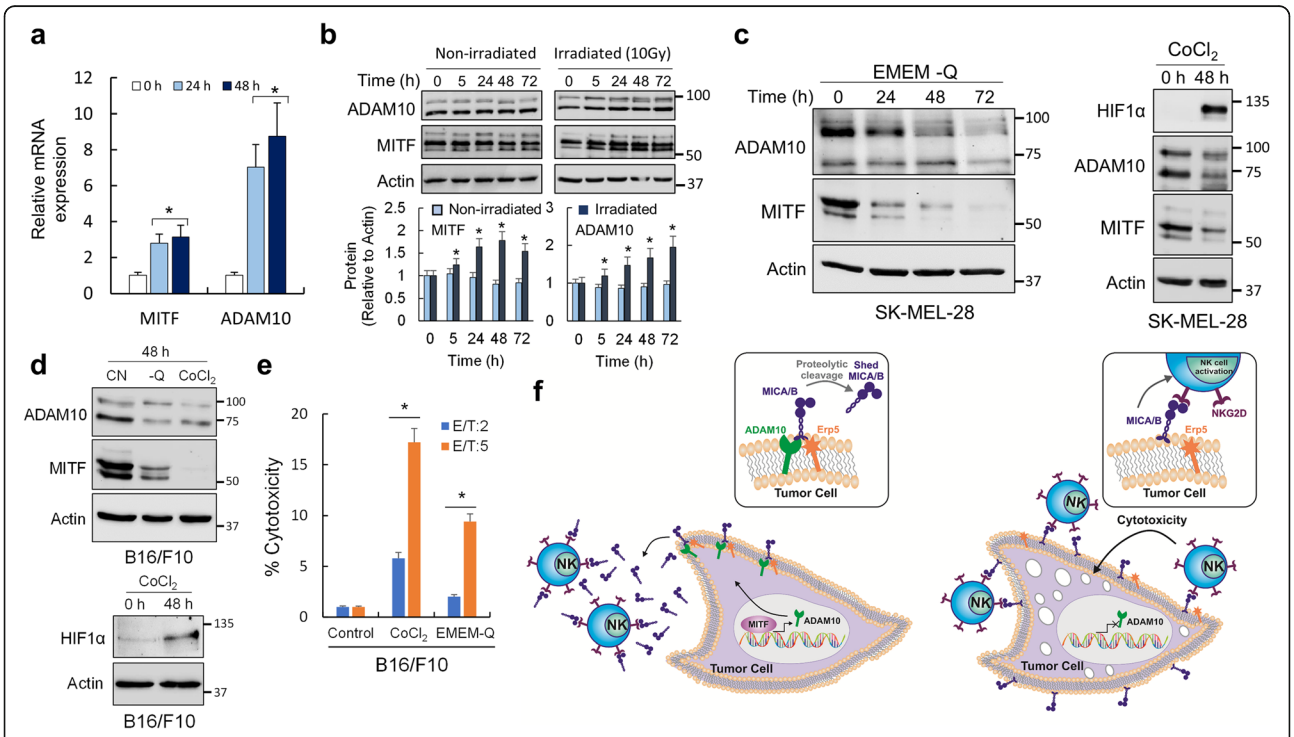



**Fig. 6** MITF-driven phenotypic plasticity modulates ADAM10 expression in melanoma. **a** Quantification of MITF and ADAM10 mRNA in SK-MEL-28 after 24 and 48 h of irradiation (10 Gy). Differences in MITF and ADAM10 mRNA expression at 24 and 48 h were statistically significant (*$p < 0.05$) with respect to the non-irradiated control (0 h). **b** Analysis of MITF and ADAM10 proteins in SK-MEL-28 cells after irradiation at different post-IR times. The histograms represent the relative amount of proteins with respect to actin. The IR-dependent increase in MITF and ADAM10 was only statistically significant in irradiated cells (*$p < 0.05$ at all assayed times with respect to non-irradiated controls). **c, d** Depletion of glutamine or $CoCl_2$ treatments, to mimic hypoxia conditions, resulted in decreased levels of MITF and ADAM10 in human and mouse melanoma cells. **e** Depletion of glutamine and hypoxia sensitizes B16/F10 melanoma cells to NK-driven cytotoxicity. Spleens of untreated C57BL/6 were used for NK purification. Purified NKs were activated with IL-2 during 2 days. Then, IL-2-activated NKs were co-cultured with irradiated melanoma cells previously subjected to depletion of glutamine or $CoCl_2$ (48 h treatments). NK cytotoxicity was evaluated by a $^{51}Cr$-release assay at two effector/target ratios (E/T). The results are representative of three independent experiments (*$p < 0.05$). **f** Schematic illustrating proposed mechanism by which MITF induces escape from innate immunity in melanoma. MITF expression in melanoma (left panels) directly upregulates ADAM10. MICA/B interacts with Erp5 and is shed by ADAM10 from the cell surface, which subsequently leads to a blocking of NKG2D. Lack of MITF expression in melanoma (right panels) downregulates ADAM10 and facilitates NKG2D-mediate immune response. Blots in this figure were cropped from different gels. Full blots are shown in Fig. S9 and quantified in Fig. S8

ADAM10 (Fig. 6c, right panel). Similar results were also observed in B16/F10 cells (Fig. 6d). Consistent with the effects of these microenvironmental triggers on ADAM10 expression, both $CoCl_2$ and glutamine limitation strongly enhanced NK cell-mediated killing of irradiated B16/F10 cells (Fig. 6e).

### Targeting ADAM10 as a rational anti-melanoma immunotherapy

Our results suggest that MITF can be considered as a double-edged sword in the anti-melanoma immune response. Although MITF expression may result in increased recognition of melanoma cells by the adaptive system through the activation and presentation of specific antigens (such as MLANA), MITF expression may also facilitate immune evasion by activating ADAM10 expression to prevent NKG2D receptor activation in NK cells (Fig. 6f). In this context, inhibiting ADAM10 activity, but maintaining MITF transcriptional function could represents a rational strategy to guide melanoma cells to their destruction by the immune system. To explore this hypothesis we used CRISPR-Cas9 technology to generate several ADAM10-knock-out B16/F10 cell lines and confirmed that ADAM10-KO cells maintained MITF expression (Fig. S6). First, we observed that a B16/F10-ADAM10-KO cell line (clone F4; Fig. S6) established consistent tumors in both C57BL/6 and athymic mice when was injected in the tail vein, but not when the cells were irradiated ex vivo before injection (Fig. 7a). Unlike irradiated parental B16/F10 melanoma cells which form lung tumors in nude mice but not in immunocompetent mice owing to T-cell-mediated immune rejection (Fig. 1), the ADAM10-KO cells behave like MITF-KO cells in that they fail to form tumors in nude mice. Consistent with the irradiated B16/F10-ADAM10-KO cell line being rejected by NK-mediated cell killing, the ADAM10-KO cells expressed elevated levels of the NKG2D ligand Rae1δ to even higher levels than cells lacking MITF

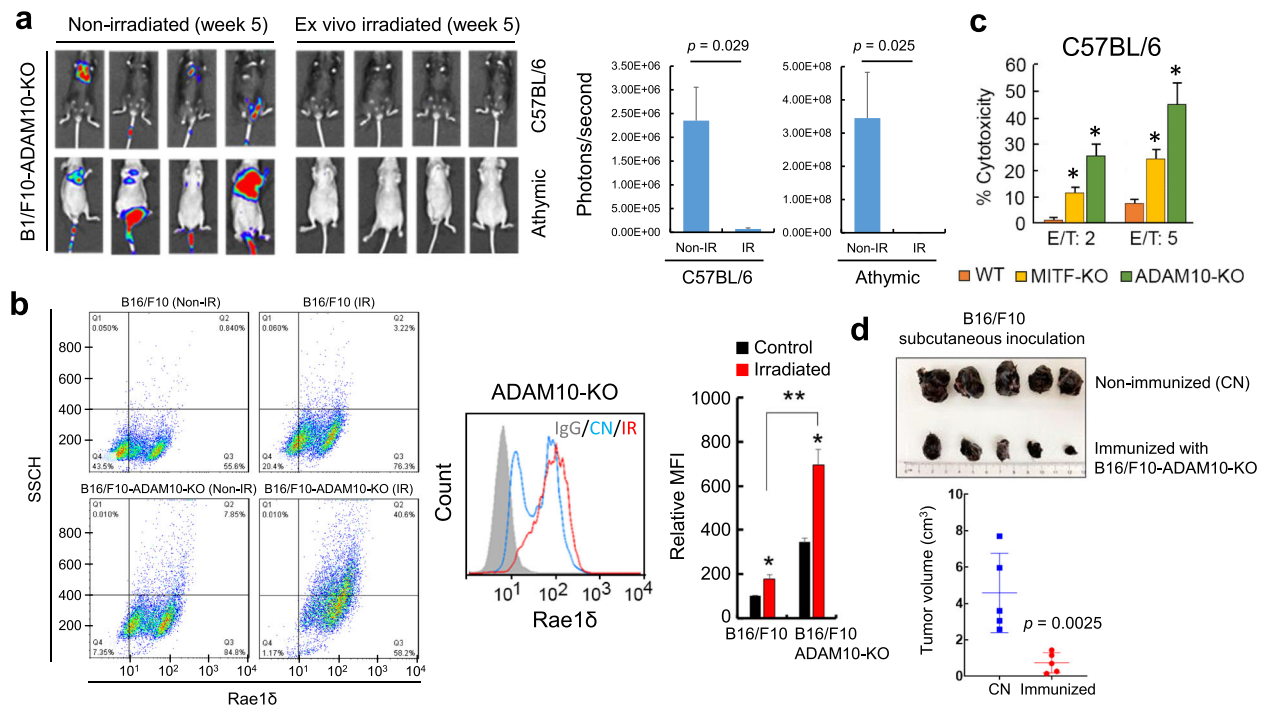



**Fig. 7** Knock out of ADAM10 and its effects on mice immunity. **a** Luciferase imaging of C57BL/6 and athymic mice injected in the tail vein with B16/F10-ADAM10-KO cells. When indicated, cells were irradiated ex vivo (10 Gy; 24 h) before injection. Color scale was set to Min = 1.00e6; Max = 1.00e7 for all pictures. In histograms *p*-values were calculated by Mann-Whitney tests. **b** Flow cytometry determination of Rae1δ in B16/F10 and effects of ADAM10 depletion. Cells were non-irradiated or irradiated (IR, 10 Gy, 24 h). Histogram represents MFI (Mean Fluorescence Intensity) in assayed conditions. *$p < 0.05$ when compared with their respective non-irradiated cells. **$p < 0.005$ when comparing both irradiated cells. **c** Depletion of ADAM10 sensitizes B16/F10 melanoma cells to NK-driven cytotoxicity. Spleens of untreated C57BL/6 were used for NK purification as indicated in Fig. 6e. IL-2-activated NKs were co-cultured with indicated melanoma cells. To promote MITF activity, target cells B16/F10 (WT) and B16/F10-ADAM10-KO (ADAM10-KO) were previously irradiated (10 Gy, 24 h). The results of NK cytotoxicity on irradiated B16/F10-MITF-KO (MITF-KO) are included for comparison. NK cytotoxicity was evaluated by a $^{51}$Cr-release assay. The results are representative of three independent experiments (*$p < 0.05$). **d** Vaccination assay. Mice were non-immunized (CN group) or immunized with ex vivo irradiated (10 Gy; 24 h before injection) B16/F10-ADAM10-KO (immunized group). Then, non-irradiated B16/F10 melanoma cells were subcutaneously injected and the volume of tumors analyzed after 4 weeks. The histogram represents the tumor volume in control and immunized groups ($n = 5$). Grouped data passed the Shapiro-Wilk normality test

(B16/F10-MITF-KO) (Fig. 7b). Moreover, an in vitro cytotoxicity assay revealed that IL-2 activated NK cells purified from C57BL/6 mouse spleens exhibited enhanced killing of B16/F10-ADAM10-KO cells compared to B16/F10-MITF-KO cells, which was in turn higher than that achieved against parental B16/F10 cells (Fig. 7c). This is consistent with the MITF-KO incompletely suppressing ADAM10 expression, whereas the ADAM10-KO would prevent all expression. However, while elevated susceptibility to NK-mediated killing was a characteristic of both MITF-KO and ADAM10-KO melanoma cells, a major difference was observed when we performed a vaccination assay. For this assay, untreated B16/F10 cells were subcutaneously injected into animals immunized 4 weeks before with irradiated B16/F10-ADAM10-KO cells (Fig. 7d). Compared with control mice, the results showed an evident immune response against B16/F10 cells with lower growth of tumours in the group of mice immunized with irradiated B16/F10-ADAM10-KO cells. This experiment is important since B16/F10-ADAM10-KO cells maintain high levels of MITF. Since ADAM10-KO cells exhibit high levels of NKG2D ligands, they will be efficiently targeted by NK-mediated cell killing, while maintenance of MITF expression will facilitate a T-cell-mediated anti-tumor response. Taken together, the results indicate that MITF expression can promote the evasion of NK cell-driven tumor immunity through the proteolytic activity of ADAM10 on NKG2D ligands.

## Discussion

Cutaneous melanoma is widely considered one of the most immunogenic types of cancer based on its high mutation frequency, its frequent spontaneous remission at an early stage, and lymphocytic infiltrations into primary tumors and metastases that correlates with better outcome owing to T-cell recognition of melanoma antigens [42]. As a consequence, immunotherapy based on blocking co-inhibitory receptors such as CTLA-4 and PD-1 expressed on the T-lymphocyte surface has emerged as a powerful strategy in melanoma treatment with the development of several checkpoint blocking antibodies such as Ipilimumab or Pembrolizumab. However, despite the success of T-cell-based immunotherapies, a significant proportion of patients either do not respond or resistance emerges leading to disease progression [3]. Although many factors, including deficient antigen processing and presentation, may increase resistance to immunotherapies, a key contributing factor is melanoma phenotypic plasticity that enables cells to survive by adapting their gene expression programs when confronted with a hostile microenvironment. Significantly, for immunotherapies that rely on recognition of melanoma antigens, a range of microenvironmental stresses, including inflammation, hypoxia and nutrient limitation can lead to down-regulation of MITF, melanoma dedifferentiation, loss of melanoma antigen expression and the emergence of immunotherapy resistance [43]. Given that MITF controls many aspects of melanoma biology [22], including expression of differentiation-associated antigens such as MLANA [31], microenvironmental stresses that lead to low MITF expression are associated with resistance to conventional T-cell based immunotherapies, despite their frequently high levels of T-cell infiltration [11]. In particular, inflammatory signaling arising from activated infiltrating immune cells can lead to MITF down-regulation and consequently immune escape [17, 20]. There is therefore an urgent need for complementary approaches to activate an anti-tumor response, especially for those that take into account melanoma phenotypic heterogeneity.

Our results have identified a key role for MITF in controlling NK-mediated cell death by directly regulating the expression of the ADAM10 protease. Since ADAM10 suppresses the presentation of the NKG2D ligands for NK cells on the melanoma cell surface, loss of either MITF or ADAM10 increased ligand expression and consequently greatly increased NK cell-mediated cell death. These observations raise the possibility of using small molecules to target the ADAM10 protease to enhance NK cell-mediated melanoma killing. This approach would have an advantage in that MITF expression is maintained, enabling continued expression of MITF target genes encoding immunogenic differentiation-associated melanoma antigens such as MLANA. Indeed, harnessing NK cells for anti-cancer immunotherapy has a number of key advantages, not least that one of their fundamental functions is to target cells lacking expression of MHC class I molecules [44] which would be refractory to T-cell-mediated killing. Targeting ADAM10 would therefore represent a complementary approach to current T-cell based immunotherapies.

The identification of ADAM10 as an MITF target gene, suggests that MITF may play a dual role in shaping the anti-melanoma immune response, both promoting expression of antigens like MLANA known to elicit a robust T-cell response, but at the same time suppressing NK-cell-mediated killing. Since suppression of MITF activity is linked to invasiveness and tumor-initiating capacity in melanoma [45], presumably invasive or circulating $MITF^{Low}$ cells would be more susceptible to NK-mediated cell death than proliferating or more differentiated $MITF^{High}$ cells. However, the role of MITF in suppressing NK cell-mediated cell death likely reflects its physiological role in skin melanocytes. Exposure of the skin to UV irradiation drives up-regulation of MITF via keratinocyte-mediated expression of melanocyte-

stimulating hormone and downstream cAMP signaling [46] to promote expression of genes associated with pigmentation and melanosome transfer from melanocytes to keratinocytes where they protect against DNA damage arising from subsequent irradiation [47]. Given the ability of NK cells to target skin melanocytes expressing a tyrosinase hapten [48], it seems plausible that the ability of MITF to promote ADAM10 expression represents a means to suppress NK cell-mediated killing of differentiated melanocytes following solar UV irradiation and thereby maintain the integrity of the protective tanning response.

In addition to its roles in suppressing NK cell-mediated killing and expression of melanoma antigens, MITF has an additional role in regulating the immune response by suppressing the expression of an inflammatory secretome [49] that can lead to effects on immune cell attraction [50]. This can arise in large part via MITF-mediated regulation of the *SCD* gene that promotes long fatty acid desaturation to maintain the correct ratio of membrane saturated and mono-unsaturated fatty acids [51]. Low expression of SCD, for example caused by a reduction in MITF levels, can drive expression of an immune modulatory and pro-inflammatory secretome mediated by the stress activated transcription factors ATF4 and NFκB [51]. The central role of MITF in melanoma biology as well as in shaping the immune response means that approaches combining inhibition of ADAM10 with manipulation of MITF levels, for example to sensitize cells to therapy [23], may provide an avenue towards more effective immune therapy.

## Conclusion

In summary, our results provide a novel insight into how melanoma cells engage in bidirectional interactions with the immune system, highlight the importance of MITF and melanoma phenotype in shaping the anti-melanoma immune response, and suggest that targeting ADAM10 may represent a complementary therapeutic approach to current T-cell-based immunotherapies.

### Abbreviations

APC: Allophycocyanin; ADAM10: A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10; ATF4: Activating transcription factor 4; cAMP: Cyclic adenosine monophosphate; Cas9: CRISPR-associated protein 9; ChIP: Chromatin immunoprecipitation; ChIP-seq: Chromatin immunoprecipitation – sequencing; CRISPR: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats; CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; EMEM: Eagle's minimum essential medium; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; FBS: Fetal bovine serum; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; gRNA: Guide RNA; HDAC3: Histone Deacetylase 3; HDR: Homology directed repair; H&E: hematoxylin and eosin; HIF1α: Hypoxia inducible factor 1α; IHC: Immunohistochemistry; IL-2: Interleukin-2; IR: Irradiation; KO: Knock-out; Luc: Luciferase; MICA: MHC class I polypeptide-related sequence A; MICB: MHC class I polypeptide-related sequence B; MHC: Major histocompatibility complex; MITF: Melanocyte Inducing Transcription Factor; NFκB: Nuclear factor-kappa B; NK: Natural killer; NKG2D: Natural killer group 2, member D receptor; PAM: Protospacer adjacent motif; PBS: Phosphate-buffered saline; PD-1: Programmed death–1; qPCR: Quantitative PCR; R2G2: Radioresistant Rag2-IL2rg; RT-PCR: Real time-PCR; RT-qPCR: Real time quantitative PCR; SCD: Stearoyl-CoA desaturase; SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; siRNAs: Small interfering RNAs; TCGA: The cancer genome atlas; TYR: Tyrosinase; UV: Ultraviolet; WT: Wild type

## Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1186/s13046-021-01916-8.

**Additional file 1: Figure S1.** Depletion of CD8+ T lymphocytes. C57BL/6 mice were treated intraperitoneally with a dose (250 μg) of IgG isotype control b or anti-CD8 (clone 2.43) a, c monoclonal antibodies every 3 days. After four doses, peripheral blood was collected and stained to test the presence of CD8+ cytotoxic T lymphocytes among lymphoid cells ($R^{-1}$) by flow cytometry. Data shows a complete clearance of T CD8+ cells in a representative experiment out of two with similar results. The remaining blood cell counts (granulocyte, monocytes, NK and B lymphocytes) were unchanged (data not shown).

**Additional file 2: Figure S2.** IR modulates the immune responsiveness of melanoma cells. a Effects of IR (10 Gy) on HLA-I proteins assayed by confocal microscopy (the scale bar, 15 μm, refers to both panels). b Effects of IR on HLA-I proteins assayed by flow cytometry (IR, 10 Gy, 48 h). c Effects of IR on HLA-I proteins assayed by qRT-PCR (IR, 10 Gy); $*p < 0.05$ when compared with its respective control (ns, no significant). d Confocal microscopy analysis of calreticulin (CALR) and MLANA before and after IR (IR, 24 h). The scale bar (15 μm), refers to both panels.

**Additional file 3: Figure S3.** *MITF* gene knockout using the CRISPR/Cas9 system in B16/F10-luc2 and IGR37 cells. **a**, **b** The schematic diagrams show the guide RNA (gRNA) targeting site on exon 3 of the *Mitf* mouse gene and exon 2 of *MITF* human gene. Protospacer adjacent motif (PAM) sequences are also presented. The figures also show Sanger sequencing analysis of PCR fragments amplified from gRNA target regions (the inserted nucleotide is in blue) and protein sequence in wild type (WT) and knockout (KO) cells. **c** Protein expression in WT and selected clones was assayed by western blot. Full blots are shown in Fig. S9. Histograms represent protein quantification. **d** Morphological aspect of WT and knockout melanoma cells used in this study. Bars, 100 μm. **e** Functional characterization (proliferation and apoptosis) of knockout cells compared to their respective WT cells. MITF knockout in melanoma cells did not induce significant apoptosis (ns, no significant). Treatment of indicated cells with doxorubicin (1 μM; 24 h) was included as an apoptosis positive control; $*p < 0.05$ when compared with their respective untreated WT cells. **f** Effect of IR on MITF expression in B16/F10 and B16/F10-MITF-KO. Histogram represents protein quantification. Full blots are shown in Fig. S9.

**Additional file 4: Figure S4.** B16/F10-MITF-KO cells were able to form tumors in different experimental models. a Luciferase imaging of R2G2 mice injected in the tail vein with B16/F10 or B16/F10-MITF-KO cells. Picture are representative of $n = 3$ per group. Color scale was set to Min = 1.00e6; Max = 1.00e7 for all pictures. b Luciferase imaging after subcutaneous injection of indicated melanoma cells induced tumors in C57BL/6 mice. Picture are representative of n = 3 per group. **c** Luciferase imaging of athymic mice injected in the tail vein with B16/F10-luc2-puromycin cells. Cells were irradiated ex vivo (10 Gy; 24 h). ($n = 4$).

**Additional file 5: Figure S5.** Relationship between MITF and ADAM10 in different melanoma cell lines. a The ChIP-Seq data in 501mel cells [40] indicate the sequence of binding of MITF (E-Box) to the ADAM10 promoter. b The analysis of the normalized expression data (RNA-Seq) shows a positive correlation for the expression of MITF and ADAM10 in melanoma. **c** Relationship of MITF and ADAM10 mRNAs in different melanoma cell lines. The mRNA profiles have been calculated in relation to the actin of each sample.

**Additional file 6: Figure S6.** *Adam10* gene knockout using the CRISPR/Cas9 system in B16/F10 cells. The schematic diagram shows the guide RNA (gRNA) targeting site on exon 3 for clone F4 and exon 2 for clone B6 of the mouse *Adam10* gene. Protospacer adjacent motif (PAM)

sequences are also presented. The figure also shows Sanger sequencing analysis of PCR fragments amplified from gRNA target regions (the inserted nucleotide is in blue) and protein sequence in wild type (WT) and knockout (KO) cells. Protein expression in WT and two selected clones (F4 and B6) was assayed by western blot. Full blots are shown in Fig. S9. Histogram represents protein quantification.

**Additional file 7: Figure S7.** Quantification of both MITF and MLANA in flow cytometry experiments depicted in Fig. 2a. *$p < 0.05$ when compared with their respective untreated controls.

**Additional file 8: Figure S8.** Densitometry analysis of Western blot data presented in the indicated figures.

**Additional file 9: Figure S9.** The figure shows the full original and uncropped images for the western blots presented in the indicated figures. The identification of corresponding protein bands was based on the expected molecular weight as indicated in the main figure.

#### Acknowledgements
We thank Dr. Detlef Schuppan (Institute of Translational Immunology and Research Center for Immunotherapy, University Medical Center Mainz, Mainz, Germany) for providing the YAC-1 cell line and Ms. M.I. Pellicer-Zaragoza (Department of Pathology, University Hospital Virgen de la Arrixaca) for her help with IHC preparations.

#### Authors'Contributions
Conceived and designed the experiments: JNRL, LSdC, CRG. Performed the experiments: LSdC, RMD, MFM, RGG, JNRL, JCH, APM, EMB, THC. Analyzed the data: JNRL, LSdC, JCH, THC, EMB, CRG. Contributed reagents/materials/analysis tools: JNRL, JCH, APM, EMB, THC. Wrote the paper: CRG, JNRL, LSdC. The authors read and approved the final manuscript.

#### Funding
This work was supported by grants from the Ministerio de Economia y Competitividad (MINECO; Co-financing with Fondos FEDER) (SAF2016–77241-R), and the Fundación Séneca, the Región de Murcia (FS-RM) (20809/PI/18). C.R.G is funded by the Ludwig Institute for Cancer Research. L.S.d.C is contracted by the Ramon y Cajal Programme (RYC-2016-20036). R.G.G. has a fellowship from University of Murcia. R.M.D. has a fellowship from Fundación Séneca. Región de Murcia (Spain) (21407/FPI/20).

#### Availability of data and materials
All data generated or analyzed during this study are included in this published article (and its supplementary information files).

## Declarations

#### Ethics approval and consent to participate
Animals were bred and maintained according to the Spanish legislation on the 'Protection of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes' and in accordance with the directives of the European Community. All animal procedures were approved by the Ethical Committee of the University of Murcia and the Direccion General de Ganaderia y Pesca, Comunidad Autonoma de Murcia (Project reference A13151101).

#### Consent for publication
Not applicable.

#### Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

#### Author details
[1]Department of Biochemistry and Molecular Biology A, School of Biology, IMIB-University of Murcia, 30100 Murcia, Spain. [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology B and Immunology, Faculty of Medicine, IMIB-University of Murcia, Murcia, Spain. [3]Department of Pathology, University Hospital Virgen de la Arrixaca, IMIB, Murcia, Spain. [4]Department of Surgery, University Hospital Virgen de la Arrixaca, IMIB, Murcia, Spain. [5]Translational Cancer Research Group, University Hospital Virgen de la Arrixaca, IMIB, Murcia, Spain. [6]ResearchNuffield Department of Clinical Medicine, Ludwig Institute for Cancer, University of Oxford, Headington, Oxford OX3 7DQ, UK.

Received: 8 October 2020 Accepted: 16 March 2021
Published online: 31 March 2021

#### References
1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646–74. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013.
2. García-Jiménéz C, Goding CR. Starvation and pseudo-starvation as drivers of cancer metastasis through translation reprogramming. Cell Metab. 2019;29:258–67.
3. Ren D, Hua Y, Yu B, Ye X, He Z, Li C, et al. Predictive biomarkers and mechanisms underlying resistance to PD1/PD-L1 blockade cancer immunotherapy. Mol Cancer. 2020;19(1):19. https://doi.org/10.1186/s12943-020-1144-6.
4. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. Nature. 2013;500(7463):415–21. https://doi.org/10.1038/nature12477.
5. Sánchez-del-Campo L, Montenegro MF, Cabezas-Herrera J, Rodríguez-López JN. The critical role of alpha-folate receptor in the resistance of melanoma to methotrexate. Pigment Cell Melanoma Res. 2009;22(5):588–600. https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00586.x.
6. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002;417(6892):949–54. https://doi.org/10.1038/nature00766.
7. Sullivan RJ, Flaherty KT. Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. Eur J Cancer. 2013;49(6):1297–304. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.11.019.
8. Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. Nat Rev Clin Oncol. 2017;14(8):463–82. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.43.
9. Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. Br J Cancer. 2018;118(1):9–16. https://doi.org/10.1038/bjc.2017.434.
10. Wolf Y, Bartok O, Patkar S, Eli GB, Cohen S, Litchfield K, et al. UVB-induced tumor heterogeneity diminishes immune response in melanoma. Cell. 2019;179(1):219–35 e221. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.032.
11. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al. Genomic and transcriptomic features of response to anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma. Cell. 2016;165(1):35–44. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.065.
12. Rambow F, Marine JC, Goding CR. Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. Genes Dev. 2019;33(19-20):1295–318. https://doi.org/10.1101/gad.329771.119.
13. Hoek K, Goding CR. Cancer stem cells versus phenotype switching in melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. 2010;23(6):746–59. https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00757.x.
14. Marusyk A, Janiszewska M, Polyak K. Intratumor heterogeneity: the rosetta stone of therapy resistance. Cancer Cell. 2020;37(4):471–84. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.007.
15. Louphrasitthiphol P, Ledaki I, Chauhan J, Falletta P, Siddaway R, Buffa FM, et al. MITF controls the TCA cycle to modulate the melanoma hypoxia response. Pigment Cell Melanoma Res. 2019;32(6):792–808. https://doi.org/10.1111/pcmr.12802.
16. Mills CN, Joshi SS, Niles RM. Expression and function of hypoxia inducible factor-1 alpha in human melanoma under non-hypoxic conditions. Mol Cancer. 2009;8(1):104. https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-104.
17. Falletta P, Sanchez-del-Campo L, Chauhan J, Effern M, Kenyon A, Kershaw CJ, et al. Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. Genes Dev. 2017;31(1):18–33. https://doi.org/10.1101/gad.290940.116.
18. Ferguson J, Smith M, Zudaire I, Wellbrock C, Arozarena I. Glucose availability controls ATF4-mediated MITF suppression to drive melanoma cell growth. Oncotarget. 2017;8(20):32946–59. https://doi.org/10.18632/oncotarget.16514.
19. Liu F, Jiang CC, Yan XG, Tseng HY, Wang CY, Zhang YY, et al. BRAF/MEK inhibitors promote CD47 expression that is reversible by ERK inhibition in melanoma. Oncotarget. 2017;8(41):69477–92. https://doi.org/10.18632/oncotarget.17704.
20. Riesenberg S, Groetchen A, Siddaway R, Bald T, Reinhardt J, Smorra D, et al. MITF and c-Jun antagonism interconnects melanoma dedifferentiation with

pro-inflammatory cytokine responsiveness and myeloid cell recruitment. Nat Commun. 2015;6(1):8755. https://doi.org/10.1038/ncomms9755.
21. Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA, et al. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. Cell. 1993;74(2):395–404. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90429-T.
22. Goding CR, Arnheiter H. MITF - the first 25 years. Genes Dev. 2019;33(15-16):983–1007. https://doi.org/10.1101/gad.324657.119.
23. Sáez-Ayala M, Montenegro MF, Sánchez-del-Campo L, Fernández-Pérez MP, Chazarra S, Freter R, et al. Directed phenotype switching as an effective antimelanoma strategy. Cancer Cell. 2013;24(1):105–19. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.05.009.
24. Foerster F, Boegel S, Heck, Pickert G, Rüssel N, Rosigkeit S, et al. Enhanced protection of C57 BL/6 vs Balb/c mice to melanoma liver metastasis is mediated by NK cells. Oncoimmunology. 2017;7:e1409929.
25. Sánchez-del-Campo L, Rodríguez-López JN. Targeting the methionine cycle for melanoma therapy with 3-*O*-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)-(−)-epicatechin. Int J Cancer. 2008;123(10):2446–55. https://doi.org/10.1002/ijc.23813.
26. Montenegro MF, González-Guerrero R, Sánchez-del-Campo L, Piñero-Madrona A, Cabezas-Herrera J, Rodríguez-López JN. Targeting the epigenetics of the DNA damage response in breast cancer. Cell Death Dis. 2016;7:e2180.
27. Xu D, Gu P, Pan PY, Li Q, Sato AI, Chen SH. NK and CD8+ T cell-mediated eradication of poorly immunogenic B16-F10 melanoma by the combined action of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation. Int J Cancer. 2004;109(4):499–506. https://doi.org/10.1002/ijc.11696.
28. Konieczkowski DJ, Johannessen CM, Abudayyeh O, Kim JW, Cooper ZA, Piris A, et al. A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. Cancer Discov. 2014;4(7):816–27. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0424.
29. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. Nat Med. 2007;13(1):54–61. https://doi.org/10.1038/nm1523.
30. Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, Robbins PF, Rivoltini L, Yannelli JR, et al. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. J Exp Med. 1994;180(1):347–52. https://doi.org/10.1084/jem.180.1.347.
31. Du J, Miller AJ, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Fisher DE. MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. Am J Pathol. 2003;163(1):333–43. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63657-7.
32. da Silva IP, Gallois A, Jimenez-Baranda S, Khan S, Anderson AC, Kuchroo VK, et al. Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade. Cancer Immunol Res. 2014;2(5):410–22. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0171.
33. Nausch N, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity. Oncogene. 2008;27(45):5944–58. https://doi.org/10.1038/onc.2008.272.
34. Ferrari de Andrade L, Tay RE, Pan D, Luoma AM, Ito Y, Badrinath S, et al. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell–driven tumor immunity. Science. 2018;359:1537–42.
35. Huergo-Zapico L, Acebes-Huerta A, Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Gonzalez-García E, Payer AR, et al. Expansion of NK cells and reduction of NKG2D expression in chronic lymphocytic leukemia. Correlation with progressive disease. PLoS One. 2014;9(10):e108326. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108326.
36. López-Cobo S, Pieper N, Campos-Silva C, García-Cuesta EM, Reyburn HT, Paschen A, et al. Impaired NK cell recognition of vemurafenib-treated melanoma cells is overcome by simultaneous application of histone deacetylase inhibitors. Oncoimmunology. 2017;7:e1392426.
37. Mochizuki S, Okada Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. Cancer Sci. 2007;98(5):621–8. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00434.x.
38. Maurer S, Kropp KN, Klein G, Steinle A, Haen SP, Walz JS, et al. Platelet-mediated shedding of NKG2D ligands impairs NK cell immune-surveillance of tumor cells. Oncoimmunology. 2017;7:e1364827.
39. Donizy P, Zietek M, Leskiewicz M, Halon A, Matkowski R. High percentage of ADAM-10 positive melanoma cells correlates with paucity of tumor-infiltrating lymphocytes but does not predict prognosis in cutaneous melanoma patients. Anal Cell Pathol. 2015;2015:1–7. https://doi.org/10.1155/2015/975436.
40. Louphrasitthiphol P, Siddaway R, Loffreda A, Pogenberg V, Friedrichsen H, Schepsky A, et al. Tuning transcription factor availability through acetylation-mediated genomic redistribution. Mol Cell. 2020;79(3):472–87. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.025.
41. Laurette P, Strub T, Koludrovic D, Keime C, Le Gras S, Seberg H, et al. Transcription factor MITF and remodeller BRG1 define chromatin organisation at regulatory elements in melanoma cells. eLife. 2015;4:e06857. https://doi.org/10.7554/eLife.06857.
42. Franklin C, Livingstone E, Roesch A, Schilling B, Schadendorf D. Immunotherapy in melanoma: recent advances and future directions. Eur J Surg Oncol. 2017;43(3):604–11. https://doi.org/10.1016/j.ejso.2016.07.145.
43. Passarelli A, Mannavola F, Stucci LS, Tucci M, Silvestris F. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. Oncotarget. 2017;8(62):106132–42. https://doi.org/10.18632/oncotarget.22190.
44. Gasser S, Raulet DH. Activation and self-tolerance of natural killer cells. Immunol Rev. 2006;214(1):130–42. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00460.x.
45. Carreira S, Goodall J, Denat L, Rodriguez M, Nuciforo P, Hoek KS, et al. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. Genes Dev. 2006;20(24):3426–39. https://doi.org/10.1101/gad.406406.
46. Bertolotto C, Abbe P, Hemesath TJ, Bille K, Fisher DE, Ortonne JP, et al. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. J Cell Biol. 1998;142(3):827–35. https://doi.org/10.1083/jcb.142.3.827.
47. Nguyen NT, Fisher DE. MITF and UV responses in skin: from pigmentation to addiction. Pigment Cell Melanoma Res. 2019;32(2):224–36. https://doi.org/10.1111/pcmr.12726.
48. van den Boorn JG, Jakobs C, Hagen C, Renn M, Luiten RM, Melief CJ, et al. Inflammasome-dependent induction of adaptive NK cell memory. Immunity. 2016;44(6):1406–21. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.008.
49. Ohanna M, Giuliano S, Bonet C, Imbert V, Hofman V, Zangari J, et al. Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor-{kappa}B-associated secretome (PNAS). Genes Dev. 2011;25(12):1245–61. https://doi.org/10.1101/gad.625811.
50. Wiedemann GM, Aithal C, Kraechan A, Heise C, Cadilha BL, Zhang J, et al. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) regulates immune cell migration into melanoma. Transl Oncol. 2019;12(2):350–60. https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.10.014.
51. Vivas-García Y, Falletta P, Liebing J, Louphrasitthiphol P, Feng Y, Chauhan J, et al. Lineage-restricted regulation of SCD and fatty acid saturation by MITF controls melanoma phenotypic plasticity. Mol Cell. 2020;77:120–39.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

**At BMC, research is always in progress.**

**Learn more** biomedcentral.com/submissions



# Supplemental Information

# MITF induces escape from innate immunity in melanoma

**Luis Sánchez-del-Campo, Román Martí-Díaz, María F. Montenegro, Rebeca González-Guerrero, Trinidad Hernández-Caselles, Enrique Martínez-Barba, Antonio Piñero-Madrona, Juan Cabezas-Herrera, Colin R. Goding and José Neptuno Rodríguez-López**

**Figure S1.** Depletion of CD8+ T lymphocytes. C57BL/6 mice were treated intraperitoneally with a dose (250 µg) of IgG isotype control **b** or anti-CD8 (clone 2.43) **a, c** monoclonal antibodies every 3 days. After four doses, peripheral blood was collected and stained to test the presence of CD8+ cytotoxic T lymphocytes among lymphoid cells (R-1) by flow cytometry. Data shows a complete clearance of T CD8+ cells in a representative experiment out of two with similar results. The remaining blood cell counts (granulocyte, monocytes, NK and B lymphocytes) were unchanged (data not shown).

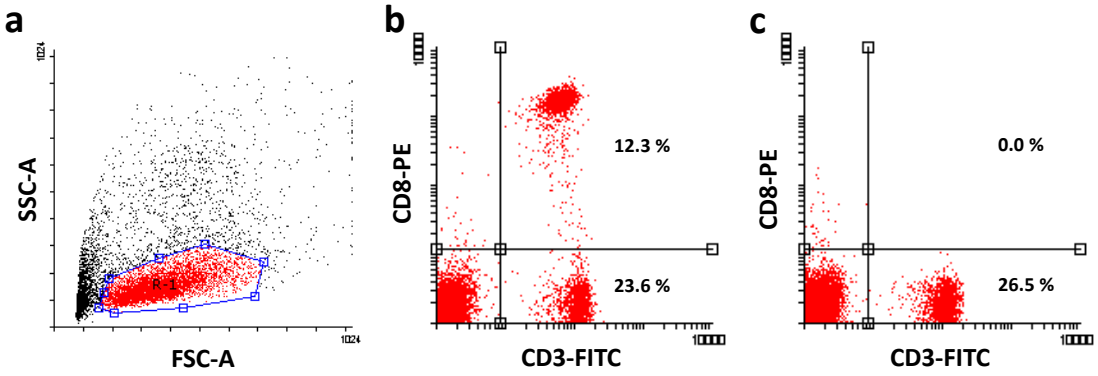



**Figure S2.** IR modulates the immune responsiveness of melanoma cells. **a** Effects of IR (10 Gy) on HLA-I proteins assayed by confocal microscopy (the scale bar, 15 µm, refers to both panels). **b** Effects of IR on HLA-I proteins assayed by flow cytometry (IR, 10 Gy, 48 h). **c** Effects of IR on HLA-I proteins assayed by qRT-PCR (IR, 10 Gy); **p* < 0.05 when compared with its respective control (ns, no significant). **d** Confocal microscopy analysis of calreticulin (CALR) and MLANA before and after IR (IR, 24 h). The scale bar (15 µm), refers to both panels.

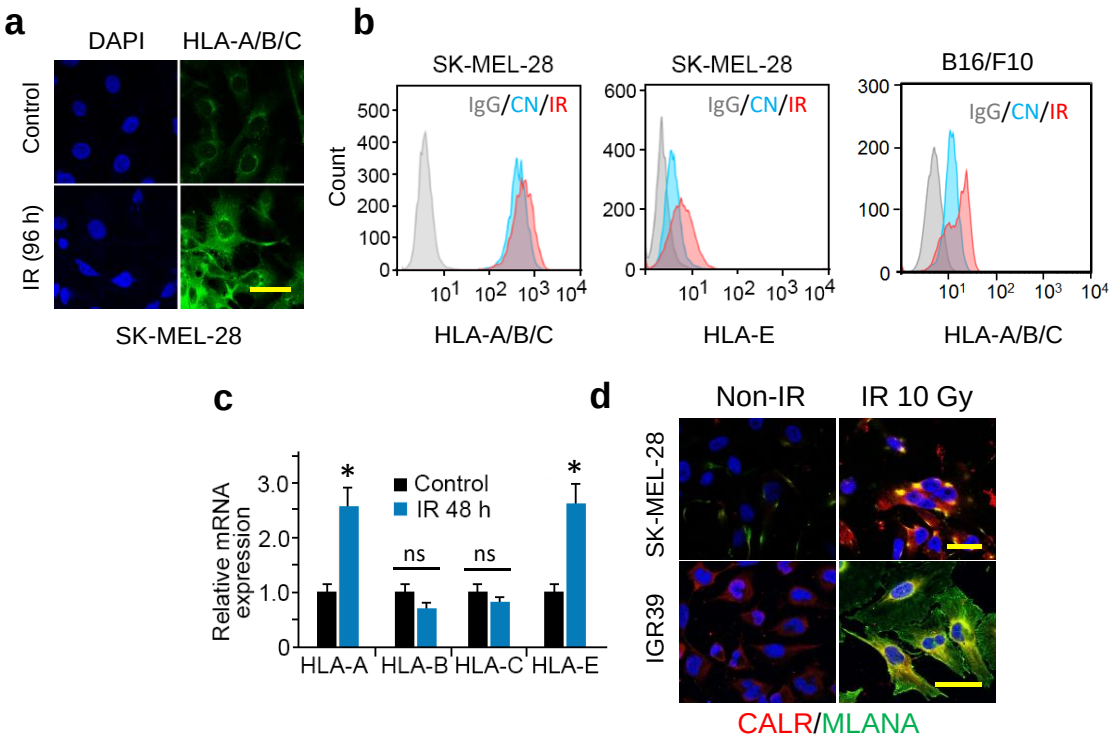
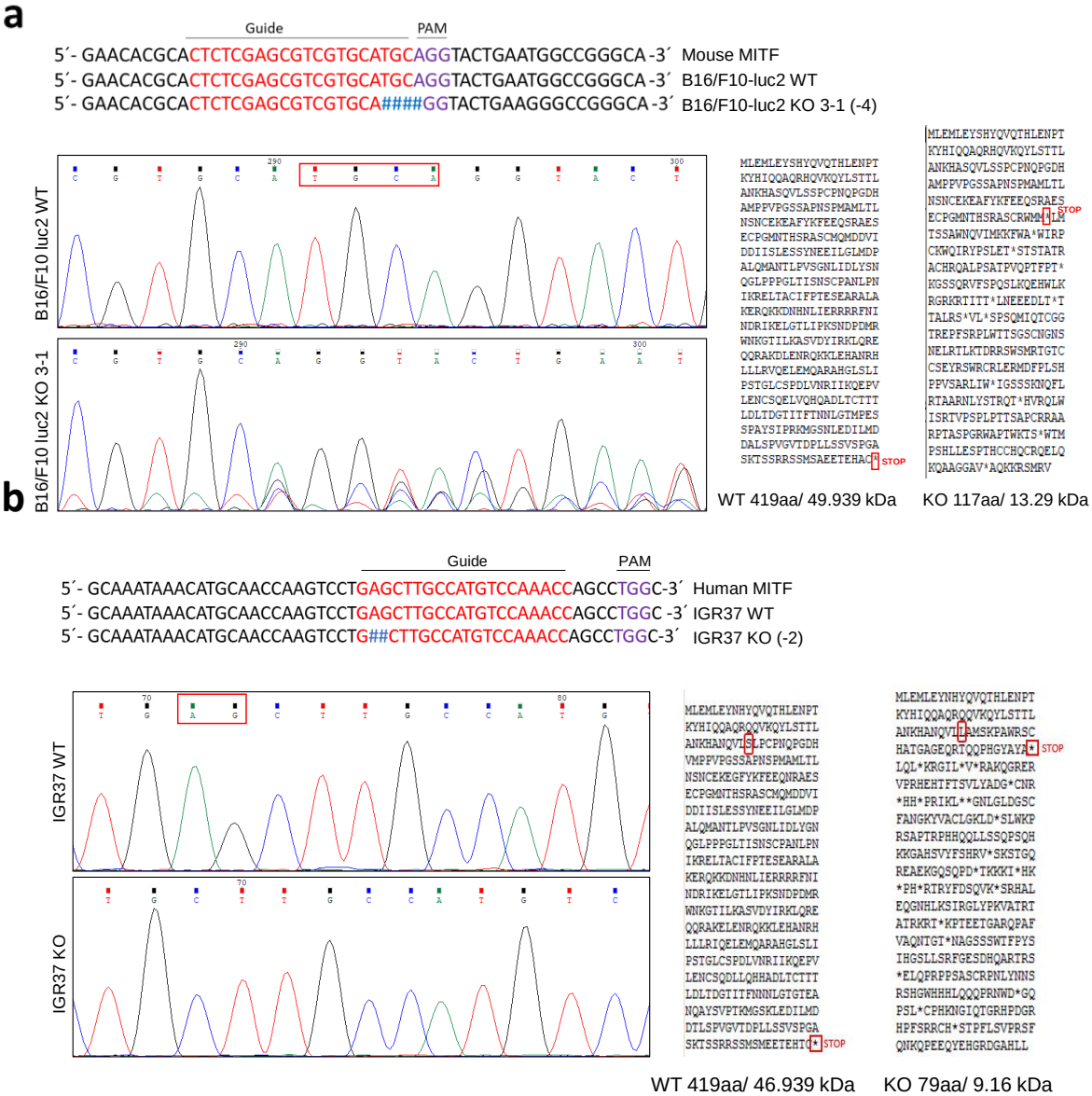
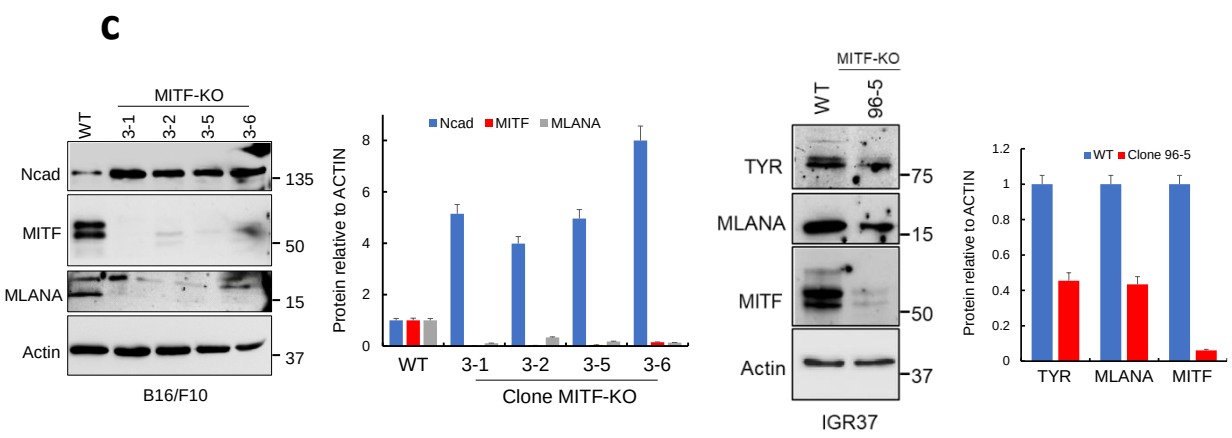
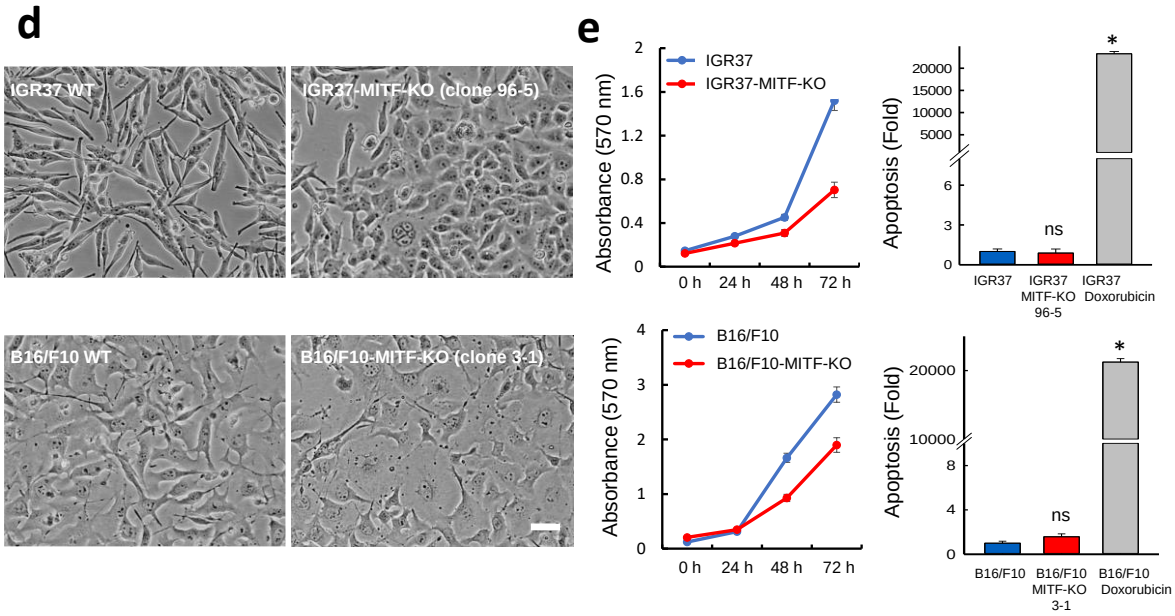


**Figure S3.** *MITF* gene knockout using the CRISPR/Cas9 system in B16/F10-luc2 and IGR37 cells. **a, b** The schematic diagrams show the guide RNA (gRNA) targeting site on exon 3 of the *Mitf* mouse gene and exon 2 of *MITF* human gene. Protospacer adjacent motif (PAM) sequences are also presented. The figures also show Sanger sequencing analysis of PCR fragments amplified from gRNA target regions (the inserted nucleotide is in blue) and protein sequence in wild type (WT) and knockout (KO) cells. **c** Protein expression in WT and selected clones was assayed by western blot. Full blots are shown in Fig. S9. Histograms represent protein quantification. **d** Morphological aspect of WT and knockout melanoma cells used in this study. Bars, 100 µm. **e** Functional characterization (proliferation and apoptosis) of knockout cells compared to their respective WT cells. MITF knockout in melanoma cells did not induce significant apoptosis (ns, no significant). Treatment of indicated cells with doxorubicin (1 µM; 24 h) was included as an apoptosis positive control; *$p < 0.05$ when compared with their respective untreated WT cells. **f** Effect of IR on MITF expression in B16/F10 and B16/F10-MITF-KO. Histogram represents protein quantification. Full blots are shown in Fig. S9.




c
MITF-KO
WT
3-1
3-2
3-5
3-6
Ncad
MITF
MLANA
Actin
135
50
15
37
B16/F10
Ncad MITF MLANA
Protein relative to ACTIN
WT
3-1
3-2
3-5
3-6
Clone MITF-KO
MITF-KO
WT
96-5
TYR
MLANA
MITF
Actin
75
15
50
37
IGR37
WT Clone 96-5
Protein relative to ACTIN
TYR
MLANA
MITF


d
IGR37 WT
IGR37-MITF-KO (clone 96-5)
B16/F10 WT
B16/F10-MITF-KO (clone 3-1)
e
IGR37
IGR37-MITF-KO
Absorbance (570 nm)
0 h
24 h
48 h
72 h
Apoptosis (Fold)
ns
IGR37
IGR37 MITF-KO 96-5
IGR37 Doxorubicin
B16/F10
B16/F10-MITF-KO
B16/F10
B16/F10 MITF-KO 3-1
B16/F10 Doxorubicin

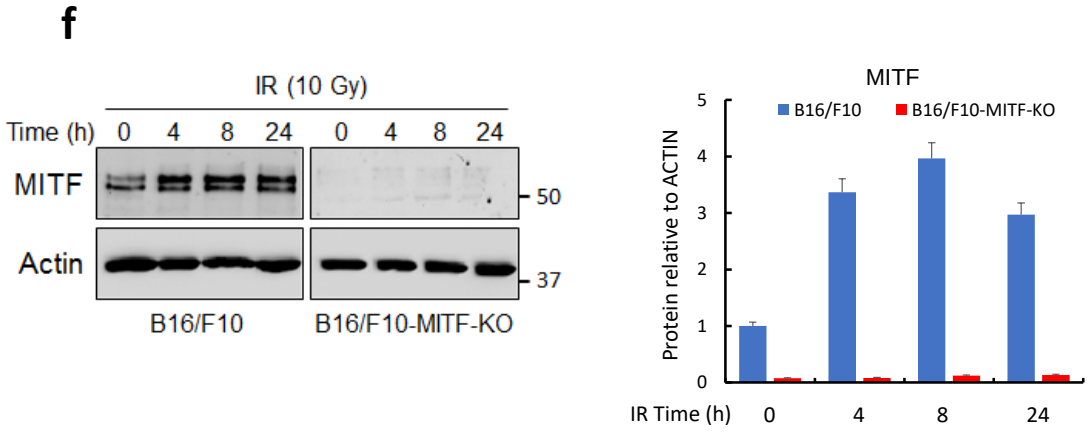

f
IR (10 Gy)
Time (h) 0 4 8 24 0 4 8 24
MITF
Actin
50
37
B16/F10
B16/F10-MITF-KO
MITF
B16/F10
B16/F10-MITF-KO
Protein relative to ACTIN
IR Time (h) 0 4 8 24

**Figure S4.** B16/F10-MITF-KO cells were able to form tumors in different experimental models. **a** Luciferase imaging of R2G2 mice injected in the tail vein with B16/F10 or B16/F10-MITF-KO cells. Picture are representative of n = 3 per group. Color scale was set to Min = 1.00e6; Max = 1.00e7 for all pictures. **b** Luciferase imaging after subcutaneous injection of indicated melanoma cells induced tumors in C57BL/6 mice. Picture are representative of n = 3 per group. **c** Luciferase imaging of athymic mice injected in the tail vein with B16/F10-luc2-puromycin cells. Cells were irradiated *ex vivo* (10 Gy; 24 h). (n = 4).

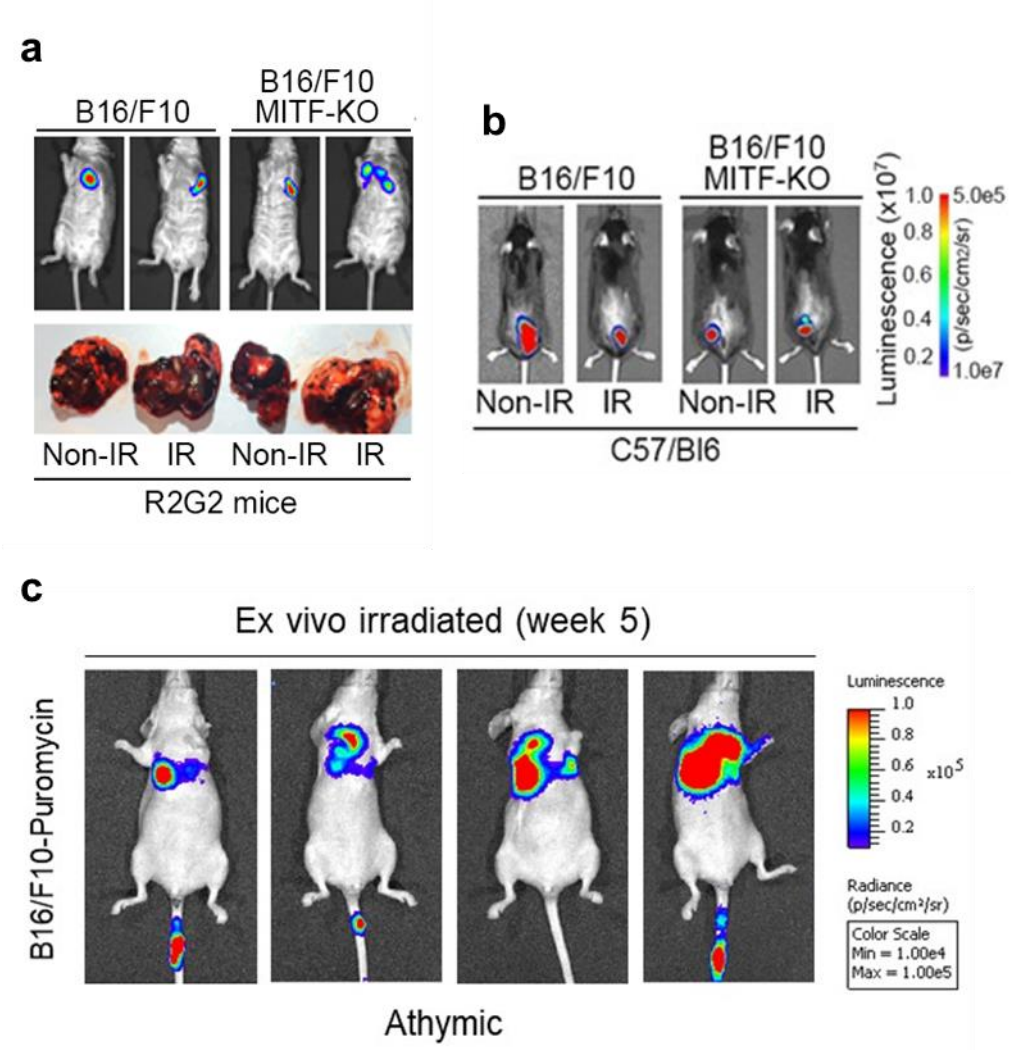


**Figure S5.** Relationship between MITF and ADAM10 in different melanoma cell lines. **a** The ChIP-Seq data in 501mel cells [40] indicate the sequence of binding of MITF (E-Box) to the ADAM10 promoter. **b** The analysis of the normalized expression data (RNA-Seq) shows a positive correlation for the expression of MITF and ADAM10 in melanoma. **c** Relationship of MITF and ADAM10 mRNAs in different melanoma cell lines. The mRNA profiles have been calculated in relation to the actin of each sample.

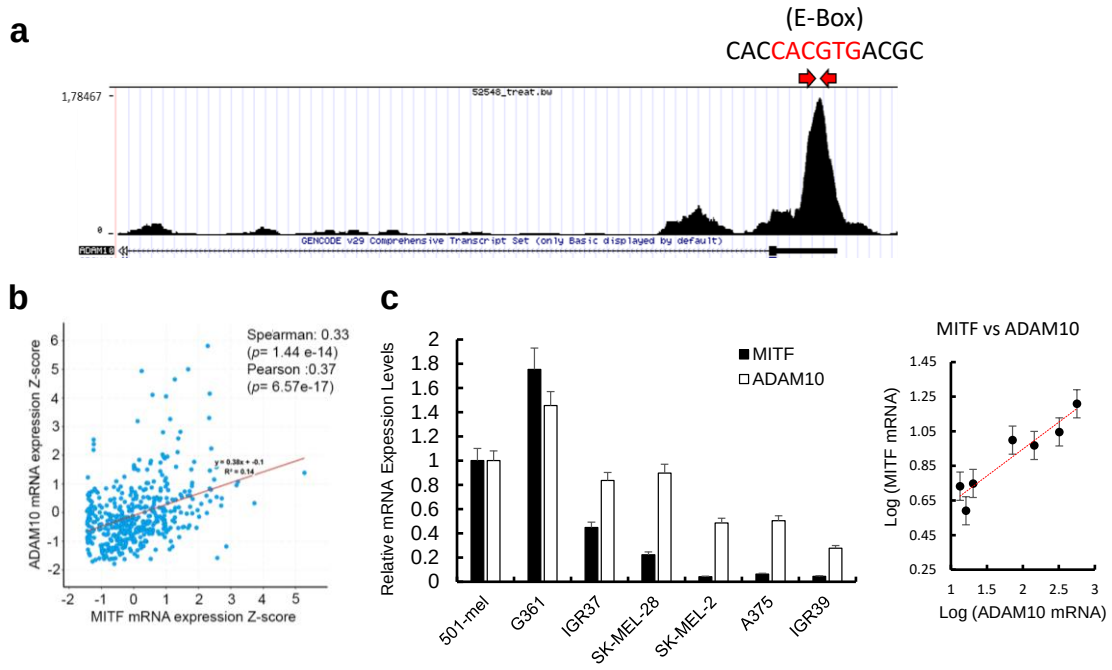
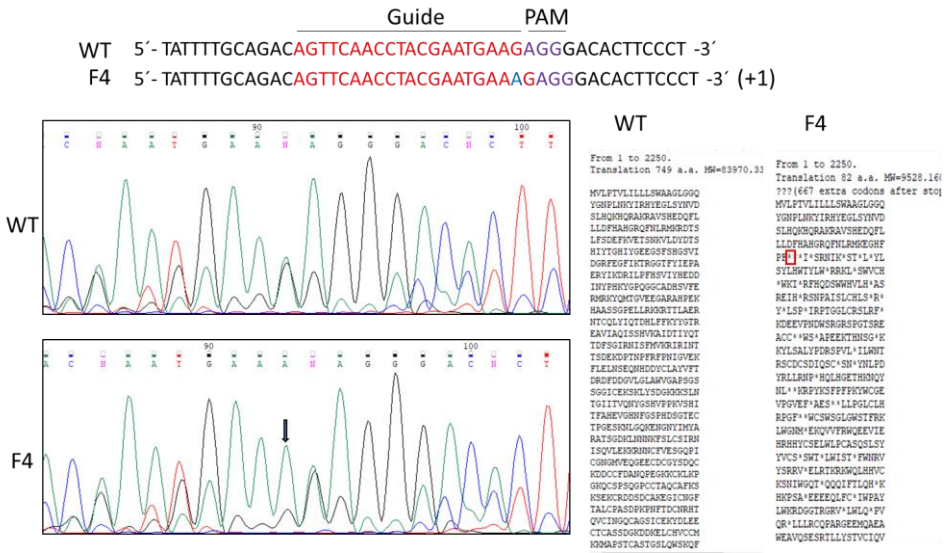



**Figure S6.** *Adam10* gene knockout using the CRISPR/Cas9 system in B16/F10 cells. The schematic diagram shows the guide RNA (gRNA) targeting site on exon 3 for clone F4 and exon 2 for clone B6 of the mouse *Adam10* gene. Protospacer adjacent motif (PAM) sequences are also presented. The figure also shows Sanger sequencing analysis of PCR fragments amplified from gRNA target regions (the inserted nucleotide is in blue) and protein sequence in wild type (WT) and knockout (KO) cells. Protein expression in WT and two selected clones (F4 and B6) was assayed by western blot. Full blots are shown in Fig. S9. Histogram represents protein quantification.



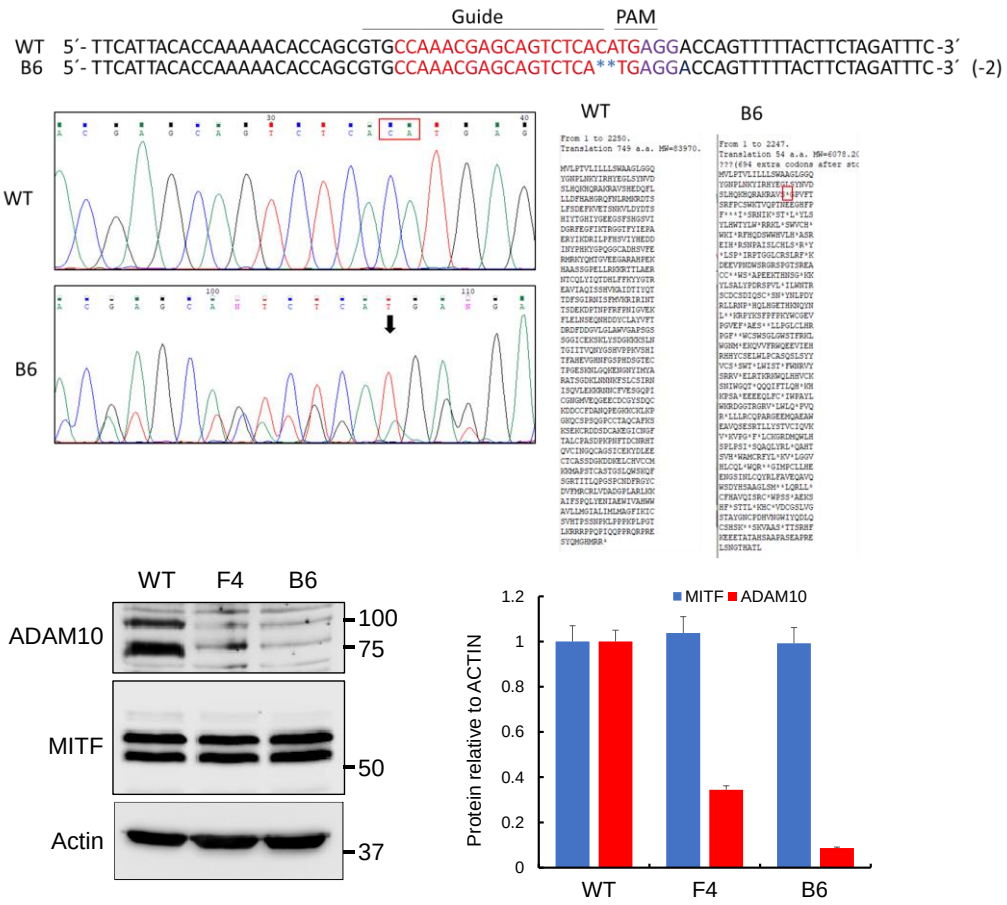



**Figure S7.** Quantification of both MITF and MLANA in flow cytometry experiments depicted in Fig. 2a. *$p < 0.05$ when compared with their respective untreated controls.

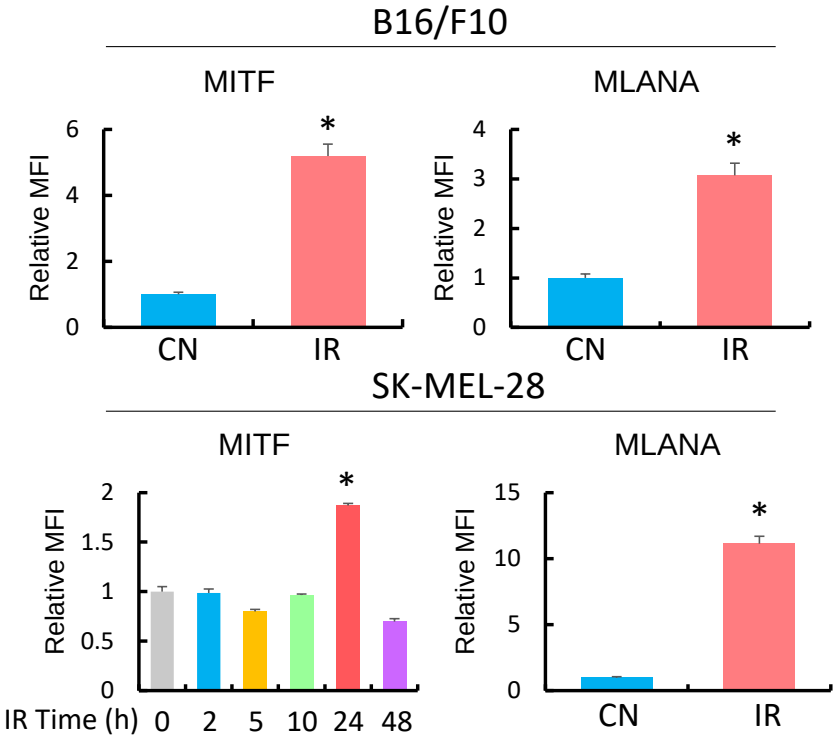


**Figure S8.** Densitometry analysis of Western blot data presented in the indicated figures.

Fig. 2b

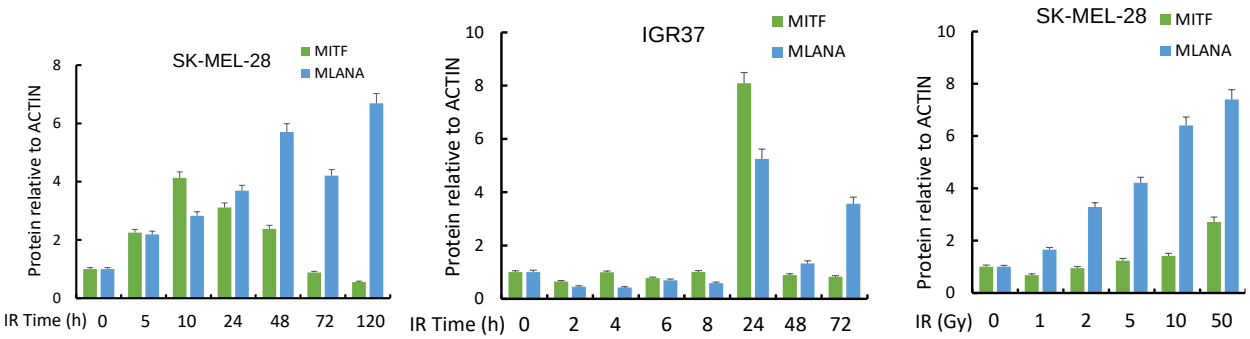



Fig. 2c

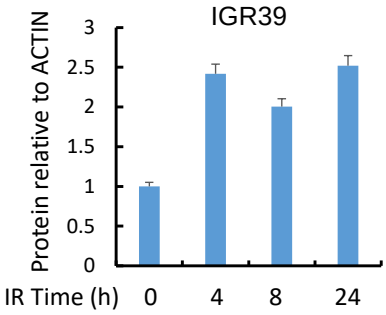
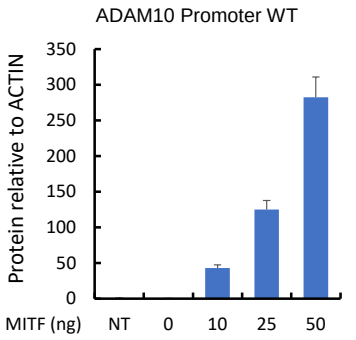



Fig. 5c



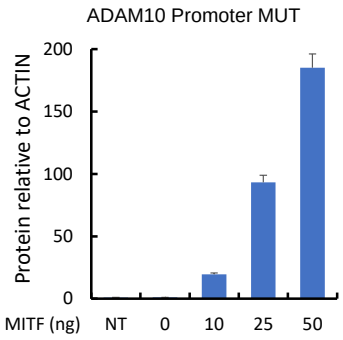




Fig. 5d

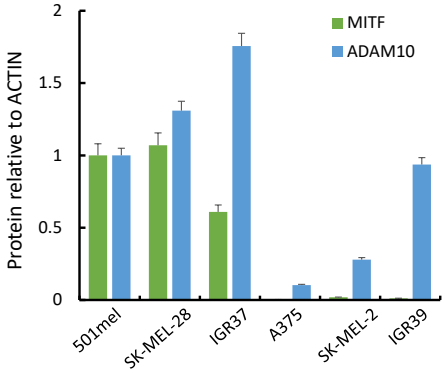



Fig. 5e

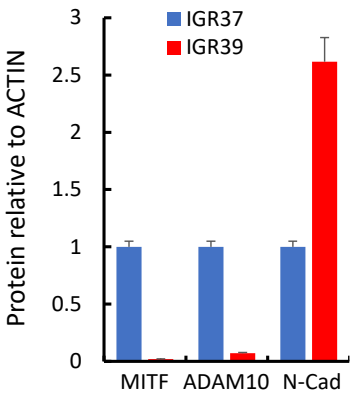



Fig. 5f

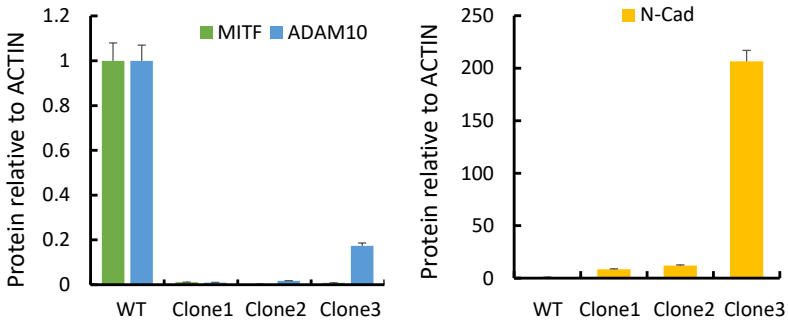


Fig. 5g

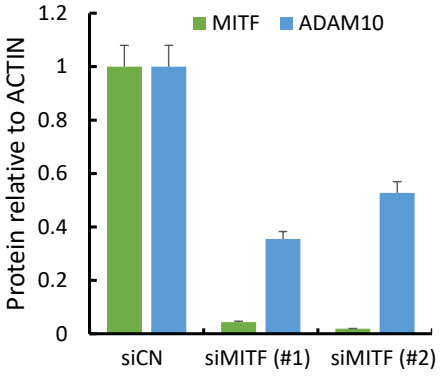



Fig. 6c

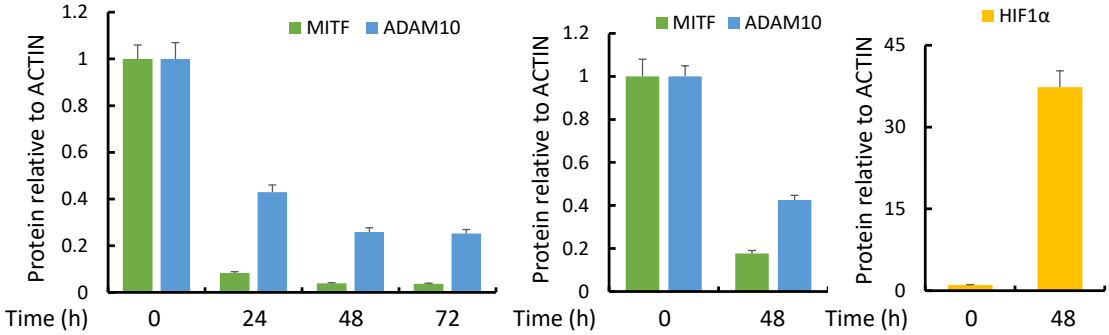



Fig. 6d

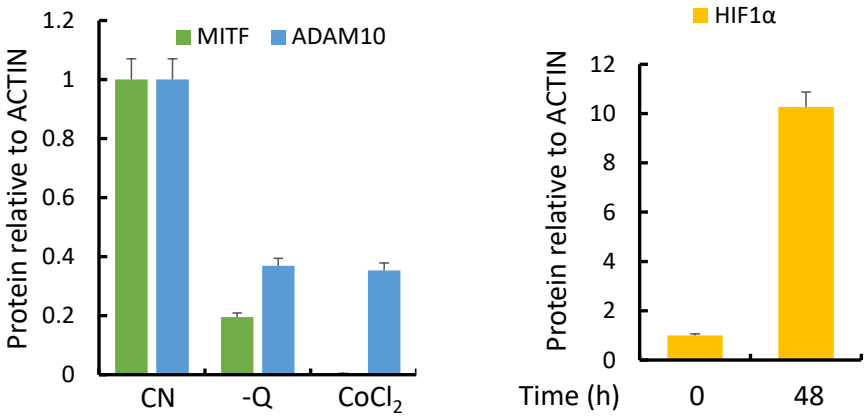


**Figure S9.** The figure shows the full original and uncropped images for the western blots presented in the indicated figures. The identification of corresponding protein bands was based on the expected molecular weight as indicated in the main figure.

Fig. 2b

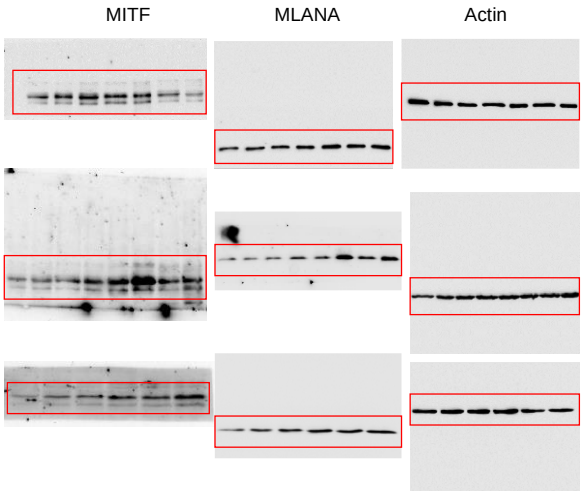



Fig. 2c

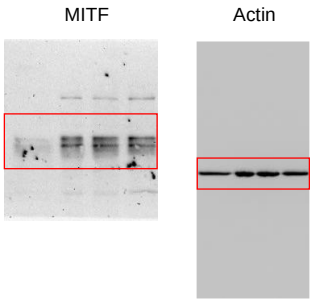



Fig. 5c

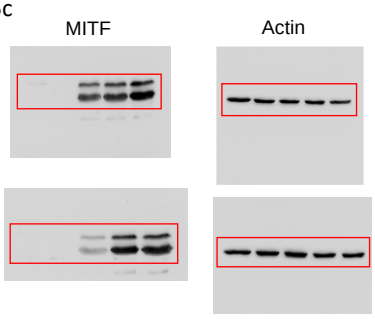



Fig. 5d

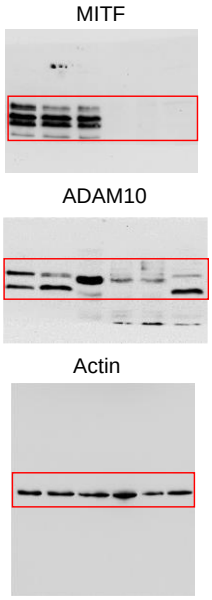



Fig. 5e

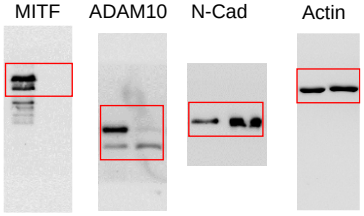



Fig. 5g

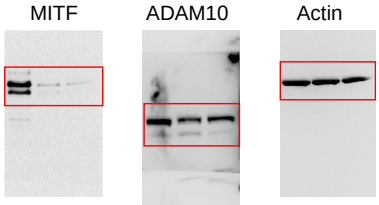



Fig. 5f

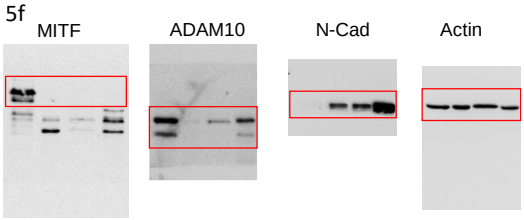


Fig. 6b

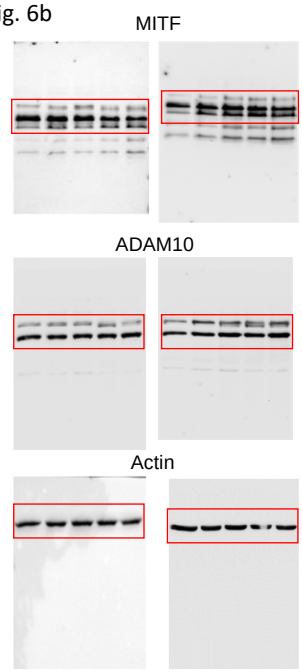



Fig. 6c

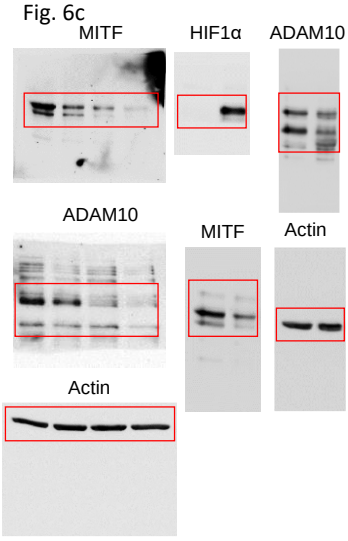



Fig. 6d

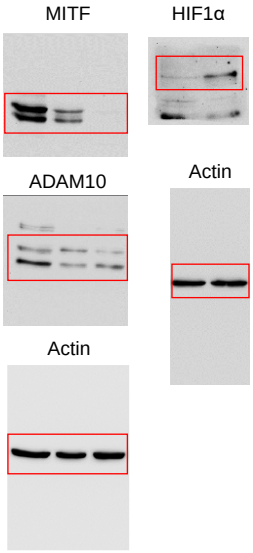



Fig. S3c

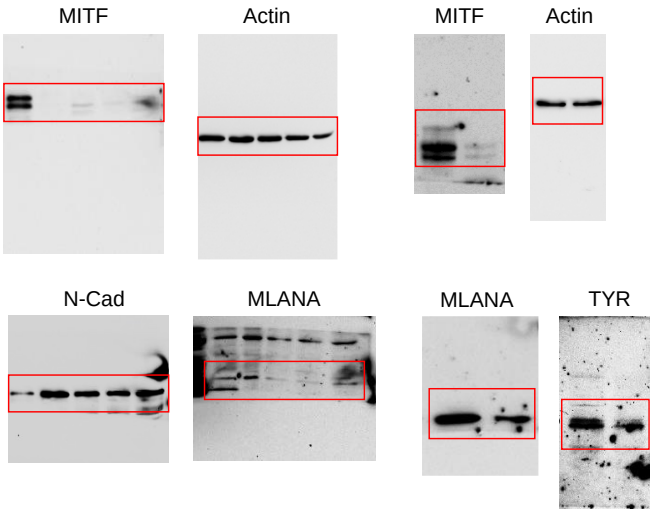



Fig. S3f

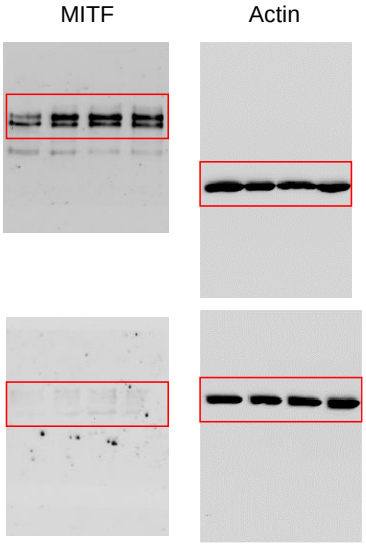
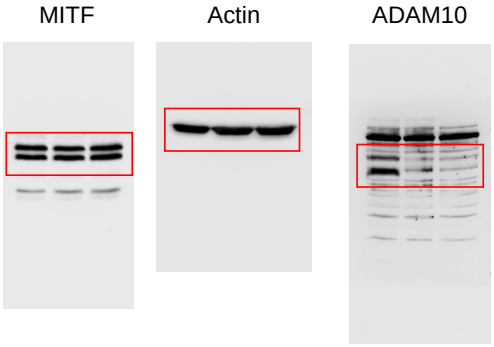
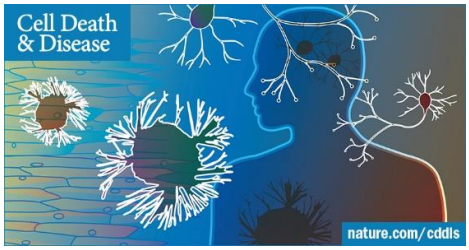



Fig. S6



## 5.3. EL BLOQUEO DE LA METILACIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PÁNCREAS RESULTA EN EL DESEQUILIBRIO DE LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR KRAS Y LA INHIBICIÓN DE LA AUTOFAGIA




Los resultados del estudio en relación con la modulación de la metilación de proteínas sobre la ruta de señalización mediada por KRAS y el proceso de autofagia en cáncer de páncreas se recogen en la publicación que se adjunta.

URL: https://www.nature.com/articles/s41419-023-06288-9

### 5.3.1. TÍTULO

*Targeting protein methylation in pancreatic cancer cells results in KRAS signaling imbalance and inhibition of autophagy.*

### 5.3.2. AUTORES

María F. Montenegro[1]*, Román Martí-Díaz[1]*, Ana Navarro[3], Jorge Tolivia[3], Luis Sánchez-del-Campo[1], Juan Cabezas-Herrera[2] y José Neptuno Rodríguez-López[1].

*Autores principales.

[1]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, España.

[2]Grupo de investigación de Terapias Moleculares y Biomarcadores de Tumores Sólidos, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), 30120, Murcia, España.

[3]Departamento de Morfología y Biología Celular, Universidad de Oviedo, Grupo GECYEN del Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Asturias, España.

### 5.3.3. REFERENCIA

*Cell Death & Disease* (2023), *14*, 761. https://doi.org/10.1038/s41419-023-06288-9

### 5.3.4. RESUMEN

Las células de cáncer de páncreas con mutaciones en *KRAS* requieren de una elevada autofagia basal para su crecimiento y viabilidad. En este trabajo, observamos cómo algunos de los procesos que permiten el mantenimiento de esa autofagia basal en las células de cáncer de páncreas están mediados por la metilación de proteínas. Así, la metilación de proteínas como PP2A y MRAS sustenta la actividad autofágica de dichas células. La interrupción de la metilación de proteínas utilizando un tratamiento hipometilante (HMT), que agota los niveles celulares de S-adenosilmetionina al mismo tiempo que induce la acumulación de S-adenosilhomocisteina, resulta en la inhibición de la autofagia y en la activación de estrés del retículo endoplásmico en las células de cáncer de páncreas. Las condiciones de hipometilación a través de la reducción de la localización en membrana de MRAS, producen un desequilibrio en la señalización de KRAS, lo que provoca la inactivación parcial de ERK y la sobreactivación de la ruta PI3K/AKT-mTORC1. Así, el tratamiento HMT impide la activación de CRAF mediante la disrupción del complejo ternario SHOC2 (SHOC2/MRAS/PP1), el cual actúa como una holofosfatasa CRAF-S259. Los procesos de desmetilación que resultan en la inactivación de PP2A también favorecen la inhibición de la autofagia bloqueando la activación de ULK1 a la vez que restablecen la retención citoplasmática de los factores de transcripción MiT/TFE. Dado que la autofagia permite a las células de cáncer de páncreas la plasticidad metabólica necesaria para hacer frente a diferentes condiciones de estrés, mientras que al mismo tiempo promueve su patogénesis y resistencia a inhibidores de la ruta de KRAS, esta terapia hipometilante, podría representar una estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer de páncreas.

CDDpress

www.nature.com/cddis

ARTICLE OPEN

# Targeting protein methylation in pancreatic cancer cells results in KRAS signaling imbalance and inhibition of autophagy

María F. Montenegro[1,4✉], Román Martí-Díaz[1,4], Ana Navarro[2], Jorge Tolivia[2], Luis Sánchez-del-Campo[1], Juan Cabezas-Herrera[3] and José Neptuno Rodríguez-López[1✉]

© The Author(s) 2023

Pancreatic cancer cells with mutant KRAS require strong basal autophagy for viability and growth. Here, we observed that some processes that allow the maintenance of basal autophagy in pancreatic cancer cells are controlled by protein methylation. Thus, by maintaining the methylation status of proteins such as PP2A and MRAS, these cells can sustain their autophagic activity. Protein methylation disruption by a hypomethylating treatment (HMT), which depletes cellular S-adenosylmethionine levels while inducing S-adenosylhomocysteine accumulation, resulted in autophagy inhibition and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic cancer cells. We observed that by reducing the membrane localization of MRAS, hypomethylation conditions produced an imbalance in KRAS signaling, resulting in the partial inactivation of ERK and hyperactivation of the PI3K/AKT–mTORC1 pathway. Interestingly, HMT impeded CRAF activation by disrupting the ternary SHOC2 complex (SHOC2/MRAS/PP1), which functions as a CRAF-S259 holophosphatase. The demethylation events that resulted in PP2A inactivation also favored autophagy inhibition by preventing ULK1 activation while restoring the cytoplasmic retention of the MiT/TFE transcription factors. Since autophagy provides pancreatic cancer cells with metabolic plasticity to cope with various metabolic stress conditions, while at the same time promoting their pathogenesis and resistance to KRAS pathway inhibitors, this hypomethylating treatment could represent a therapeutic opportunity for pancreatic adenocarcinomas.

*Cell Death and Disease* (2023)14:761 ; https://doi.org/10.1038/s41419-023-06288-9

## INTRODUCTION

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway plays an essential role in the control of cell proliferation, differentiation, and survival under physiological conditions [1]. Mutations in some of its components, such as KRAS, produce an oncological activation of this pathway that significantly contributes to cell transformation and is unquestionably involved in tumor progression [2]. KRAS is activated by specific mutations in ~30% of human tumors and is one of the preferential mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). For these reasons, this pathway has been the subject of intense research over the past decades, with the aim of identifying components that can be used as therapeutic targets in cancer treatment. However, despite the recent development of drugs that block $KRAS^{G12C}$, the majority of KRAS oncoproteins remain undruggable [3]. Therefore, current strategies to block KRAS-mutant tumors have primarily focused on inhibiting downstream MAPK signaling. Several selective inhibitors of MEK and ERK have been developed as potential agents to combat KRAS-mutated cancers [4, 5]. However, other studies have concluded that MAPK pathway inhibition in KRAS-mutated cancers triggers a resistance mechanism through the induction of protective autophagy [6–8]. Indeed, MEK1/2 inhibition leads to activation of the LKB1 → AMPK → ULK1 signaling axis, a key regulator of autophagy. Therefore, combination therapy of KRAS pathway inhibitors and autophagy inhibitors could represent a new strategy to treat KRAS-mutated cancers [6–8].

Methylation is crucial for many cellular activities, and differences in intracellular S-adenosylmethionine (SAM) concentrations and the SAM/S-adenosylhomocysteine (SAH) ratio affect many biological processes, from the epigenetic regulation of gene expression to the control of DNA damage response pathways [9–11]. These evidences, accumulating over the past 10 years, point to the methionine cycle as a potential therapeutic target. Therapies based on the suppression of the methionine cycle would result in the indirect inhibition of both DNA and protein methylation, although the particular inhibition of DNA or protein methylases primarily results in specific unmethylated products [12]. This comprehensive approach may be desirable due to the vast number of genes and pathways that DNA and protein methylation can affect. When the many effects on cellular physiology are added together, the effects of hypomethylation treatments are expected to have a positive overall therapeutic effect. Indeed, this nonspecificity can be viewed as advantageous where multiple defects are corrected simultaneously. For instance,

[1]Department of Biochemistry and Molecular Biology A, School of Biology, University of Murcia, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), Murcia, Spain. [2]Departamento de Morfología y Biología Celular, Universidad de Oviedo, Grupo GECYEN del Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Asturias, Spain. [3]Molecular Therapy and Biomarkers Research Group, University Hospital Virgen de la Arrixaca, IMIB, Murcia, Spain. [4]These authors contributed equally: María F. Montenegro, Román Martí-Díaz. ✉email: fermontenegro@um.es; neptuno@um.es

Edited by Quan Chen

Received: 4 July 2023 Revised: 2 November 2023 Accepted: 7 November 2023
Published online: 23 November 2023

we observed that a combined therapy designed to uncouple adenosine metabolism using dipyridamole (DIPY) in the presence of a new synthetic antifolate, 3-*O*-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)-(-)-catechin (TMCG), effectively and simultaneously blocked both the folic cycle and the methionine cycle in breast cancer cells, making these cells more sensitive to radiotherapy [10]. Here, in the case of pancreatic cancer cells, we observed that blocking the epigenetic machinery resulted in autophagy inhibition and endoplasmic reticulum (ER) stress-induced apoptosis. The objectives of this study were to understand the role of protein methylation on the regulation of autophagy in pancreatic cancer and investigate how its modulation could generate new therapies against this type of cancer [13, 14].

## RESULTS

### HMT inhibits basal autophagy in pancreatic cancer cells

Time-course of autophagy blockage using CQ allows monitoring the autophagy flux [15]. As expected, and in accordance with the elevated levels of basal autophagy, untreated PANC1 cells showed high steady-state levels of LC3-II (Fig. 1A). In control condition, autophagic flux blockade by CQ led to the accumulation of LC3-II due to the buildup of newly formed autophagosomes (Fig. 1A). In contrast, in cells pre-treated with a combination of TMCG and DIPY (HMT), LC3-II levels (compared with LC3-I levels) did not significantly increase in presence of CQ (Fig. 1A), suggesting that HMT pre-treatment had already blocked the autophagic flux. Similar results were obtained by LC3B immunocytochemistry where the treatment of pancreatic cancer cells with HMT efficiently prevented autophagosome formation in cells subjected to CQ treatment (Fig. 1B), indicating that HMT inhibited autophagy at an early state. On the other hand, the accumulation of p62/SQSTM1 in response to HMT also indicated the blockage of autophagy in PANC1 cells (Fig. 1C) [16].

### HMT decreases the cellular methylation capacity of pancreatic cancer cells

Although treating PANC1 cells exclusively with DIPY did not significantly modify the intracellular levels of SAM and SAH, we observed that including TMCG in the treatment produced a consistent and significant decrease in the methylation capacity of PANC1 cells (Fig. 1D). Interestingly, cells treated with the HMT combination showed not only a significant decrease in SAM but also accumulation of higher levels of SAH (Fig. 1D), which is in accordance with the proposed demethylating activity of this drug combination [12]. To determine the impact of decreased methylation capacity in PANC1 cells after HMT treatment, we focused on protein phosphatase 2A (PP2A), a trimeric serine/

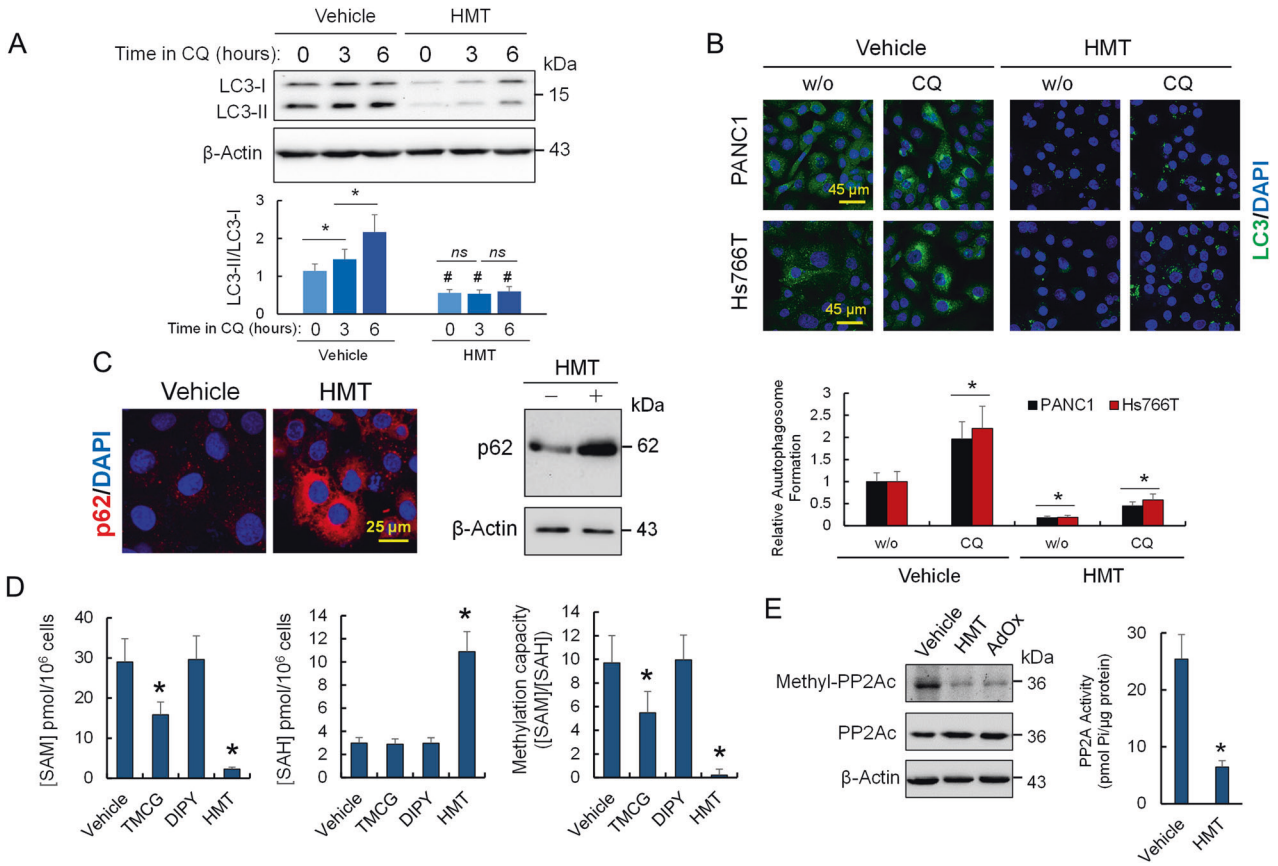



**Fig. 1 HMT inhibits basal autophagy and decreases the methylation capacity of pancreatic cancer cells. A** Western blot experiment showing a time-course analysis of LC3-II/LC3-I. PANC1 cells were treated with vehicle or HMT for 48 h followed by treatment with CQ (40 μM) for the indicated times. $^{*}P < 0.05$. ns = not significant. Differences between vehicle and HMT-treated samples at each time were found significant ($^{\#}P < 0.05$). **B** Pancreatic cancer cells were treated with vehicle or HMT for 48 h followed (or not) by treatment with CQ (40 μM) for an additional 24 h. Accumulated autophagosomes were evaluated by LC3 staining. $^{*}P < 0.05$ when compared with vehicle-treated cells without CQ (w/o). **C** Accumulation of p62 was analyzed by confocal microscopy (left) and Western blot (right) in PANC1 cells after 72 h of treatment with vehicle or HMT. **D** Effect of HMT and individual treatments [TMCG (10 μM) or DIPY (5 μM)] on the methylation capacity of PANC1 cells. Metabolite determination was performed 72 h after treatment. **E** Effect of HMT and AdOx (20 μM) on the methylation status (at L309) of the catalytic PP2Ac subunit. The histogram shows the effect of HMT on PP2A activity. Protein and activity analysis was carried out 72 h after each indicated treatment. In this figure, blots are representative of three independent experiments. Error bars show the mean ± SD. $^{*}P < 0.05$ compared with vehicle-treated controls.

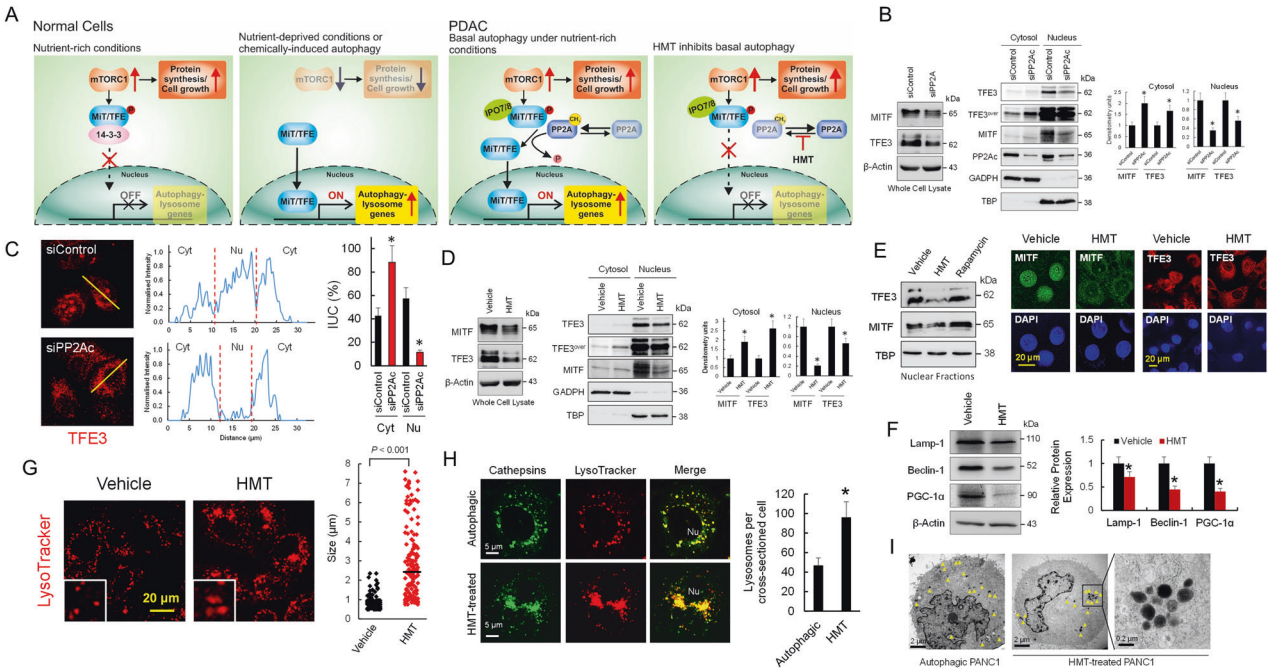


**Fig. 2 HMT inhibited nuclear translocation of MiT/TFE proteins in PDAC. A** In normal cells and under nutrient-rich conditions, MiT/TFE proteins are repressed by mTORC1 via phosphorylation and remain in the cytosol; however, upon starvation, mTORC1 is inactivated and MiT/TFE proteins enter the nucleus, where they activate autophagy-lysosome gene transcription. Interestingly, this mechanism was found to be decoupling in PDAC [21]. Although overexpression of the nucleocytoplasmic transporter importin (IPO-7/8) was proposed to facilitate the nuclear translocation of MiT/TFE, the high PP2A activity found in autophagic PDAC cells could also explain the MiT/TFE factors decoupling mechanism. The possible mechanism by which HMT inhibits basal autophagy in PDCA is also depicted. **B** Efficient PP2Ac silencing in PANC1 cells promotes cytosolic accumulation of MITF and TFE3 factors (*$P < 0.05$ when compared with siControl transfected cells). Blots were overexposed (TFE3$^{over}$) for cytosolic TFE3 quantification. **C** Fluorescence microscopy showing the effect of PP2Ac silencing on the localization of TFE3 in Hs766T cells. The line bar (30 µm) was used as a template for fluorescence intensity determination. Relative occupancy of TFE3 in the nucleus (Nu) and cytosol (Cyt) was calculated by analysis of the fluorescence intensity under the curve (IUC) in each compartment. *$P < 0.05$ when compared with siControl transfected cells. **D** HMT promotes cytosolic accumulation of MITF and TFE3 factors in PANC1 cells (*$P < 0.05$ when compared with vehicle-treated cells). Blots were overexposed (TFE3$^{over}$) for cytosolic TFE3 quantification. **E** HMT avoids nuclear translocation of TFE3 and MITF in Hs766T cells. Cells were treated with vehicle or HMT (72 h) or rapamycin (0.2 µM; 120 min). Cell extracts were analyzed by Western blotting for the indicated proteins (left panel). Nuclear localization of MITF and TFE3 was also evaluated by confocal microscopy (right panels) in Hs766T cells treated with vehicle or HMT (72 h). **F** Relative expression of proteins 72 h after each indicated treatment. Histogram represents the relative amount of proteins with respect to actin. *$P < 0.05$ when compared with vehicle-treated cells. **G** HMT treatment (72 h) causes aberrant lysosomal morphology and increased size as shown by LysoTracker staining. Inset: magnified view. Graph (right) quantification of lysosome diameter in HMT ($N = 173$) and vehicle-treated cells ($N = 169$). Bar, mean. **H** Confocal microscopy showing lysosome number and distribution in autophagic cells and HMT-treated cells. Lysosomes were stained with LysoTracker-Red DND-99 and an iABP Pan cathepsin probe (green). Differences in the number of lysosomes were significant (*$P < 0.01$) when compared with untreated autophagic cells (graph, right). **I** TEM showing lysosome localization in autophagic cells and HMT-treated cells. The arrow indicates the position of lysosomes. The boxed area contains representative lysosomes at 60,000× magnification. Lysosomes were randomly distributed in the cytoplasm of autophagic PANC1 cells, but HMT-treated cells showed grouped lysosomes.

threonine phosphatase regulated by protein methylation [17]. Although PP2A was found methylated at its catalytic subunit during basal autophagy, we found that HMT significantly induced demethylation of this protein, in the same way that adenosine-2,3-dialdehyde (AdOx), an inhibitor of SAH hydrolase (Fig. 1E). HMT-dependent PP2A demethylation was also accompanied by a substantial time-dependent reduction in PP2A activity (Fig. 1E). These results could be important in the context of pancreatic cancer. A recent investigation revealed that "autophagy-addicted" cells are dependent on high phosphatase activity and that the regulation of autophagy could be coordinated by the action of mTOR complex-1 (mTORC1) and PP2A [18, 19].

## HMT restores cytoplasmic retention of MiT/TFE proteins in PDAC

mTORC1 has been identified as a master regulator of autophagy since inhibition of mTORC1 is required to initiate the autophagy process [20]. When active, this complex phosphorylates and controls the subcellular localization of various transcription factors to suppress the expression of genes necessary for autophagosome formation and lysosome biogenesis (Fig. 2A). In this sense, Perera et al. [21] clearly stated that, as a part of the pathogenesis of PDAC, MiT/TFE transcription factors (MITF, TFE3, and TFEB) are decoupled from regulatory mechanisms that control their cytosolic retention (Fig. 2A). Recent investigations, suggest that high protein phosphatase PP2A activity in PDAC could be a compatible mechanism for MiT/TFE cytosolic/nuclear dysregulation. High PP2A activity has been found not only necessary to maintain autophagy in PDAC [18] but also to dephosphorylate TFE proteins at several serine residues facilitating their activation (Fig. 2A) [22]. Overall, these data suggest a critical mechanism to promote MiT/TFE activation by stimulating PP2A without suppressing mTORC1 activity.

To check whether this mechanism, involving PP2A, is operative in PDAC, we silenced the catalytic subunit of PP2A in Hs766T and PANC1 cells and analyzed the cellular localization of MITF and TFE3 (Fig. 2B, C). As observed in these figures, the lack of PP2A activity in pancreatic cancer cells clearly resulted in a reduction of nuclear MITF and TFE3, while significantly increased cytoplasmic retention of both proteins. Interestingly, and in agreement with

the effects of HMT on PP2A methylation and activity (Fig. 1E), this treatment clearly reduced nuclear accumulation of MITF and TFE3 in pancreatic cancer cells (Fig. 2D, E). Consequently, HMT reduced the expression of Lamp-1, Beclin-1 and PGC-1α [23, 24], some of the autophagic/lysosomal genes transactivated by MiT/TFE proteins (Fig. 2F). We also found that treatment with HMT resulted in increased lysosome diameter in PANC1 cells (892.1 ± 34.2 versus 2859 ± 145 nm for vehicle and HMT treatments, respectively) (Fig. 2G), which has been associated with lysosomal stress and defective proteolysis after depletion of MiT/TFE proteins across a series of PDAC cell lines [21]. Paradoxically, we also observed an increased number of lysosomes in HMT-treated cells when compared with untreated cells (Fig. 2H). Lysosomes are considered dynamic organelles and MiT/TFE proteins are key transcriptional regulators of lysosomal homeostasis and autophagy induction; therefore, defective synthesis of autophagic vacuoles under HMT treatment could lead to the accumulation of pre-existing lysosomes in PDAC cells. This hypothesis could be compatible with the observed mistrafficking/accumulation of lysosomes under HMT treatments in PANC1 cells (Fig. 2I).

### HMT activates mTORC1 activity while prevents ULK1 activation

The phosphorylation of AKT at regulatory residues T308 and S473 leads to its full activation [25]. Here, we observed that HMT treatment markedly increased AKT phosphorylation, mainly at residue S473, in both basal and rapamycin-induced autophagy (Fig. 3A, B). AKT is known to stimulate mTORC1 activity; therefore, these results indicated that HMT-dependent activation of AKT might prevent the inhibition of mTORC1 under autophagic stimuli. To test this hypothesis, we assayed the phosphorylation status of S6K, a well-known substrate of mTORC1. As observed in Fig. 3A, HMT highly promoted the phosphorylation of S6K. Interestingly, treating PANC1 cells with the specific mTORC1 inhibitor rapamycin was not sufficient to inhibit S6K phosphorylation in HMT-treated cells (Fig. 3C). Whether the activation of mTORC1 in HMT-treated cells was specifically due to HMT-dependent activation of AKT was investigated by cotreating PANC1 cells with HMT and a specific inhibitor of AKT (IAKT). The presence of IAKT during HMT treatment was sufficient to completely inhibit S6K phosphorylation in rapamycin-treated PANC1 cells (Fig. 3D).

Dephosphorylation of ULK1 at S637 is required for autophagy induction [26], but steady-state levels of ULK1-S637 might depend on both phosphorylation by mTORC1 and dephosphorylation by PP2A [18, 19]. Since HMT treatment could promote ULK1 phosphorylation at S637 by activating mTORC1 and/or by inactivating PP2A, it was tempting to speculate that HMT treatment could result in the inhibition of ULK1-dependent autophagy. To test this hypothesis, we monitored the UKL1 phosphorylation status at residue S637 (Fig. 3C). We observed that the kinetics of UKL1 dephosphorylation in PANC1 cells were rapid under rapamycin-induced autophagy; however, the presence of HMT induced a time-dependent increase in S637-phosphorylated ULK1. Since rapamycin failed to inhibit mTORC1 in the presence of HMT, to understand the real contribution of the inhibition of PP2A by HMT on steady-state levels of ULK1-S637, we carried out experiments with rapamycin in the presence of HMT and IAKT. We observed that even in the absence of mTORC1 activity (as indicated by the lack of S6K phosphorylation in HMT/IAKT-treated cells), HMT stabilized the S637-phosphorylated state of ULK1

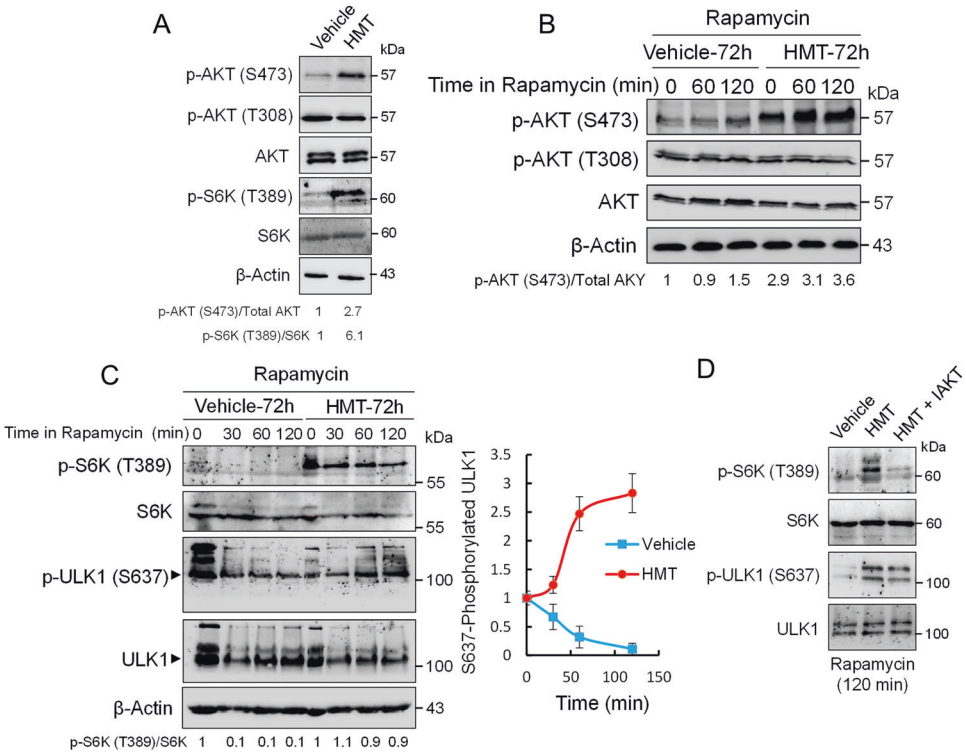



**Fig. 3 HMT activates AKT/mTORC1 and prevents ULK1 activation in PANC1 cells. A** Western blot showing the effects of HMT on AKT and S6K phosphorylation under basal autophagy. **B** Western blots showing the effect of HMT on AKT phosphorylation after rapamycin (0.2 μM) treatment. Before rapamycin treatment, the cells were treated with vehicle or HMT for 72 h. **C** Western blots showing the effects of HMT on S6K and ULK1 phosphorylation under rapamycin-induced autophagy. The graph represents the level of phosphorylated ULK1 (at S637) at the indicated times after rapamycin (0.2 μM) exposure. Before rapamycin treatment, the cells were treated with vehicle or HMT for 72 h. Error bars show the mean ± SD. **D** Western blots showing the effects of HMT and HMT/IAKT on S6K and ULK1 phosphorylation under rapamycin-induced autophagy (0.2 μM). Before rapamycin treatment, the cells were treated with vehicle, HMT, or a combination of HMT and IAKT (10 μM) for 72 h. In this figure, the blots shown are representative of three independent experiments.

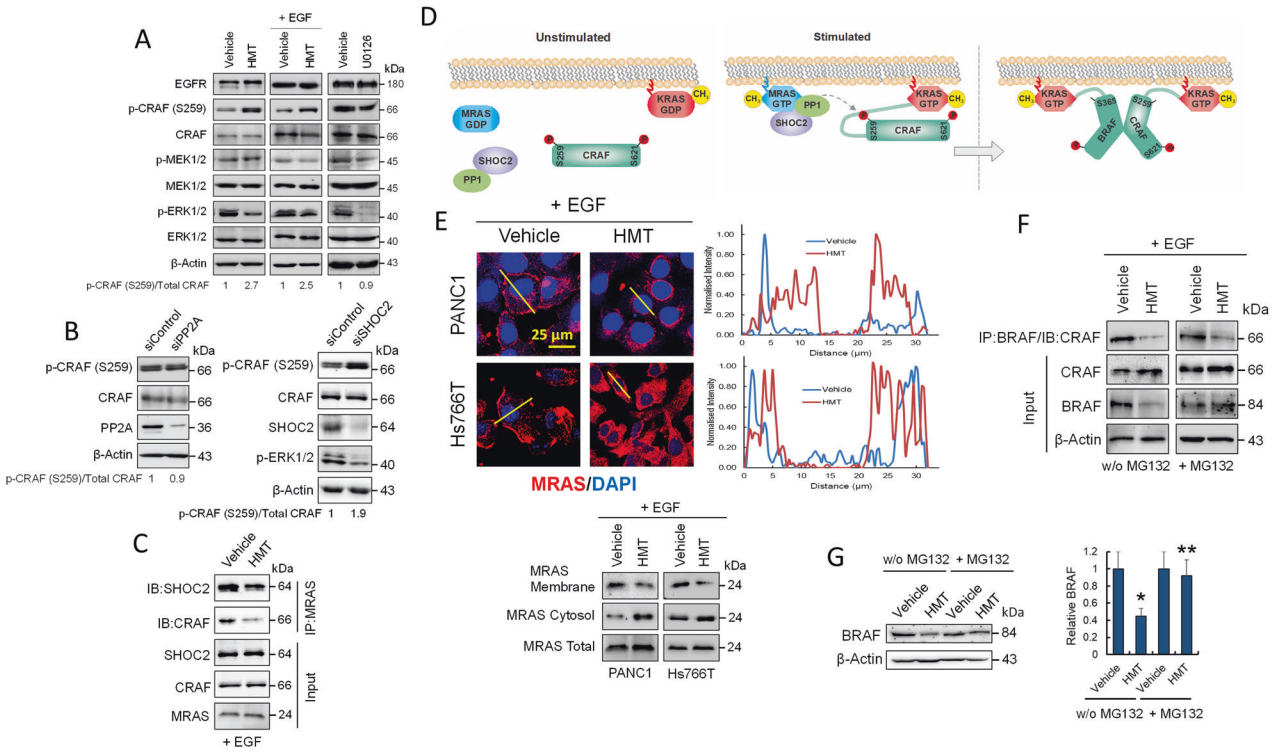



**Fig. 4 Effects of HMT on MAPK signaling pathway. A** Western blots showing the effects of HMT with and without EGF stimulation, and U0126 (10 μM; 24 h) on several components of the MAPK pathway in PANC1 cells. **B** Effect of PP2A (left panel) or SHOC2 (right panel) silencing on CRAF phosphorylation at S259 in PANC1 cells. The silencing effect was determined according to the corresponding siControl. **C** HMT reduces coimmunoprecipitation of MRAS with SHOC2 and CRAF. Total PANC1 extracts (1 mg) were immunoprecipitated using anti-MRAS, and bound proteins were immunoblotted with SHOC2 or CRAF antibodies. **D** A model for CRAF activation following dephosphorylation of S259 by the SHOC2 complex. **E** HMT modulates the localization of MRAS in PANC1 and Hs766T cells as determined by confocal microscopy (line bars were used as a template for fluorescence intensity determination) and Western blot analysis. **F** The effect of HMT on CRAF/BRAF heterodimerization in the absence or presence of MG132. For assays without MG132, PANC1 cells were treated with vehicle or HMT for 72 h. For assays in the presence of MG132 (10 μM), cells were treated with vehicle or HMT for 67 h, followed by treatment with MG132 for an additional 5 h. Total cell extracts (1 mg) were immunoprecipitated using anti-BRAF, and bound proteins were immunoblotted with a CRAF antibody. **G** Effect of HMT on BRAF stability in PANC1 cells in the presence or absence of MG132 (10 μM) as indicated in the previous panel. Total cell extracts were used for BRAF quantification. *$P < 0.05$ compared with vehicle-treated cells; **$P < 0.05$ compared with HMT-treated cells in the absence of MG132.

(Fig. 3D). These results further confirm that the mTORC1/UKL1 autophagy pathway is controlled by protein methylation in pancreatic cancer cells. The inhibition of PP2A by HMT not only suppressed autophagy by maintaining functional mTORC1 activity but also inhibited ULK1-dependent autophagy by stabilizing the inactive phosphorylated form of ULK1.

### HMT dysregulates oncogenic MAPK signaling by blocking CRAF activation

Protective autophagy in KRAS-mutant cancers is an attractive target for PDAC [6–8]. Therefore, we investigated whether HMT interfered with the RAF–MEK–ERK MAPK cascade and observed that HMT attenuated, but did not completely abolish, the constitutive phosphorylation of MEK1/2 and ERK1/2 in PANC1 cells (Fig. 4A). Although HMT did not visibly affect EGFR expression in PANC1 cells (Fig. 4A), we observed that this treatment modulated the phosphorylation of CRAF at residue S259 in both EGF-stimulated and nonstimulated cells. In both cases, in the presence of HMT, there was a clear accumulation of inactive CRAF-S259. Since PP2A holoenzymes were found to associate with CRAF, early studies proposed that PP2A activity might be a prerequisite for CRAF activation by removing inhibitory phosphorylation at S259 [27]. However, the fact that this proposed role was mainly based on the use of okadaic acid, a phosphatase inhibitor that also inhibits PP1, together with recent studies that identified the SHOC2–MRAS–PP1 complex as a specific CRAF-S259 phosphatase [28, 29], has reopened the debate on the role of PP2A in CRAF activation [30]. Here, we observed that PP2A activity was expendable during CRAF activation because silencing PP2Ac did not significantly affect the levels of CRAF-S259 phosphorylation in PANC1 cells (Fig. 4B). However, silencing SHOC2 in PANC1 cells did produce an accumulation of CRAF-S259 and an attenuation in the activation of ERK1/2, emulating the effects produced by HMT (Fig. 4B).

### HMT disrupts SHOC2 complex formation by blocking MRAS interaction with the plasma membrane

MRAS GTPase, a close relative of RAS oncoproteins, interacts with SHOC2 and PP1 to form a heterotrimeric holoenzyme (SHOC2 complex) that dephosphorylates the inhibitory S259 site on CRAF kinase [28–30]. Therefore, we examined the interactions of MRAS with SHOC2 and CRAF in PANC1 cell extracts. As shown in Fig. 4C, HMT significantly reduced such interactions, as determined by immunoprecipitation of MRAS and blotting with both SHOC2- and CRAF-specific antibodies. MRAS membrane localization is essential for SHOC2 complex activity toward CRAF in vivo (Fig. 4D) [29]. Interestingly, it has been reported that the accumulation of SAH under hypomethylating conditions inhibits isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT) [31]. Since the carboxyl methylation of RAS proteins by ICMT is a crucial step for proper plasma membrane localization, the inhibition of ICMT by antifolates results in the mislocalization of RAS proteins to cytosolic compartments

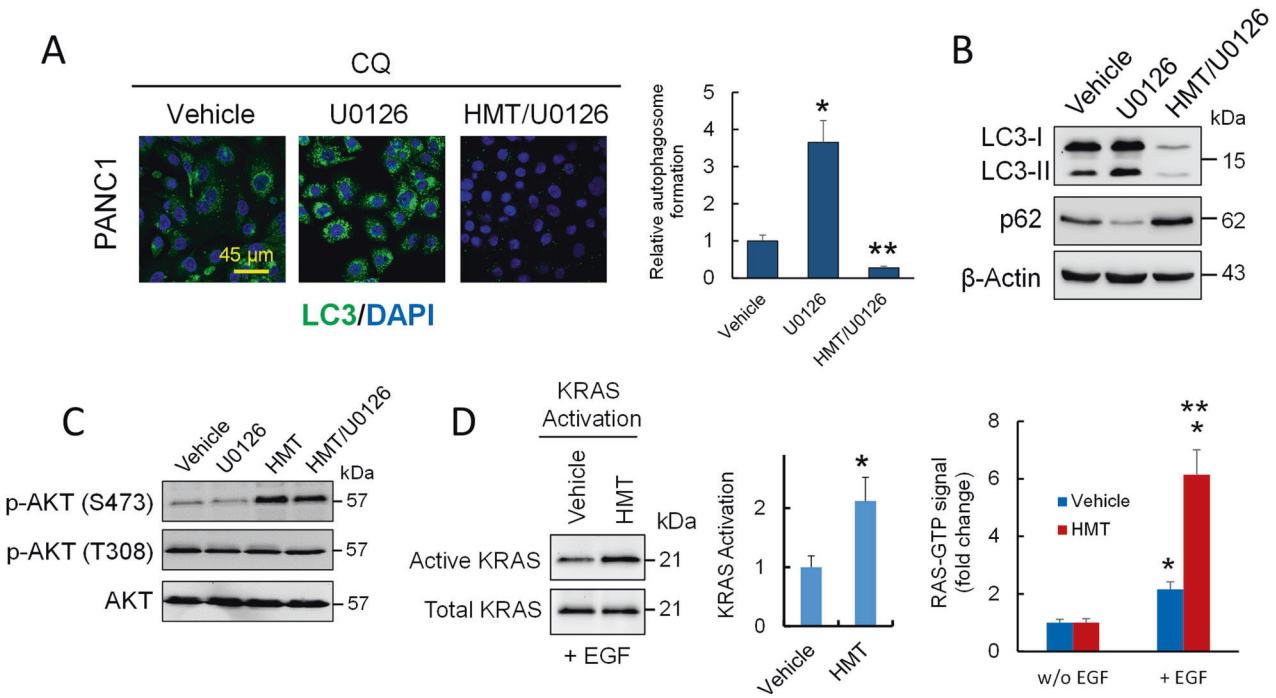



**Fig. 5 HMT suppresses MAPK but activates PI3K activity. A** Accumulated autophagosomes in PANC1 cells subjected to the indicated treatments were evaluated by LC3 staining. For these assays, PANC1 cells were treated with vehicle or U0126 (10 μM) for 24 h followed by treatment with CQ (40 μM) for an additional 6 h. For combined HMT/U0126 treatment, HMT-pretreated cells (24 h) were treated with U0126 and CQ as described above. *$P < 0.05$ compared with vehicle-treated cells. **$P < 0.05$ compared with U0126-treated cells. **B** Effect of HMT on U0126-induced protective autophagy. Representative Western blot of LC3B and p62 from PANC1 cells treated with vehicle, U0126, or HMT/U0126 as indicated above and then treated with CQ (40 μM) for an additional 6 h. **C** Western blots showing the effects of U0126 and/or HMT treatments on AKT phosphorylation. For individual treatments, PANC1 cells were treated with U0126 (10 μM; 24 h) or HMT (48 h). For combined HMT/U0126 treatment, HMT-pretreated cells (24 h) were treated with U0126 (10 μM) for an additional 24 h. **D** The effect of HMT on RAS activation in PANC1 cells was determined by two independent methods. The cells were treated with vehicle or HMT for 72 h and then stimulated or not with EGF. Left panel: the active form of RAS was carefully isolated from endogenous lysates using a KRAS activation assay kit that makes use of CRAF RBD agarose beads. Using a polyclonal anti-KRAS antibody, Western blot analysis was used to identify the precipitated GTP-KRAS. Error bars show the mean ± SD. *$P < 0.05$ compared with vehicle-treated cells. Right panel: after EGF stimulation, RAS activation was assayed using an ELISA-based assay for the quantification of GTP-bound RAS and normalized to its level in unstimulated cells. Error bars indicate the SD. *$P < 0.05$ compared with the respective unstimulated cells. **$P < 0.05$ compared with vehicle + EGF-treated cells.

[31]. Having observed that treating PANC1 cells with HMT increased the SAH/SAM ratio (Fig. 1D), we analyzed the localization of MRAS in EGF-stimulated pancreatic cancer cells. Confocal microscopy and Western blotting of membrane and cytosolic proteins revealed an enrichment of MRAS in cytosolic compartments after exposure to HMT (Fig. 4E), which could explain the lack of activation of the SHOC2 complex in these treated cells. Although ICMT inhibition might also affect other RAS proteins, such as KRAS, its constitutive activation in KRAS-mutant cancers could make it less sensitive to protein methylation disruption (Fig. 4D).

### HMT prevents heterodimerization of CRAF–BRAF and leads to BRAF destabilization

In the absence of SHOC2, EGF-stimulated BRAF–CRAF heterodimerization is strongly impaired [28]. Therefore, to further explore the effect of HMT on the KRAS pathway, we analyzed the interactions between BRAF and CRAF in PANC1 cells (Fig. 4F). We used equal amounts of vehicle- or HMT-treated cell extracts for immunoprecipitation assays with an anti-BRAF antibody. Although the amount of immunoprecipitated CRAF decreased in HMT-treated extracts, we observed a significant drop in BRAF levels at the corresponding HMT input, indicating that HMT compromised BRAF stability. To confirm this, we analyzed the amount of BRAF in cells treated with vehicle or HMT in the presence or absence of MG132. As observed in Fig. 4G, proteasome inhibition by MG132 restored BRAF levels in HMT-treated cells. Therefore, to analyze whether HMT impaired the BRAF–CRAF interaction, we used cell extracts treated with vehicle or HMT in the presence of MG132 for immunoprecipitation assays with an anti-BRAF antibody. As shown in Fig. 4F, HMT prevented BRAF–CRAF heterodimerization in PANC1 cells.

### HMT suppresses MAPK but activates PI3K activity in KRAS-mutant pancreatic cancer cells

Although both HMT and U0126 disrupted the RAF–MEK–ERK pathway, they showed opposing effects on autophagy; while HMT inhibited autophagic flux (Fig. 1A), U0126 induced protective autophagy (Fig. 5A, B). In fact, we observed that HMT inhibited protective autophagy induced by U0126 in PANC1 cells (Fig. 5A, B). Differences in AKT activation after HMT and U0126 treatments could explain the differential response of PANC1 cells to these treatments (Fig. 5C). Although several components of the pathway controlling AKT can be affected by the methylation status of the cell, we observed that after EGF stimulation, there was an increase in KRAS activation in those samples that were pretreated with HMT compared to those pretreated with only the vehicle (Fig. 5D). Because the inhibition of SHOC2 expression suppresses MAPK but not PI3K activity in tumor cells with RAS gene mutations [30], these observations could partly explain the overactivation of the PI3K pathway in cells treated with HMT, which could contribute to increased phosphorylation of AKT after the inhibition of the SHOC2 complex.

### HMT induces ER stress and cell death

Impaired autophagy contributes to ER stress by inhibiting the degradation of misfolded proteins, which undergo ubiquitination

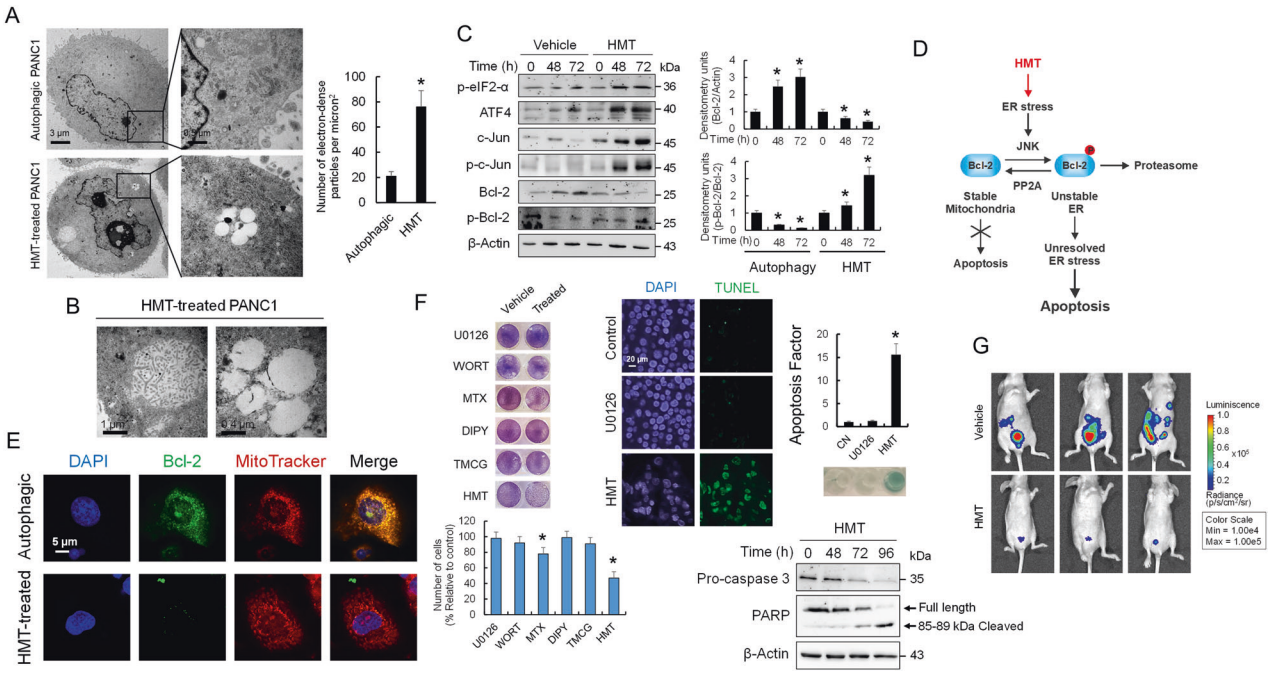



**Fig. 6 HMT induces ER stress-dependent apoptosis in PANC1 cells. A** TEM image showing ribosomes in autophagic (vehicle treatment) and HMT-treated (72 h) PANC1 cells. The boxed area contains representative ribosomes at ×60,000 magnification. Ribosomes were quantified using ImageJ as indicated in the "Methods" section. *$P < 0.05$ compared with untreated controls. **B** PANC1 cells were treated with HMT for 72 h and then analyzed by TEM. They exhibited vacuolation of the cell cytoplasm due to swelling of the ER cisternae. **C** Western blots showing the expression of the indicated proteins in PANC1 cells after 72 h of vehicle or HMT treatment. The histograms show the relative amounts of Bcl-2 and p-Bcl-2 versus β-actin and Bcl-2, respectively, under different treatments. *$P < 0.05$ compared with untreated controls. **D** Schematic representation of HMT inducing ER stress-dependent apoptosis. **E** Confocal microscopy showing Bcl-2 and mitochondrial localization in PANC1 cells. **F** HMT significantly decreased cell viability in PANC1 cells compared with individual treatments [TMCG (10 µM) or DIPY (5 µM)] and those including U0126 (10 µM), wortmannin (WORT; 0.2 µM), or methotrexate (MTX, 10 µM). Cells were subjected to the indicated treatment for 72 h. Following HMT treatment, a reduction in cell viability was accompanied by an increase in apoptosis (as determined by TUNEL) and the cleavage of PARP and caspase 3 (as indicated by a time-dependent reduction in full-length caspase 3). Histograms represent the apoptotic factor (assuming an apoptotic factor of 1 for PANC1 untreated cells) evaluated using a DNA fragmentation assay. *$P < 0.05$ compared with untreated controls. **G** Luciferase imaging of vehicle (control) and HMT-treated mice at 21 days post-tumor cell injection ($N = 3$). Firefly luciferin (120 mg/kg) was injected intraperitoneally.

and are bound to p62/SQSTM1 (Fig. 1C) [32]. Interestingly, and in agreement with a hyperactive mTORC1 pathway in HMT-treated cells resulting in active S6K1 (Fig. 3A), there was a significant increase in ribosomes associated with the ER in HMT-treated cells when compared with autophagic cells (Fig. 6A). The HMT-treated cells also showed characteristics of early stage-ER stress, including a distended and dilated ER and vacuolation of the cell cytoplasm due to swelling of the ER cisternae (Fig. 6B). Taken together, these data indicated that HMT gives controversial instructions to pancreatic cancer cells, while force them to continuous protein synthesis, but suppressing autophagy mechanisms to removal misfolded proteins (Fig. 2A).

Consequently, we observed increased expression of ER stress markers, such as eIF2α phosphorylation and ATF4, in HMT-treated PANC1 cells compared with vehicle-treated controls (Fig. 6C). ER stress-induced autophagy switches to apoptosis under accumulative damage stimuli. Here, we observed that HMT activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling (Fig. 6C), an indicator of severe and unresolved ER stress [33]. The activation of JNK by HMT led to the phosphorylation and stabilization of c-Jun while eliminating the antiapoptotic effect of Bcl-2 (Fig. 6C). Interestingly, phosphorylation of Bcl-2 by JNK at the ER is required for its proteasome-dependent degradation, while PP2A-mediated dephosphorylation of Bcl-2 protects it from degradation and induces its mitochondrial translocation, favoring cell resistance to several classes of death stimuli (including ER stress) (Fig. 6D) [33, 34]. Although PANC1 cells had increased Bcl-2 levels during spontaneous autophagy, probably to protect against apoptosis, the HMT-treated cells showed reduced levels of Bcl-2, and it was mainly in its phosphorylated state. Confocal microscopy also revealed different localizations of Bcl-2 in autophagic and HMT-treated cells (Fig. 6E). Since HMT-induced JNK signaling while inhibiting PP2A activity, treatment of pancreatic cancer cells with this combination had a knock-on proapoptotic effect that resulted in caspase-mediated cell death (Fig. 6F). Next, we assayed HMT activity in a mouse model of peritoneal carcinomatosis. For this, PANC1-luc cells were injected intraperitoneally into female nude mice (Hsd: athymic nude-Foxn1nu), and the evolution of tumors was evaluated using an IVIS Lumina-2 system. Compared with vehicle treatment, HMT significantly reduced tumor growth (Fig. 6G).

## DISCUSSION

Recent studies indicated that combined inhibition of EGFR and CRAF in KRAS-driven models of PDAC prevented tumor development [35]; therefore, there is a growing interest in targeting CRAF as a strategy to treat KRAS mutant tumors [36]. Although drugs that directly target CRAF have not yet been successfully developed, other strategies to prevent CRAF activation have been proposed [30]. Since CRAF activation (by dephosphorylation of S259) depends on a functional SHOC2 complex [28], the indirect modulation of CRAF by interfering with the components of this complex (SHOC2, MRAS, and PP1) could be of therapeutic interest. In fact, the identification of both SHOC2-dependent and -independent mechanisms of ERK activation [28] could help to elucidate the importance of blocking the MAPK pathway at the

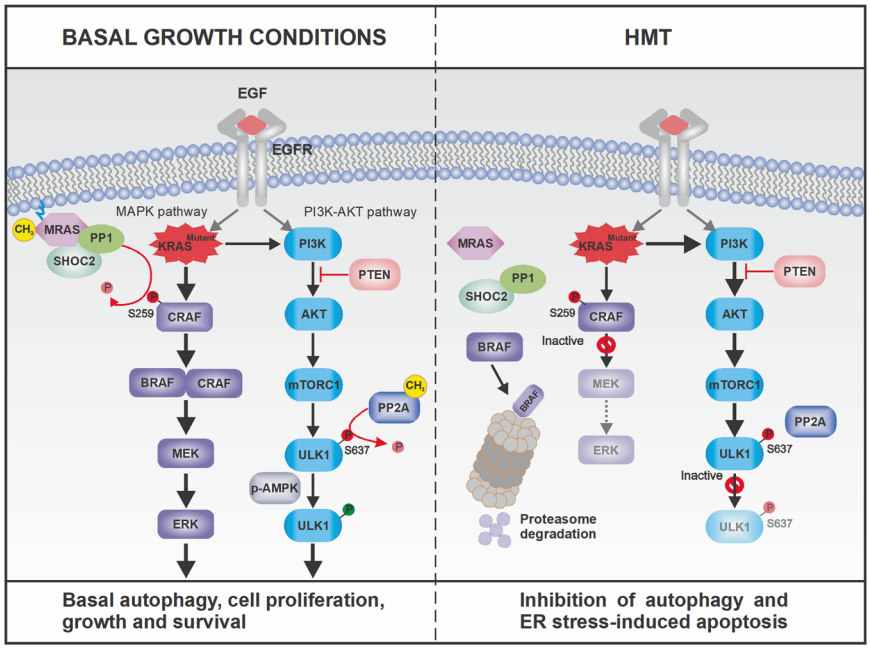



**Fig. 7 Proposed mechanism(s) by which impaired protein methylation inhibits autophagy in KRAS-mutated PDAC tumors.** PDAC cell growth depends on high basal autophagy [18]. In addition to mTORC1 inactivation, starvation also causes an increase in PP2A activity toward ULK1, a mTORC1 substrate whose dephosphorylation at S637 is required for autophagy induction. Strong PP2A activity toward MiT/TFE proteins and ULK1 can explain the contradictory coexistence of strong basal autophagy activity and intact mTORC1 function in KRAS-mutated PDAC tumors. Under such conditions, activation of MRAS by protein methylation maintains and operates the RAS–MEK–ERK pathway to ensure cell proliferation, growth and survival. However, mechanisms for maintaining autophagy and cell survival are disrupted under hypomethylating conditions (HMT). Impaired protein methylation induced a KRAS signaling imbalance that resulted in attenuation of the MAPK pathway but hyperactivation of the PI3K/AKT pathway. The high levels of AKT activation (by phosphorylation at S473) in the presence of HMT failed to inhibit mTORC1 even in the presence of its specific inhibitor rapamycin. Therefore, by activating mTORC1 while inhibiting the methylation/activation of PP2A, HMT induced strong autophagy inhibition, which has been found to protect KRAS-mutated PDAC tumors from drugs designed to specifically target the MAPK pathway [6–8]. Residual ERK2 activation maintained by SHOC2-independent mechanisms together with the disruption of PP2A-dependent control of anti-apoptotic Bcl-2 rendered the pancreatic cancer cells unable to defend themselves against cumulative damage resulting from HMT-induced ER stress.

level of CRAF. Since aberrant signaling in KRAS-mutant cancer cells is entirely dependent on the SHOC2-dependent pathway, this suggests that, in contrast to targeting MEK or ERK (which inhibit global ERK signaling), blocking SHOC2 function would interfere only with oncogene-driven ERK activation and would not affect other aspects of normal ERK regulation mediated through SHOC2-independent mechanisms, which would bypass KRAS membrane activation [28]. Since a residual p-ERK2 pathway is necessary to induce ATF4-dependent cell death [37], and disruption of SHOC2 would only affect oncogenic KRAS signaling, the blockade of CRAF activation by disrupting the SHOC2 complex might be a therapeutic route to induce apoptosis in tumor cells but with less toxicity for the patient.

In this context, our results show that simultaneous blocking of the MAPK pathway and autophagy under hypomethylating conditions was more effective in inducing apoptosis in pancreatic cancer cells than the application of specific drugs, such as U0126 and wortmannin, which are designed to inhibit the MAPK and PI3K pathways, respectively (Fig. 6F). Our study points to MRAS as an attractive target in PDAC. Unlike other components of the MAPK pathway, such as KRAS, BRAF, and NRAS, MRAS has not been found to be mutated in human cancers [30], and perhaps this circumstance has excluded it from being an attractive anticancer target. However, its relevant function during CRAF activation, together with the fact that it is not constitutively active and is not permanently located in the cell membrane, could generate new therapeutic opportunities. The observation that HMT compromises BRAF stability could also be of interest to explain the effect of these hypomethylating therapies on BRAF-mutated melanomas [38, 39].

Importantly, an HMT-induced decrease in PP2A activity may also lead to the failure of nuclear translocation of MiT/TFE factors and a decrease in ULK1 activity for autophagy activation. On the one hand, hypomethylation conditions restore mTORC1-mediated suppression of MiT/TFE factors [21], which disables PDAC cells to maintain robust activation of anabolic pathways while simultaneously benefiting from autophagy/lysosomal pathway-mediated catabolic process [21]. On the other hand, the indirect effect of HMT on the kinase activity of ULK1 suggests that this treatment inhibits autophagy by disrupting the maturation of autophagosomes [40]. The relationship between KRAS-MAPK signals and autophagy is described in Fig. 7 and we noticed that this perfectly orchestrated mechanism for maintaining basal autophagy and cell survival in PDAC was completely disrupted under hypomethylating conditions. Therefore, the use of HMT alone, in the presence of MEK/ERK inhibitors, or strategies to disrupt protein homeostasis by jointly blocking protein degradation in the lysosomes and the ubiquitin-proteasome system are promising strategies that could be explored for the treatment of PDAC tumors. The results of these further studies will allow us to draw conclusions about whether protein methylation constitutes the Achilles' heel of pancreatic tumor cells and whether therapies directed at the epigenetics of these cells could be transferred to the clinic.

## METHODS

### Reagents and antibodies

TMCG was synthesized from catechin via reaction with 3,4,5-trimethoxybenzoyl chloride [41]. DIPY, rapamycin, AdOx, MTX, U0126, wortmannin, IAKT VIII trifluoroacetate salt hydrate, MG132, and EGF were obtained from

Merck (Madrid, Spain). Antibodies against the following proteins were used: β-actin (Merck; monoclonal clone AC-15), AKT (Abcam, Cambridge, UK; monoclonal clone EPR17737), ATF4 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; polyclonal H-277), Beclin-1 (Thermo-Fisher; monoclonal), Bcl-2 (Merck; monoclonal), BRAF (Abcam; monoclonal clone EP152Y), caspase 3 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA; monoclonal), c-Jun (Thermo-Fisher; recombinant polyclonal clone 2HCLC), CRAF (Thermo-Fisher; polyclonal), EGFR (Abcam; monoclonal clone EP38Y), ERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology; monoclonal), GADPH (Abcam; monoclonal), Lamp-1 (Abcam; polyclonal), LC3B (Abcam, polyclonal), MEK1/2 (Thermo-Fisher; polyclonal), metyl-PP2Ac (Merck; monoclonal clone 2A10), MITF (Merck; monoclonal clone C5), MRAS (Thermo-Fisher; monoclonal clone OTI3C4), MRAS (Abcam; monoclonal clone EPR12457), p62/SQSTM1 (Thermo-Fisher; polyclonal), p-AKT-S473 (Merck; monoclonal clone 6F5), p-AKT-T308 (Santa Cruz Biotechnology; monoclonal), PARP (Abcam; monoclonal clone E102), p-Bcl-2-S70 (Merck; polyclonal), p-c-Jun (Thermo-Fisher; polyclonal), p-CRAF-S259 (Thermo-Fisher; polyclonal), p-eIF2α (Cell Signaling Technology; monoclonal), p-ERK1/2 (Merck; monoclonal), PGC-1α (Santa Cruz Biotechnology; monoclonal), p-MEK1/2-S217-S221 (Thermo-Fisher; monoclonal clone C.158.9), PP2Ac (Merck; monoclonal clone 1D6), p-S6K-T389 (Merck; polyclonal B2HCLC), p-ULK1-S638 (Abcam; monoclonal clone EPR6155), S6K (Merck; monoclonal clone 5G9), SHOC2 (Merck; polyclonal), TATA binding protein (TBP: Abcam; monoclonal), TFE3 (Merck; polyclonal), TFEB (Merck; polyclonal), and ULK1 (Merck; polyclonal).

## Cell cultures and treatments

PANC1 cells constitute a cellular model for PDAC with mutated *KRAS* (heterozygous p. Gly12Asp; c.35G>A) and *TP53* (homozygous p. Arg273His; c.818G>A). To extend our analysis to other PDAC models, we studied the effect of HMT on Hs766T cells, which are homozygous for *KRAS* (p. Gln61His; c.183A>C) but have no *TP53* mutation. PANC1 and Hs766T cell lines were obtained from ATCC and tested for mycoplasma and authenticated using genotype profiling according to the ATCC guidelines. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1 mM pyruvate, and 2 mM glutamine and incubated at 37 °C, 7.5% $CO_2$ and 95% humidity. Penicillin and streptomycin were added to the culture medium at final concentrations of 50–100 IU/ml and 50–100 µg/ml, respectively. Basal autophagy, defined here as macroautophagic activity during cell growth in a normal medium containing amino acids and serum, appeared to be highly active in the pancreatic cancer cells used in this study. To study basal autophagy, approximately 60–70% of confluent cells were seeded 24 h before drug treatments. Resting cells (24 h after seeding) were treated (zero time) with vehicle (DMSO) or HMT (consisting of a combination of 10 µM TMCG and 5 µM DIPY in DMSO) to evaluate basal autophagy and HMT-related effects, respectively, during the indicated times. When indicated, autophagic cells (72 h under vehicle treatment) and HMT-treated cells (72 h under HMT treatment) were stimulated with 30 ng/ml EGF for 5 min.

## Cell proliferation measurement

Cell proliferation was evaluated using colorimetric assays to analyze mitochondrial function (MTT; Merck). This assay is based on the ability of the metabolically active cell enzyme succinate dehydrogenase to convert MTT to water-insoluble blue-colored formazan. The amount of formazan is directly proportional to the number of cells. For the assay, culture medium was removed from 96-well plates, and 0.2 ml of fresh medium was added to each well. Next, 50 µl of MTT solution (5 mg/ml dissolved in culture medium) was added and incubated in the dark for 2 h. The medium was then removed, and 100 µl of DMSO was added to solubilize the formed formazan. The absorbance was measured at 570 nm in a FLUOstar Omega plate reader spectrophotometer (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) using 690 nm as the reference wavelength. In other cases, the % surviving attached cells (% crystal violet OD) was used to compare vehicle control versus treated cells. For this, the cells were washed twice with 1x PBS and stained with 0.5% crystal violet (in 20% methanol) for 20 min. The cells were then washed with water 4 times, and the plates were air-dried overnight. The next day, 200 µl of DMSO was added to each well and incubated for 20 min at room temperature. The optical density was measured at 590 nm. Experiments were performed in triplicate at least three times.

## Metabolite measurements

Intracellular metabolites were isolated on ice by sonication of $10 \times 10^6$ cells in 1 ml of ice-cold PBS using a 30 kHz sonicator with the probe at 30% amplitude for three 20-s cycles with 1 min breaks in between. The resultant cell-free supernatants were snap-frozen and stored at −80 °C. Quantification of intracellular SAM and SAH concentrations was then conducted using the SAM and SAH ELISA Combo Kit from Cell Biolabs Inc. (STA-671-C; San Diego, CA, USA) following the manufacturer's protocol.

## Microscopy

Laser-scanning CM of fixed cells was performed using a Leica TCS 4D confocal microscope (Wetzlar, Germany). For indirect immunofluorescence studies, cells were grown on 100-$mm^2$ coverslips and fixed with acetone. Coverslips were incubated in 5% BSA for 20 min and probed with primary antibodies (diluted 1:200 in PBS containing 5% BSA) for 2 h at room temperature. The cells were then washed three times in PBS and incubated for 1 h at room temperature with Alexa Fluor dyes (Thermo-Fisher). The coverslips were permanently mounted to the slides using a fluorescence mounting medium (ProLong-Gold, Thermo-Fisher). Nuclei and lysosomes were stained with DAPI and LysoTracker Red DND-99, respectively. Cathepsins were labeled with an iABP probe (iABP Pan Cathepsin Probe, Vergent Bioscience, Minneapolis, MN, USA) specifically designed to label cathepsins B/L/S/X. For TEM, cells were centrifuged for 10 min at 1500 rpm and fixed with 3% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (1 h at 4 °C). Next, the fixative was removed by centrifugation, and the samples were left overnight at 4 °C in 0.1 M cacodylate buffer containing 8% sucrose. After centrifuging again, the buffer was removed, and the samples were placed in 1% osmium tetroxide (2.5 h at 4 °C). After removing the osmium tetroxide by centrifugation, the samples were resuspended in 0.1 M cacodylate buffer containing 8% sucrose. The samples were then dehydrated with ethanol in increasing concentrations (30–100%), washed with propylene oxide, and embedded in epoxy resin (EPON). Finally, the samples were cut into ultrathin sections with an ultramicrotome and stained with lead citrate and uranyl acetate. The preparations were visualized on a JEOL 1011 transmission electron microscope (JEOL, Inc., Peabody, MA, USA), and photographs were taken with a Gatan Orius SC200 high-contrast coupled digital camera (Gatan, Inc., Pleasanton, CA, USA). For the quantification of ribosomes and lysosomes, electronic images were processed with a modification of a previously described method [42]. Images were contrast-enhanced in Adobe Photoshop (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA) for clarity and subsequently clean masks were analyzed with the "Analyze particles" routine of ImageJ 1.37c25 (National Institutes of Health, Bethesda, MD) to obtain the estimated number of ribosomes and lysosomes.

## Stealth RNA transfections

Specific stealth siRNAs for SHOC2 (HSS111928) and PP2A-Cα (HSS108358) were obtained from Thermo-Fisher and transfected into PANC1 cells using Lipofectamine 2000 (Thermo-Fisher). Stealth RNA-negative control duplexes (Thermo Fisher) were used as control oligonucleotides, and the ability of the stealth RNA oligonucleotides to knockdown the expression of selected genes was analyzed using Western blot analysis at 72 h after siRNA transfection.

## Western blots

Whole-cell lysates were collected in SDS–PAGE sample loading buffer. After sonication, the samples were boiled (10 min), and proteins were separated by SDS–PAGE and then transferred to nitrocellulose membranes and analyzed using immunoblotting (WesternBright Quantum, Advansta, San Jose, CA, USA).

## Immunoprecipitation

For immunoprecipitation assays, the cells (~$5 \times 10^6$) were lysed in 500 µl of lysis buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.4% NP40, 10 mM $MgCl_2$) supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (Merck). The cell extracts were cleared by centrifugation (20,000×*g* for 15 min) and then diluted with 500 µl of dilution buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 0.4% NP40, 2.5 mM $CaCl_2$) supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails and DNase I (Merck). The extracts were precleared in 30-min incubations with 20 µl of Pure Proteome Protein G Magnetic Beads at 4 °C while being rotated. The antibodies (as indicated in the figure legends) were incubated with 50 µl of Pure Proteome Protein G Magnetic Beads for 1 h at RT. After extensive washing, Protein G Magnetic Beads containing antibodies were washed, and the precleared extracts were added and incubated overnight at 4 °C with rotation. After extensive washing, the bound proteins were analyzed by Western blot. The unbound extracts were used as the positive inputs to determine protein loading.

### Cell fractionation

The plasma membrane fraction was isolated using a plasma membrane protein extraction kit (Abcam; ab65400) following the manufacturer's instructions. In brief, cells were lysed in homogenization buffer containing a protease inhibitor cocktail. The homogenates were centrifuged at 700×*g* for 10 min at 4 °C. Pellets containing plasma membrane and organelle membranes were isolated from the cytosol fraction by high-speed centrifugation of the supernatants at 10,000×*g* for 30 min at 4 °C. To isolate the plasma membrane fraction further, pellets were resuspended in the upper phase buffer and extracted in the lower phase buffer. This was followed by centrifugation to pellet the plasma membrane fraction. The plasma membrane pellets were solubilized in 0.5% Triton X-100 in PBS for Western blotting. Cytosolic extracts were obtained using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo-Fisher).

### PP2A assay

The PP2A assays were performed as previously described [43]. After two washes with 0.9% NaCl, total cellular proteins were extracted in lysis buffer containing 50 mM Tris–HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA, 1% Triton X-100, and 0.5% NP-40 without phosphatase inhibitors. Specific PP2A activity was measured using the PP2A Immunoprecipitation Phosphatase Assay Kit (Merck). All procedures were performed according to the manufacturer's protocol, and changes in absorbance were measured at 650 nm in a Spectra-MAX 250 plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### Quantification of autophagosomes

Autophagosomes were quantified using an LC3B Antibody Kit for Autophagy (Thermo-Fisher). PANC1 or Hs766T cells ($5 \times 10^5$) were treated as indicated, fixed with methanol, and stained with a green detection reagent. Images were captured with a fluorescence microscope. The total number of green dots per field was counted in five different images per sample from the treated/untreated groups. The number of autophagosomes/100 cells was calculated. In parallel, cells were treated with vehicle (with and without CQ) and processed similarly, which served as positive controls.

### Apoptosis assays

Analysis of apoptotic cells was performed using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) staining kit following the manufacturer's instruction (Roche Diagnostics). Images of cells were taken using a fluorescence microscope. Apoptosis was quantified by ELISA (Cell Death Detection ELISA PLUS, Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) to detect mono- and oligonucleosomes in the cytoplasmic fractions of cell lysates using biotinylated antihistone and peroxidase-coupled anti-DNA antibodies. The amount of nucleosomes was photometrically quantified at 405 nm by determining the peroxidase activity that was retained in the immunocomplexes. Apoptosis was defined as the specific enrichment of mono- and oligonucleosomes in the cytoplasm and calculated by dividing the absorbance of the treated samples by the absorbance of the untreated samples after correcting for the number of cells.

### RAS activation assays

KRAS activity was assayed using a KRAS Activation Assay Kit (Cell Biolabs, Inc.) according to the manufacturer's protocol. Briefly, PANC1 cells ($2 \times 10^7$ per sample) were lysed in 1 ml of lysis buffer (25 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 2% glycerol), and the lysates were incubated with CRAF RBD agarose beads for 3 h at 4 °C. The beads were collected by centrifugation and washed thrice with assay buffer. KRAS was eluted from the beads with Laemmli sample buffer. The samples were subjected to SDS-PAGE, and the pull-down of active KRAS was assessed by Western blotting with an anti-KRAS antibody. In the RAS activation assay kit for ELISA (Cat. #17-497; EMD Millipore), 200 µg of total protein was used at 1 µg/µL, and the RAS-GTP pull-down was measured using a microplate reader (Fluostar-Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) in luminescent mode.

### Mice

Female athymic nude-Foxn1nu mice, 4–5 weeks of age, were obtained from Envigo (Barcelona, Spain). The mice were housed under aseptic conditions (positive air pressure in a designated mouse room with microisolator tops) in the specific pathogen-free animal facility at the University of Murcia, and all mouse handling procedures were carried out under a laminar flow hood. Primary tumors were established intraperitoneally with $5 \times 10^5$ PANC1 cells expressing luciferase. HMT was administered intraperitoneally on Day 5 and consisted of a mixture of TMCG (30 mg/kg/day) and DIPY (10 mg/kg/day). Control mice received the same volume of vehicle (DMSO). Peritoneal carcinomatosis was analyzed using the IVIS Imaging System (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA). We made every attempt to reach conclusions using as small sample size as possible. We usually exclude samples if we observe any abnormality in terms of size, weight, or apparent disease symptoms in the animal before performing experiments. However, we did not exclude any animals in the present study, as we did not observe any abnormalities. Neither randomization nor blinding was performed in this study.

### Quantification and statistical analysis

The Western blot analyses and the microscopy data analyses were performed as previously described [10]. The analyses were repeated at least three times, and they showed similar results. The results from one experiment are shown. To quantify the results, the Western blots were scanned using a Bio-Rad ChemiDoc scanning densitometer (Bio-Rad Laboratories), and relative band intensities were analyzed using a Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA). For other experiments, the mean ± SD of three measurements performed in triplicate was calculated. Numerical data were analyzed to determine statistical significance using Mann–Whitney tests for comparisons of means in SPPS statistical software for Microsoft Windows, release 6.0 (Professional Statistic, Chicago, IL, USA). Individual comparisons were made using Student's two-tailed, unpaired *t*-tests. The criterion for significance was $P < 0.05$ for all comparisons.

## DATA AVAILABILITY

All datasets generated and analysed during this study are included in the published article. Additional data are available from the corresponding author on reasonable request.

## REFERENCES

1. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Cell Res. 2002;12:9–18.
2. Drosten M, Barbacid M. Targeting the MAPK pathway in KRAS-driven tumors. Cancer Cell. 2020;37:543–50.
3. Ryan MB, Corcoran RB. Therapeutic strategies to target RAS-mutant cancers. Nat Rev Clin Oncol. 2018;15:709–20.
4. Samatar AA, Poulikakos PI. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. Nat Rev Drug Discov. 2014;13:928–42.
5. Ryan MB, Der CJ, Wang-Gillam A, Cox AD. Targeting RAS-mutant cancers: is ERK the key?. Trends Cancer. 2015;1:183–98.
6. Bryant KL, Stalnecker CA, Zeitouni D, Klomp JE, Peng S, Tikunov AP, et al. Combination of ERK and autophagy inhibition as a treatment approach for pancreatic cancer. Nat Med. 2019;25:628–40.
7. Kinsey CG, Camolotto SA, Boespflug AM, Guillen KP, Foth M, Truong A, et al. Protective autophagy elicited by RAF→MEK→ERK inhibition suggests a treatment strategy for RAS-driven cancers. Nat Med. 2019;25:620–7.
8. Seton-Rogers S. Eliminating protective autophagy in KRAS-mutant cancers. Nat Rev Cancer. 2019;19:247.
9. Montenegro MF, Sánchez-del-Campo L, Fernández-Pérez MP, Sáez-Ayala M, Cabezas-Herrera J, Rodríguez-López JN. Targeting the epigenetic machinery of cancer cells. Oncogene. 2015;34:135–43.
10. Montenegro MF, González-Guerrero R, Sánchez-del-Campo L, Piñero-Madrona A, Cabezas-Herrera J, Rodríguez-López JN. Targeting the epigenetics of the DNA damage response in breast cancer. Cell Death Dis. 2016;7:e2180.
11. Montenegro MF, González-Guerrero R, Sánchez-Del-Campo L, Piñero-Madrona A, Cabezas-Herrera J, Rodríguez-López JN. PRMT1-dependent methylation of BRCA1 contributes to the epigenetic defense of breast cancer cells against ionizing radiation. Sci Rep. 2020;10:13275.
12. Montenegro MF, Sáez-Ayala M, Piñero-Madrona A, Cabezas-Herrera J, Rodríguez-López JN. Reactivation of the tumour suppressor RASSF1A in breast cancer by simultaneous targeting of DNA and E2F1 methylation. PLoS ONE. 2012;7:e52231.
13. Jeon M, Park J, Yang E, Baek HJ, Kim H. Regulation of autophagy by protein methylation and acetylation in cancer. J Cell Physiol. 2022;237:13–28.
14. Li J, Chen X, Kang R, Zeh H, Klionsky DJ, Tang D. Regulation and function of autophagy in pancreatic cancer. Autophagy. 2021;17:3275–96.

15. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy. 2016;12:1–222.
16. Bjørkøy G, Lamark T, Pankiv S, et al. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. Methods Enzymol. 2009;452:181–97.
17. Stanevich V, Jiang L, Satyshur KA, Li Y, Jeffrey PD, Li Z, et al. The structural basis for tight control of PP2A methylation and function by LCMT-1. Mol Cell. 2011;41:331–42.
18. Wong PM, Feng Y, Wang J, Shi R, Jiang X. Regulation of autophagy by coordinated action of mTORC1 and protein phosphatase 2A. Nat Commun. 2015;6:8048.
19. Hu Z, Sankar DS, Vu B, Leytens A, Vionnet C, Wu W, et al. ULK1 phosphorylation of striatin activates protein phosphatase 2A and autophagy. Cell Rep. 2021;36:109762.
20. Dossou AS, Basu A. The emerging roles of mTORC1 in macromanaging autophagy. Cancers (Basel). 2019;11:1422.
21. Perera RM, Stoykova S, Nicolay BN, Ross KN, Fitamant J, Boukhali M, et al. Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. Nature. 2015;524:361–5.
22. Martina JA, Puertollano R. Protein phosphatase 2A stimulates activation of TFEB and TFE3 transcription factors in response to oxidative stress. J Biol Chem. 2018;293:12525–34.
23. Slade L, Pulinilkunnil T. The MiTF/TFE family of transcription factors: master regulators of organelle signaling, metabolism, and stress adaptation. Mol Cancer Res. 2017;15:1637–43.
24. Li X, Chen Y, Gong S, Chen H, Liu H, Li X, Hao J. Emerging roles of TFE3 in metabolic regulation. Cell Death Discov. 2023;9:93.
25. Kuo YC, Huang KY, Yang CH, Yang YS, Lee WY, Chiang CW. Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. J Biol Chem. 2008;283:1882–92.
26. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. Nat Cell Biol. 2011;13:132–41.
27. Adams DG, Coffee RL Jr, Zhang H, Pelech S, Strack S, Wadzinski BE. Positive regulation of Raf1-MEK1/2-ERK1/2 signaling by protein serine/threonine phosphatase 2A holoenzymes. J Biol Chem. 2005;280:42644–54.
28. Boned Del Río I, Young LC, Sari S, Jones GG, Ringham-Terry B, Hartig N, et al. SHOC2 complex-driven RAF dimerization selectively contributes to ERK pathway dynamics. Proc Natl Acad Sci USA. 2019;116:13330–9.
29. Young LC, Hartig N, Boned Del Río I, Sari S, Ringham-Terry B, Wainwright JR, et al. SHOC2–MRAS–PP1 complex positively regulates RAF activity and contributes to Noonan syndrome pathogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 2018;115:E10576–85.
30. Rodriguez-Viciana P, Oses-Prieto J, Burlingame A, Fried M, McCormick F. A phosphatase holoenzyme comprised of Shoc2/Sur8 and the catalytic subunit of PP1 functions as an M-Ras effector to modulate Raf activity. Mol Cell. 2006;22:217–30.
31. Winter-Vann AM, Kamen BA, Bergo MO, Young SG, Melnyk S, James SJ, et al. Targeting Ras signaling through inhibition of carboxyl methylation: an unexpected property of methotrexate. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:6529–34.
32. Antonucci L, Fagman JB, Kim JY, Todoric J, Gukovsky I, Mackey M, et al. Basal autophagy maintains pancreatic acinar cell homeostasis and protein synthesis and prevents ER stress. Proc Natl Acad Sci USA. 2015;112:E6166–74.
33. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. EMBO Rep. 2006;7:880–5.
34. Lin SS, Bassik MC, Suh H, Nishino M, Arroyo JD, Hahn WC, et al. PP2A regulates BCL-2 phosphorylation and proteasome-mediated degradation at the endoplasmic reticulum. J Biol Chem. 2006;281:23003–12.
35. Blasco MT, Navas C, Martín-Serrano G, Graña-Castro O, Lechuga CG, Martín-Díaz L, et al. Complete regression of advanced pancreatic ductal adenocarcinomas upon combined inhibition of EGFR and C-RAF. Cancer Cell. 2019;35:573–87.
36. Blasco RB, Francoz S, Santamaría D, Cañamero M, Dubus P, Charron J, et al. c-Raf, but not B-Raf, is essential for development of K-Ras oncogene-driven non-small cell lung carcinoma. Cancer Cell. 2011;19:652–63.
37. Shin S, Buel GR, Wolgamott L, Plas DR, Asara JM, Blenis J, et al. ERK2 mediates metabolic stress response to regulate cell fate. Mol Cell. 2015;59:382–98.
38. Sáez-Ayala M, Montenegro MF, Sánchez-Del-Campo L, Fernández-Pérez MP, Chazarra S, Freter R, et al. Directed phenotype switching as an effective antimelanoma strategy. Cancer Cell. 2013;24:105–19.
39. Chauvistré H, Shannan B, Daignault-Mill SM, Ju RJ, Picard D, Egetemaier S, et al. Persister state-directed transitioning and vulnerability in melanoma. Nat Commun. 2022;13:3055.
40. Zachari M, Longo M, Ganley IG. Aberrant autophagosome formation occurs upon small molecule inhibition of ULK1 kinase activity. Life Sci Alliance. 2020;3:e202000815.
41. Sáez-Ayala M, Sánchez-del-Campo L, Montenegro MF, Chazarra S, Tárraga A, Cabezas-Herrera J, et al. Comparison of a pair of synthetic tea-catechin-derived epimers: synthesis, antifolate activity, and tyrosinase-mediated activation in melanoma. ChemMedChem. 2011;6:440–9.
42. Tolivia J, Navarro A, del Valle E, Perez C, Ordoñez C, Martínez E. Application of Photoshop and Scion Image analysis to quantification of signals in histochemistry, immunocytochemistry and hybridocytochemistry. Anal Quant Cytol Histol. 2006;28:43–53.
43. Fernández-Pérez MP, Montenegro MF, Sáez-Ayala M, Sánchez-del-Campo L, Piñero-Madrona A, Cabezas-Herrera J, et al. Suppression of antifolate resistance by targeting the myosin Va trafficking pathway in melanoma. Neoplasia. 2013;15:826–39.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Ministerio de Economia y Competitividad (MINECO; Co-financing with Fondos FEDER) (SAF2016-77241-R), the Fundación Séneca, the Región de Murcia (FS-RM) (20809/PI/18), and the ISPA (2022-073-INTRAMUR-MAPI). LSdC was contracted by the Ramon y Cajal Programme (RYC-2016-20036). RMD has a fellowship from Fundación Séneca, Región de Murcia (21407/FPI/20).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MFM and RM-D performed most experiments with the assistance of LS-d-C, JNR-L, and JC-H. JNR-L and MFM conceived the project and designed the experiments. AN and JT were in charge of performing and analyzing the electron microscopy experiments. JNR-L wrote the manuscript. All authors had the opportunity to discuss the results and comment on the manuscript.

## COMPETING INTERESTS

The University of Murcia holds a patent on the methods used to synthesize and the therapeutic uses of TMCG and the combination therapy with DIPY. The remaining authors declare no competing interests.

## ETHICS

The animals were bred and maintained according to the Spanish legislation on the 'Protection of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes' and in accordance with the directives of the European Community. All animal procedures were approved by the Ethics Committee of the University of Murcia and the Direccion General de Ganaderia y Pesca, Comunidad Autonoma de Murcia (Project reference A13151101).

## ADDITIONAL INFORMATION

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41419-023-06288-9.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to María F. Montenegro or José Neptuno Rodríguez-López.

**Reprints and permission information** is available at http://www.nature.com/reprints

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2023

**Full and uncropped western blots**

# Targeting protein methylation in pancreatic cancer cells results in KRAS signaling imbalance and inhibition of autophagy

**María F. Montenegro[1,4]✉, Román Martí-Díaz[1,4], Ana Navarro[2], Jorge Tolivia[2], Luis Sánchez-del-Campo[1], Juan Cabezas-Herrera[3], and José Neptuno Rodríguez-López[1]✉**

Fig. 1A

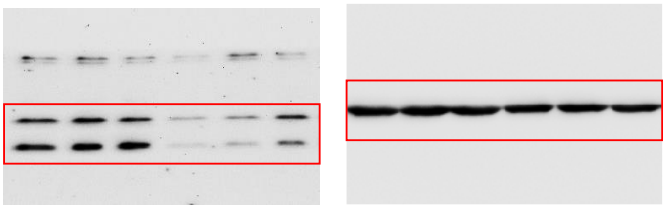



Fig. 1C

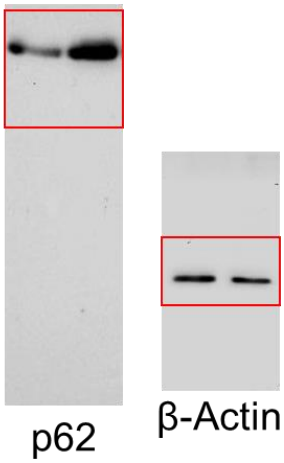



Fig. 1E

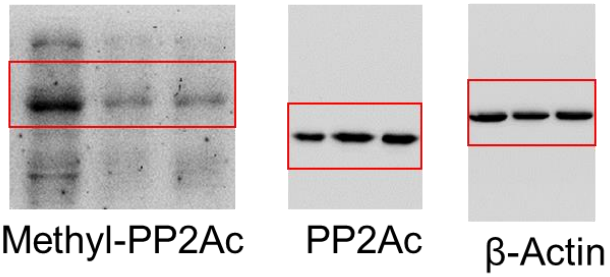
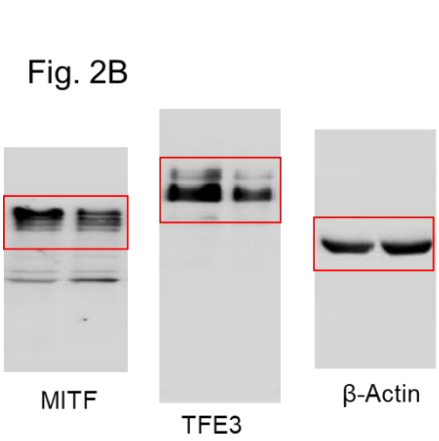



Fig. 2B



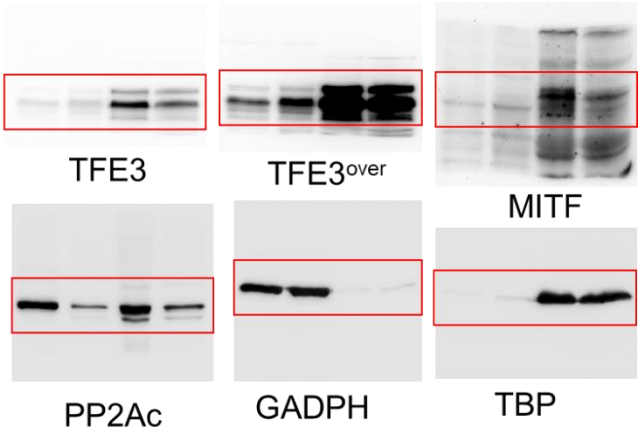



Fig. 2D

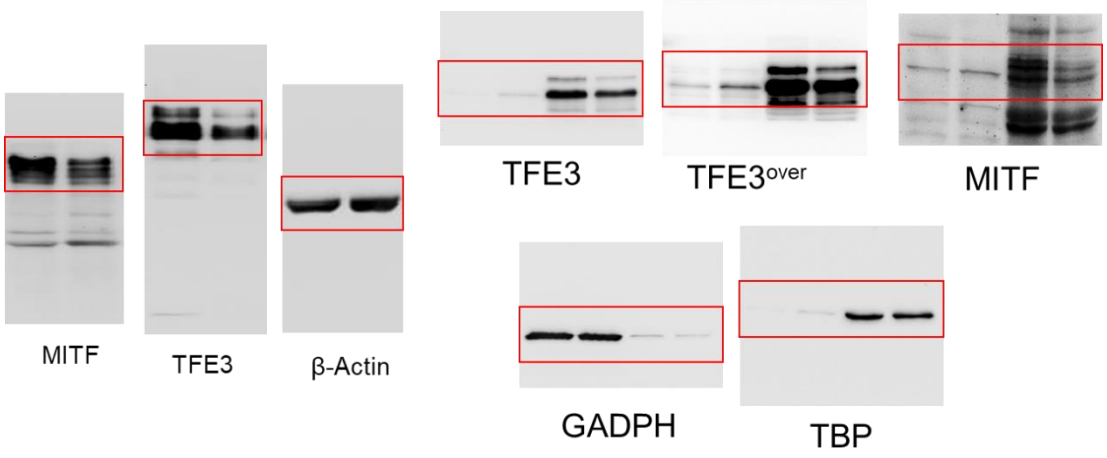



Fig. 2E

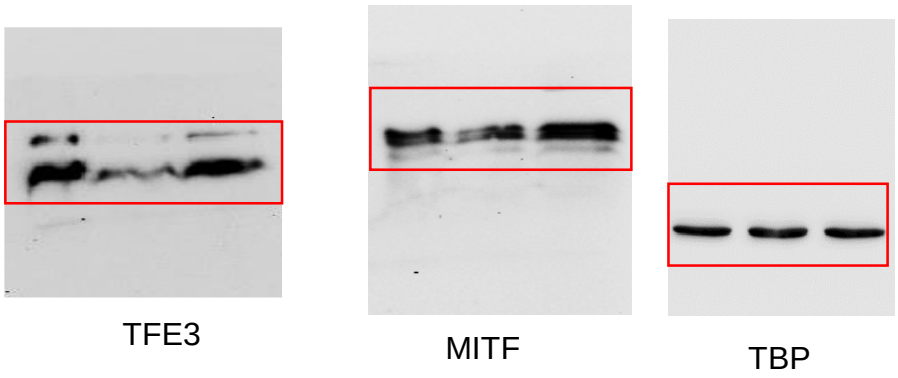



Fig. 2F

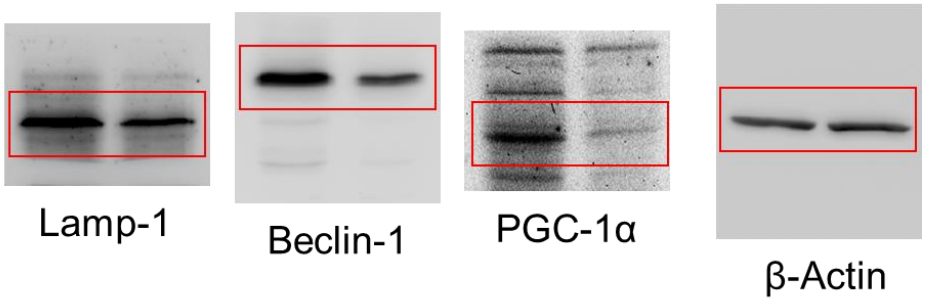
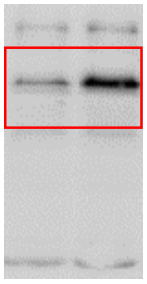


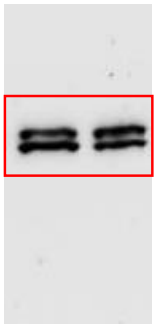
Fig. 3A



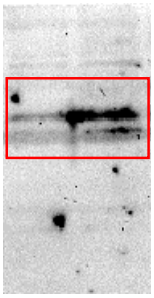
p-AKT (S473)



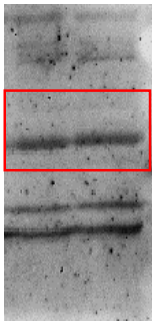
p-AKT (T308)



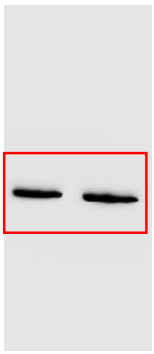
AKT



p-S6K (T389)



S6K



β-Actin

Fig. 3B

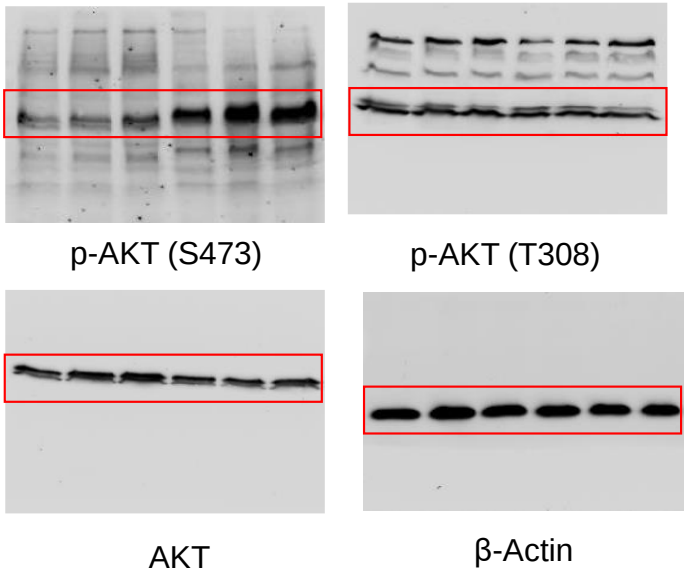

p-AKT (S473)
p-AKT (T308)
AKT
β-Actin

Fig. 3C

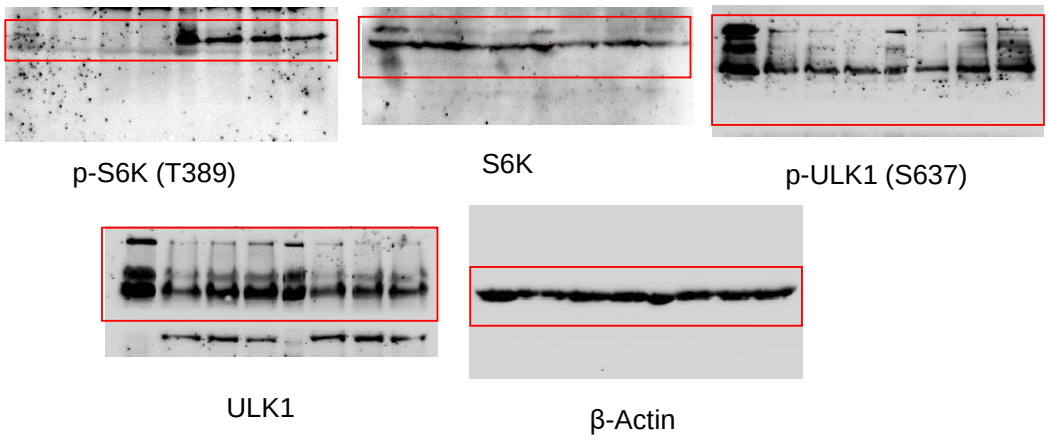

p-S6K (T389)
S6K
p-ULK1 (S637)
ULK1
β-Actin

Fig. 3D

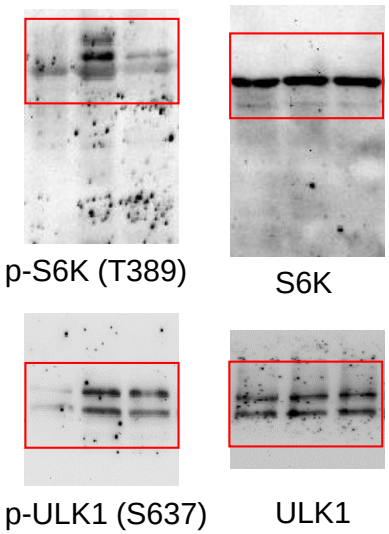



Fig. 4A

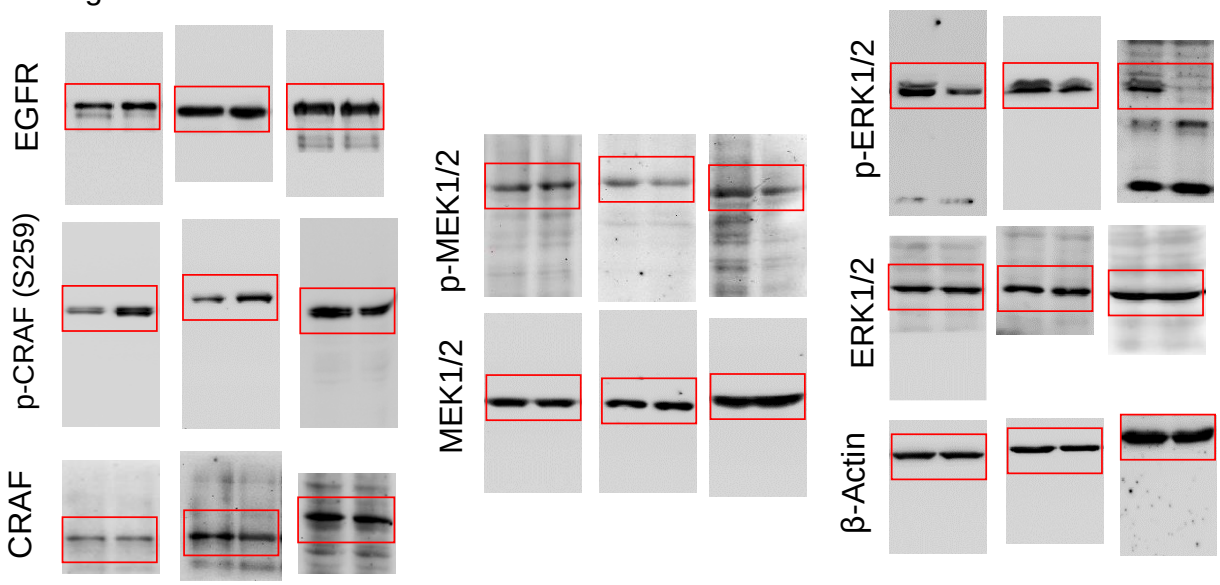



Fig. 4B

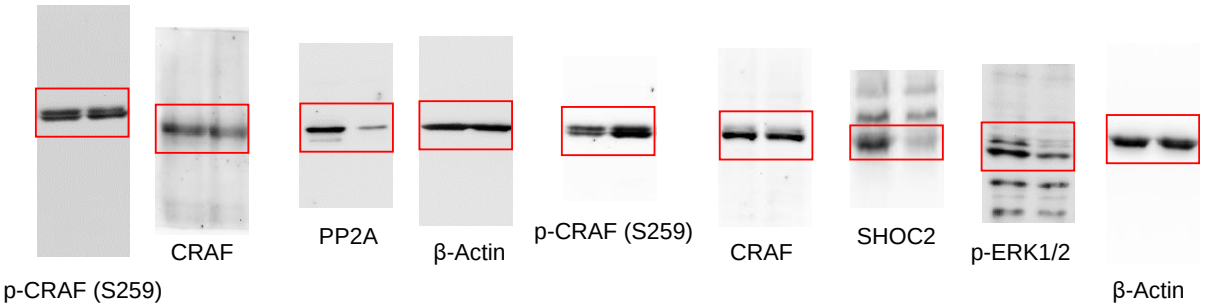


Fig. 4C

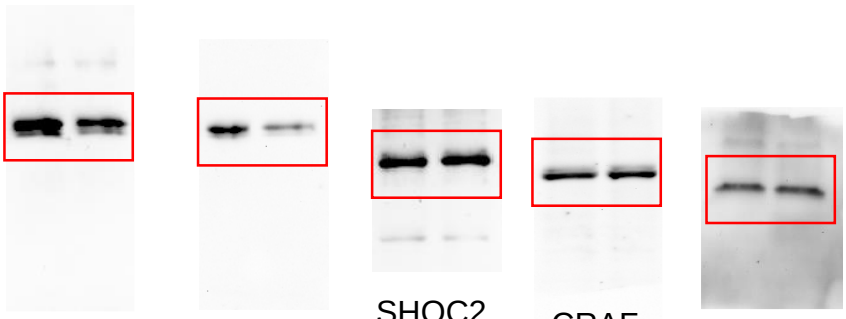



Fig. 4E

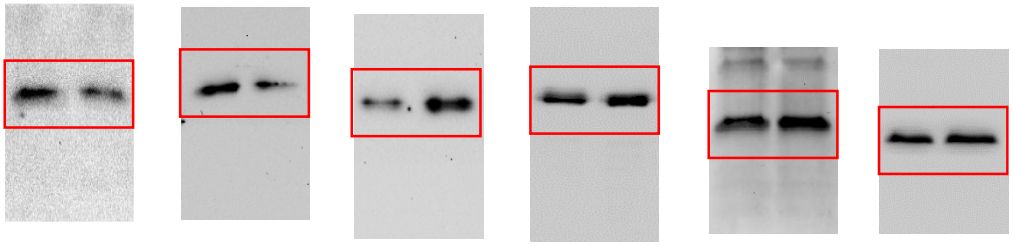



Fig. 4F

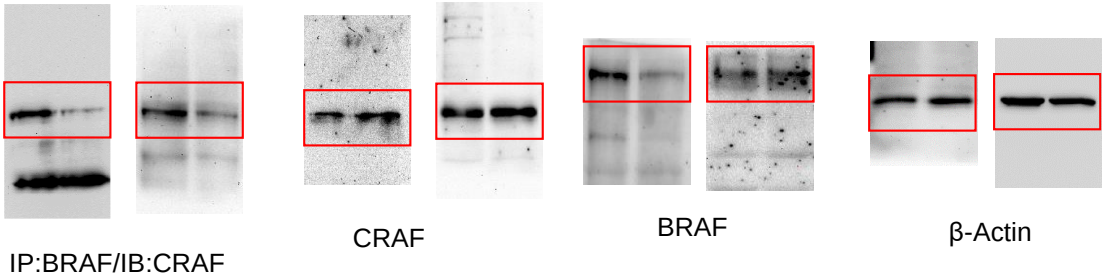


Fig. 4G

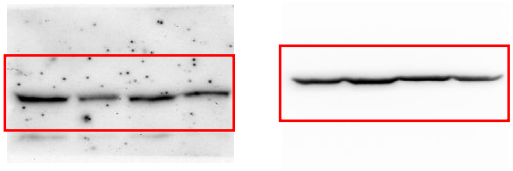



Fig. 5B

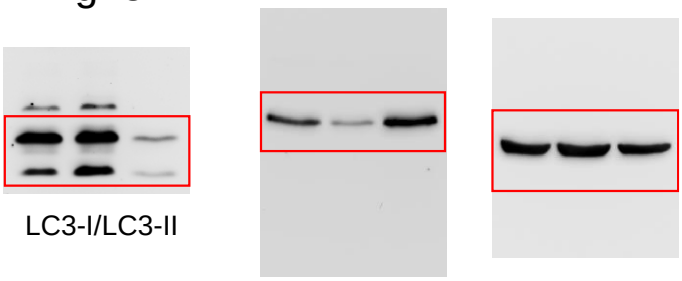



Fig. 5C

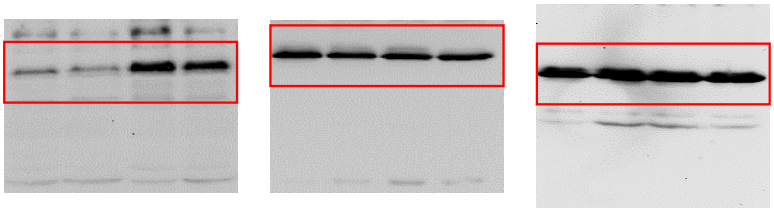
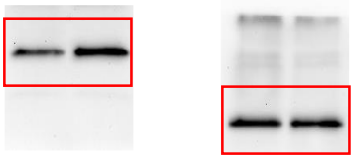
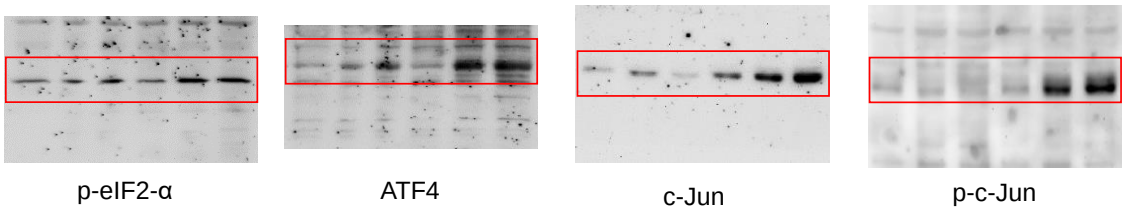


Fig. 5D

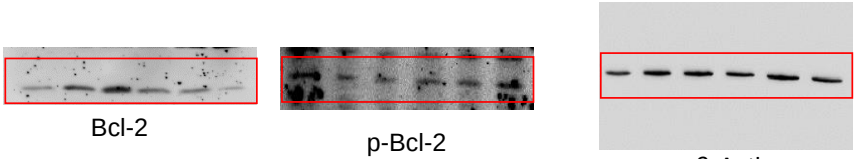


Active KRAS Total KRAS

Fig. 6C

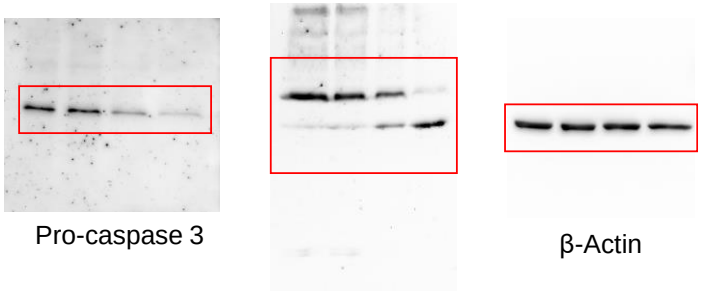


p-eIF2-α ATF4 c-Jun p-c-Jun



Bcl-2 p-Bcl-2 β-Actin

Fig. 6F



Pro-caspase 3 PARP β-Actin

# Capítulo 6

## Conclusiones

*«Cuanto más difícil es la victoria, mayor es la felicidad de ganar»*

Pelé

# CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

## 6.1. CONCLUSIONES

**1.** La acriflavina inhibe la dimerización de HIF-1 en el melanoma en condiciones de normoxia y afecta de forma diferencial a la expresión de sus dianas moleculares GLUT1, PDK1 y VEGF. Como consecuencia, el tratamiento con acriflavina provoca una disminución en la entrada y disponibilidad de la glucosa y la consecuente supresión del efecto Warburg.

**2.** La acriflavina inhibe la fosforilación de AKT y RSK2 bloqueando las respuestas necesarias para la supervivencia de las células de melanoma en condiciones de estrés mediante la reducción de la expresión de MITF y ATF4.

**3.** El tratamiento de las células de melanoma con acriflavina provoca daño en el ADN y muerte celular por apoptosis, lo que sugiere que la inhibición de HIF-1α en melanoma podría suponer una terapia efectiva, independientemente de las condiciones de hipoxia en el tumor.

**4.** Demostramos por primera vez que MITF regula de forma directa la expresión de ADAM10 en células de melanoma mediante su unión al promotor en la secuencia consenso CACGTG (E-box).

**5.** Nuestros resultados han identificado el papel clave de MITF en la muerte celular mediada por las células NK a través de la regulación de la expresión de la proteasa ADAM10, implicada en la presentación de los ligandos de NKG2D en la superficie de las células de melanoma.

**6.** Demostramos la doble función de MITF en la modulación de la respuesta inmune anti-melanoma: por un lado, activando la respuesta de los linfocitos T y, por otro lado, bloqueando la muerte celular mediada por las células NK.

**7.** El papel de MITF en la regulación de ADAM10 junto con su participación en la respuesta inmune contra el melanoma permiten proponer el uso de inhibidores específicos de ADAM10 como una estrategia novedosa complementaria a las actuales inmunoterapias.

**8.** El tratamiento hipometilante (HMT) conlleva una disminución de los niveles de metilación de proteínas, produciendo un desequilibrio en la señalización de KRAS en células de cáncer de páncreas, lo que provoca la inactivación parcial de la ruta MAPK y la sobreactivación de la ruta PI3K/AKT-mTORC1.

**9.** La disminución de la actividad de PP2A inducida por la combinación HMT provoca una alteración en la translocación al núcleo de los factores MiT/TFE y una disminución de la actividad de ULK1, necesarias para la activación de la autofagia en cáncer de páncreas.

**10.** El tratamiento de las células de cáncer de páncreas con HMT reduce la localización en membrana de MRAS alterando el complejo SHOC2 (SHOC2/MRAS/PP1) e impide la activación de CRAF.

**11.** Proponemos el control de la metilación de proteínas como una nueva estrategia frente al cáncer de páncreas en base a su capacidad de activar la respuesta a estrés del retículo endoplásmico y apoptosis, a la vez de inhibir la autofagia. Así, el tratamiento HMT podría evitar la plasticidad metabólica frente a condiciones de estrés, además de la patogénesis y la resistencia a inhibidores de la ruta KRAS en este tipo de cáncer.

## 6.2. CONCLUSIONS

**1.** Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization in melanoma under normoxic conditions and differentially affects the expression of its molecular targets GLUT1, PDK1 and VEGF. Consequently, acriflavine treatment leads to a reduction in glucose uptake and availability, resulting in the suppression of the Warburg effect.

**2.** Acriflavine inhibits AKT and RSK2 phosphorylation blocking responses necessary for melanoma cell survival under stress conditions by reducing MITF and ATF4 expression.

**3.** Treatment of melanoma cells with acriflavine results in DNA damage and apoptotic cell death, indicating that HIF-1α inhibition in melanoma may be an effective therapy regardless of hypoxic conditions in tumours.

**4.** We demonstrate for the first time that MITF regulates ADAM10 expression in melanoma cells by binding directly to the promoter at the CACGTG (E-box) consensus sequence.

**5.** Our results have identified the key role of MITF in NK cell-mediated cell death by controlling the expression of ADAM10, a protease involved in the presentation of NKG2D ligands on the surface of melanoma cells.

**6.** We reveal the dual function of MITF in modulating the anti-melanoma immune response. On the one hand, MITF can activate T lymphocyte responses, while on the other hand it can inhibit NK cell-mediated cell death.

**7.** The role of MITF in the regulation of ADAM10 together with its involvement in the immune response against melanoma allows us to propose the use of specific ADAM10 inhibitors as a novel complementary strategy to current immunotherapies.

**8.** Hypomethylating treatment (HMT) decreases protein methylation levels, which leads to an imbalance in KRAS signalling in pancreatic cancer cells, resulting in partial inactivation of the MAPK pathway and overactivation of the PI3K/AKT-mTORC1 pathway.

**9.** The decrease in PP2A activity induced by the HMT combination causes an alteration in the translocation to the nucleus of MiT/TFE factors and a decrease in ULK1 activity, which are necessary for the activation of autophagy in pancreatic cancer.

**10.** Treating pancreatic cancer cells with HMT reduces MRAS membrane localisation by disrupting the SHOC2 complex (SHOC2/MRAS/PP1) and prevents CRAF activation.

**11.** We propose the control of protein methylation as a new strategy against pancreatic cancer based on its ability to activate the endoplasmic reticulum stress response and apoptosis, while inhibiting autophagy. Thus, HMT treatment could prevent metabolic plasticity under stress conditions, as well as pathogenesis and resistance to KRAS pathway inhibitors in this type of cancer.

# Capítulo 7

Bibliografía

*«Sigue trabajando, sigue esforzándote, nunca te rindas; cae siete veces, levántate ocho. La comodidad es una amenaza mayor para el progreso que las dificultades»*

Denzel Washington

# CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Malek, Z. A., Swope, V. B., Starner, R. J., Koikov, L., Cassidy, P., & Leachman, S. (2014). Melanocortins and the melanocortin 1 receptor, moving translationally towards melanoma prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *563*, 4-12. https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.07.002

Ahmed, F., & Haass, N. K. (2018). Microenvironment-Driven Dynamic Heterogeneity and Phenotypic Plasticity as a Mechanism of Melanoma Therapy Resistance. *Frontiers in Oncology*, *8*, 173. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00173

Akincilar, S. C., Unal, B., & Tergaonkar, V. (2016). Reactivation of telomerase in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *73*(8), 1659-1670. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2146-9

Almåsbak, H., Aarvak, T., & Vemuri, M. C. (2016). CAR T Cell Therapy: A Game Changer in Cancer Treatment. *Journal of Immunology Research*, *2016*, 5474602. https://doi.org/10.1155/2016/5474602

Almuhaideb, A., Papathanasiou, N., & Bomanji, J. (2011). 18F-FDG PET/CT Imaging In Oncology. *Annals of Saudi Medicine*, *31*(1), 3-13. https://doi.org/10.4103/0256-4947.75771

Amaravadi, R. K., Lippincott-Schwartz, J., Yin, X. M., Weiss, W. A., Takebe, N., Timmer, W., DiPaola, R. S., Lotze, M. T., & White, E. (2011). Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *17*(4), 654-666. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2634

Anderson, M. E. (1998). Glutathione: An overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions*, *111-112*, 1-14. https://doi.org/10.1016/s0009-2797(97)00146-4

Andersson, E. R., & Lendahl, U. (2014). Therapeutic modulation of Notch signalling—Are we there yet? *Nature Reviews. Drug Discovery*, *13*(5), 357-378. https://doi.org/10.1038/nrd4252

Arnheiter, H. (2010). The discovery of the microphthalmia locus and its gene, Mitf. *Pigment cell & melanoma research*, *23*(6), 729-735. https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00759.x

Baeriswyl, V., & Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, *19*(5), 329-337. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.05.003

Bailey, P., Chang, D. K., Nones, K., Johns, A. L., Patch, A. M., Gingras, M. C., Miller, D. K., Christ, A. N., Bruxner, T. J. C., Quinn, M. C., Nourse, C., Murtaugh, L. C., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourbakhsh, E., Wani, S., Fink, L., Holmes, O., … Grimmond, S. M. (2016). Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*, *531*(7592), 47-52. https://doi.org/10.1038/nature16965

Balamurugan, K. (2016). HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *International Journal of Cancer*, 138(5), 1058-1066. https://doi.org/10.1002/ijc.29519

Ballantyne, A. D., & Garnock-Jones, K. P. (2013). Dabrafenib: First global approval. *Drugs*, *73*(12), 1367-1376. https://doi.org/10.1007/s40265-013-0095-2

Ballotti, R., Cheli, Y., & Bertolotto, C. (2020). The complex relationship between MITF and the immune system: A Melanoma ImmunoTherapy (response) Factor? *Molecular Cancer*, *19*(1), Article 1. https://doi.org/10.1186/s12943-020-01290-7

Bardeesy, N., Cheng, K. H., Berger, J. H., Chu, G. C., Pahler, J., Olson, P., Hezel, A. F., Horner, J., Lauwers, G. Y., Hanahan, D., & DePinho, R. A. (2006). Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes & Development*, *20*(22), 3130-3146. https://doi.org/10.1101/gad.1478706

Bauer, J., & Garbe, C. (2003). Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Research*, *16*(3), 297-306. https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00047.x

Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., & Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science (New York, N.Y.)*, *285*(5428), 727-729. https://doi.org/10.1126/science.285.5428.727

Baylin, S. B., & Jones, P. A. (2016). Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(9), a019505. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019505

Bemis, L. T., Chen, R., Amato, C. M., Classen, E. H., Robinson, S. E., Coffey, D. G., Erickson, P. F., Shellman, Y. G., & Robinson, W. A. (2008). MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines. *Cancer Research*, *68*(5), 1362-1368. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2912

Benavides, F. J., & Guénet, J. L. (2003). *Manual de genética de roedores de laboratorio: Principios básicos y aplicaciones.* Universidad de Alcalá, Madrid. https://secal.es/wp-content/uploads/2014/10/00-GENETICA-indice.pdf.pdf

Bennett, D. C. (1983). Differentiation in mouse melanoma cells: Initial reversibility and an on-off stochastic model. *Cell*, *34*(2), 445-453. https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90378-1

Bennett, D. C. (2016). Genetics of melanoma progression: The rise and fall of cell senescence. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *29*(2), 122-140. https://doi.org/10.1111/pcmr.12422

Berdasco, M., & Esteller, M. (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: How cellular identity goes awry. *Developmental Cell*, *19*(5), 698-711. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.005

Bertolotto, C., Lesueur, F., Giuliano, S., Strub, T., de Lichy, M., Bille, K., Dessen, P., d'Hayer, B., Mohamdi, H., Remenieras, A., Maubec, E., de la Fouchardière, A., Molinié, V., Vabres, P., Dalle, S., Poulalhon, N., Martin-Denavit, T., Thomas, L., Andry-Benzaquen, P., … Bressac-de

Paillerets, B. (2011). A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature*, *480*(7375), 94-98. https://doi.org/10.1038/nature10539

Bianchi-Smiraglia, A., Bagati, A., Fink, E. E., Moparthy, S., Wawrzyniak, J. A., Marvin, E. K., Battaglia, S., Jowdy, P., Kolesnikova, M., Foley, C. E., Berman, A. E., Kozlova, N. I., Lipchick, B. C., Paul-Rosner, L. M., Bshara, W., Ackroyd, J. J., Shewach, D. S., & Nikiforov, M. A. (2017). Microphthalmia-associated transcription factor suppresses invasion by reducing intracellular GTP pools. *Oncogene*, *36*(1), 84-96. https://doi.org/10.1038/onc.2016.178

Birch, J., & Gil, J. (2020). Senescence and the SASP: Many therapeutic avenues. *Genes & Development*, *34*(23-24), 1565-1576. https://doi.org/10.1101/gad.343129.120

Boedtkjer, E., & Pedersen, S. F. (2020). The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annual Review of Physiology*, *82*, 103-126. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034627

Bommareddy, P. K., Patel, A., Hossain, S., & Kaufman, H. L. (2017). Talimogene Laherparepvec (T-VEC) and Other Oncolytic Viruses for the Treatment of Melanoma. *American Journal of Clinical Dermatology*, *18*(1), 1-15. https://doi.org/10.1007/s40257-016-0238-9

Borroni, E. M., & Grizzi, F. (2021). Cancer Immunoediting and beyond in 2021. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(24), 13275. https://doi.org/10.3390/ijms222413275

Bose, S., Zhang, C., & Le, A. (2021). Glucose Metabolism in Cancer: The Warburg Effect and Beyond. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1311*, 3-15. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65768-0_1

Brunet, J. F., Denizot, F., Luciani, M. F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M. G., & Golstein, P. (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature*, *328*(6127), 267-270. https://doi.org/10.1038/328267a0

Bryant, K. L., Stalnecker, C. A., Zeitouni, D., Klomp, J. E., Peng, S., Tikunov, A. P., Gunda, V., Pierobon, M., Waters, A. M., George, S. D., Tomar, G., Papke, B., Hobbs, G. A., Yan, L., Hayes, T. K., Diehl, J. N., Goode, G. D., Chaika, N. V., Wang, Y., … Der, C. J. (2019). Combination of ERK and autophagy inhibition as a treatment approach for pancreatic cancer. *Nature Medicine*, *25*(4), 628-640. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0368-8

Buscail, L., Bournet, B., & Cordelier, P. (2020). Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *17*(3), 153-168. https://doi.org/10.1038/s41575-019-0245-4

Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *10*(6), 417-427. https://doi.org/10.1038/nrd3455

Carreira, S., Goodall, J., Aksan, I., La Rocca, S. A., Galibert, M.-D., Denat, L., Larue, L., & Goding, C. R. (2005). Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature*, *433*(7027), 764-769. https://doi.org/10.1038/nature03269

Carreira, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K. S., Testori, A., Larue, L., & Goding, C. R. (2006). Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes & Development*, *20*(24), 3426-3439. https://doi.org/10.1101/gad.406406

Carusillo, A., & Mussolino, C. (2020). DNA Damage: From Threat to Treatment. *Cells*, *9*(7), 1665. https://doi.org/10.3390/cells9071665

Cavuoto, P., & Fenech, M. F. (2012). A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer Treatment Reviews*, *38*(6), 726-736. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.01.004

Cellarier, E., Durando, X., Vasson, M. P., Farges, M. C., Demiden, A., Maurizis, J. C., Madelmont, J. C., & Chollet, P. (2003). Methionine dependency and cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews*, *29*(6), 489-499. https://doi.org/10.1016/s0305-7372(03)00118-x

Chaffer, C. L., Thompson, E. W., & Williams, E. D. (2007). Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells, Tissues, Organs*, *185*(1-3), 7-19. https://doi.org/10.1159/000101298

Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., Jouary, T., Schadendorf, D., Ribas, A., O'Day, S. J., Sosman, J. A., Kirkwood, J. M., … BRIM-3 Study Group. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England Journal of Medicine*, *364*(26), 2507-2516. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782

Cheli, Y., Ohanna, M., Ballotti, R., & Bertolotto, C. (2010). Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *23*(1), 27-40. https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00653.x

Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*, *39*(1), 1-10. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012

Chin, L., Artandi, S. E., Shen, Q., Tam, A., Lee, S. L., Gottlieb, G. J., Greider, C. W., & DePinho, R. A. (1999). P53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell*, *97*(4), 527-538. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80762-x

Choi, S. R., Yang, Y., Huang, K. Y., Kong, H. J., Flick, M. J., & Han, B. (2020). Engineering of biomaterials for tumor modeling. *Materials Today. Advances*, *8*, 100117. https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2020.100117

Clark, W. H., Elder, D. E., Guerry, D., Epstein, M. N., Greene, M. H., & Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathology*, *15*(12), 1147-1165. https://doi.org/10.1016/s0046-8177(84)80310-x

Coe, E. A., Tan, J. Y., Shapiro, M., Louphrasitthiphol, P., Bassett, A. R., Marques, A. C., Goding, C. R., & Vance, K. W. (2019). The MITF-SOX10 regulated long non-coding RNA DIRC3 is a melanoma tumour suppressor. *PLoS Genetics*, *15*(12), e1008501. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008501

Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J. L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardière, C., Bennouna, J., Bachet, J. B., Khemissa-Akouz, F., Péré-Vergé, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., … PRODIGE Intergroup. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, *364*(19), 1817-1825. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1011923

Conroy, T., Hammel, P., Hebbar, M., Ben Abdelghani, M., Wei, A. C., Raoul, J. L., Choné, L., Francois, E., Artru, P., Biagi, J. J., Lecomte, T., Assenat, E., Faroux, R., Ychou, M., Volet, J., Sauvanet, A., Breysacher, G., Di Fiore, F., Cripps, C., … Canadian Cancer Trials Group and the Unicancer-GI–PRODIGE Group. (2018). FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *379*(25), 2395-2406. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809775

Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P., & Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: At the core of cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, *14*(2), 135-146. https://doi.org/10.1038/nrc3670

Cox, A. D., Der, C. J., & Philips, M. R. (2015). Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery? *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *21*(8), 1819-1827. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3214

Cui, R., Widlund, H. R., Feige, E., Lin, J. Y., Wilensky, D. L., Igras, V. E., D'Orazio, J., Fung, C. Y., Schanbacher, C. F., Granter, S. R., & Fisher, D. E. (2007). Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell*, *128*(5), 853-864. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.045

Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*(1), 49-63. https://doi.org/10.1038/nrm3722

Damgaci, S., Ibrahim-Hashim, A., Enriquez-Navas, P. M., Pilon-Thomas, S., Guvenis, A., & Gillies, R. J. (2018). Hypoxia and acidosis: Immune suppressors and therapeutic targets. *Immunology*, *154*(3), 354-362. https://doi.org/10.1111/imm.12917

Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., … Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, *417*(6892), 949-954. https://doi.org/10.1038/nature00766

Davis, E. J., Johnson, D. B., Sosman, J. A., & Chandra, S. (2018). Melanoma: What do all the mutations mean? *Cancer*, *124*(17), 3490-3499. https://doi.org/10.1002/cncr.31345

Debnath, P., Huirem, R. S., Dutta, P., & Palchaudhuri, S. (2021). Epithelial–mesenchymal transition and its transcription factors. *Bioscience Reports*, *42*(1), BSR20211754. https://doi.org/10.1042/BSR20211754

Degenhardt, K., Chen, G., Lindsten, T., & White, E. (2002). BAX and BAK mediate p53-independent suppression of tumorigenesis. *Cancer Cell*, *2*(3), 193-203. https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00126-5

DeNardo, D. G., Andreu, P., & Coussens, L. M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Reviews*, *29*(2), 309-316. https://doi.org/10.1007/s10555-010-9223-6

Dessinioti, C., & Stratigos, A. J. (2022). An Epidemiological Update on Indoor Tanning and the Risk of Skin Cancers. *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, *29*(11), 8886-8903. https://doi.org/10.3390/curroncol29110699

Dhatchinamoorthy, K., Colbert, J. D., & Rock, K. L. (2021). Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Frontiers in Immunology*, *12*, 636568. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.636568

Didona, D., Paolino, G., Bottoni, U., & Cantisani, C. (2018). Non Melanoma Skin Cancer Pathogenesis Overview. *Biomedicines*, *6*(1), 6. https://doi.org/10.3390/biomedicines6010006

Dillekås, H., Rogers, M. S., & Straume, O. (2019). Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Medicine*, *8*(12), 5574-5576. https://doi.org/10.1002/cam4.2474

Dodig, S., Čepelak, I., & Pavić, I. (2019). Hallmarks of senescence and aging. *Biochemia Medica*, *29*(3), 030501. https://doi.org/10.11613/BM.2019.030501

Domingues, B., Lopes, J. M., Soares, P., & Pópulo, H. (2018). Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and Therapy*, *7*, 35-49. https://doi.org/10.2147/ITT.S134842

Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *20*(2), 69-84. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4

Donizy, P., Zietek, M., Leskiewicz, M., Halon, A., & Matkowski, R. (2015). High Percentage of ADAM-10 Positive Melanoma Cells Correlates with Paucity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes

but Does Not Predict Prognosis in Cutaneous Melanoma Patients. *Analytical Cellular Pathology (Amsterdam)*, *2015*, 975436. https://doi.org/10.1155/2015/975436

Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, *3*(1), 11-22. https://doi.org/10.1038/nrc969

Drosten, M., & Barbacid, M. (2020). Targeting the MAPK Pathway in KRAS-Driven Tumors. *Cancer Cell*, *37*(4), 543-550. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.013

Drozdowski, R., Spaccarelli, N., Peters, M. S., & Grant-Kels, J. M. (2023). Dysplastic nevus part I: Historical perspective, classification, and epidemiology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *88*(1), 1-10. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2022.04.068

Duan, S., Guo, W., Xu, Z., He, Y., Liang, C., Mo, Y., Wang, Y., Xiong, F., Guo, C., Li, Y., Li, X., Li, G., Zeng, Z., Xiong, W., & Wang, F. (2019). Natural killer group 2D receptor and its ligands in cancer immune escape. *Molecular Cancer*, *18*(1), 29. https://doi.org/10.1186/s12943-019-0956-8

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, *3*(11), 991-998. https://doi.org/10.1038/ni1102-991

Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, *21*(2), 137-148. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017

Durrant, D. E., & Morrison, D. K. (2018). Targeting the Raf kinases in human cancer: The Raf dimer dilemma. *British Journal of Cancer*, *118*(1), 3-8. https://doi.org/10.1038/bjc.2017.399

Dvorak, H. F. (2019). Tumors: Wounds That Do Not Heal-A Historical Perspective with a Focus on the Fundamental Roles of Increased Vascular Permeability and Clotting. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, *45*(6), 576-592. https://doi.org/10.1055/s-0039-1687908

Dzutsev, A., Badger, J. H., Perez-Chanona, E., Roy, S., Salcedo, R., Smith, C. K., & Trinchieri, G. (2017). Microbes and Cancer. *Annual Review of Immunology*, *35*, 199-228. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052133

Ellis, C., Ramzy, A., & Kieffer, T. J. (2017). Regenerative medicine and cell-based approaches to restore pancreatic function. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *14*(10), 612-628. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.93

Faget, D. V., Ren, Q., & Stewart, S. A. (2019). Unmasking senescence: Context-dependent effects of SASP in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *19*(8), 439-453. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0156-2

Falletta, P., Sanchez-Del-Campo, L., Chauhan, J., Effern, M., Kenyon, A., Kershaw, C. J., Siddaway, R., Lisle, R., Freter, R., Daniels, M. J., Lu, X., Tüting, T., Middleton, M., Buffa, F.

M., Willis, A. E., Pavitt, G., Ronai, Z. A., Sauka-Spengler, T., Hölzel, M., & Goding, C. R. (2017). Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. *Genes & Development*, *31*(1), 18-33. https://doi.org/10.1101/gad.290940.116

Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: A hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), 28. https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x

Fedorenko, I. V., Gibney, G. T., & Smalley, K. S. M. (2013). NRAS mutant melanoma: Biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene*, *32*(25), 3009-3018. https://doi.org/10.1038/onc.2012.453

Feige, E., Yokoyama, S., Levy, C., Khaled, M., Igras, V., Lin, R. J., Lee, S., Widlund, H. R., Granter, S. R., Kung, A. L., & Fisher, D. E. (2011). Hypoxia-induced transcriptional repression of the melanoma-associated oncogene MITF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(43), E924-933. https://doi.org/10.1073/pnas.1106351108

Ferguson, J., Smith, M., Zudaire, I., Wellbrock, C., & Arozarena, I. (2017). Glucose availability controls ATF4-mediated MITF suppression to drive melanoma cell growth. *Oncotarget*, *8*(20), 32946-32959. https://doi.org/10.18632/oncotarget.16514

Ferrari de Andrade, L., Tay, R. E., Pan, D., Luoma, A. M., Ito, Y., Badrinath, S., Tsoucas, D., Franz, B., May, K. F., Harvey, C. J., Kobold, S., Pyrdol, J. W., Yoon, C., Yuan, G. C., Hodi, F. S., Dranoff, G., & Wucherpfennig, K. W. (2018). Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. *Science (New York, N.Y.)*, *359*(6383), 1537-1542. https://doi.org/10.1126/science.aao0505

Fidler, I. J., Gruys, E., Cifone, M. A., Barnes, Z., & Bucana, C. (1981). Demonstration of multiple phenotypic diversity in a murine melanoma of recent origin. *Journal of the National Cancer Institute*, *67*(4), 947-956.

Fink, C., & Haenssle, H. A. (2017). Non-invasive tools for the diagnosis of cutaneous melanoma. *Skin Research and Technology: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, *23*(3), 261-271. https://doi.org/10.1111/srt.12350

Flaherty, K. T. (2012). Targeting metastatic melanoma. *Annual Review of Medicine*, *63*, 171-183. https://doi.org/10.1146/annurev-med-050410-105655

Flaherty, K. T., Infante, J. R., Daud, A., Gonzalez, R., Kefford, R. F., Sosman, J., Hamid, O., Schuchter, L., Cebon, J., Ibrahim, N., Kudchadkar, R., Burris, H. A., Falchook, G., Algazi, A., Lewis, K., Long, G. V., Puzanov, I., Lebowitz, P., Singh, A., … Weber, J. (2012). Combined

BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *The New England Journal of Medicine*, *367*(18), 1694-1703. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1210093

Flaherty, K. T., Robert, C., Hersey, P., Nathan, P., Garbe, C., Milhem, M., Demidov, L. V., Hassel, J. C., Rutkowski, P., Mohr, P., Dummer, R., Trefzer, U., Larkin, J. M. G., Utikal, J., Dreno, B., Nyakas, M., Middleton, M. R., Becker, J. C., Casey, M., … METRIC Study Group. (2012). Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *The New England Journal of Medicine*, *367*(2), 107-114. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203421

Flockhart, R. J., Webster, D. E., Qu, K., Mascarenhas, N., Kovalski, J., Kretz, M., & Khavari, P. A. (2012). BRAFV600E remodels the melanocyte transcriptome and induces BANCR to regulate melanoma cell migration. *Genome Research*, *22*(6), 1006-1014. https://doi.org/10.1101/gr.140061.112

Friedberg, E. C. (2003). DNA damage and repair. *Nature*, *421*(6921), 436-440. https://doi.org/10.1038/nature01408

Friedman, R. J., Rigel, D. S., & Kopf, A. W. (1985). Early detection of malignant melanoma: The role of physician examination and self-examination of the skin. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *35*(3), 130-151. https://doi.org/10.3322/canjclin.35.3.130

Gameiro, P. A., & Struhl, K. (2018). Nutrient Deprivation Elicits a Transcriptional and Translational Inflammatory Response Coupled to Decreased Protein Synthesis. *Cell Reports*, *24*(6), 1415-1424. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.021

Gangemi, R., Amaro, A., Gino, A., Barisione, G., Fabbi, M., Pfeffer, U., Brizzolara, A., Queirolo, P., Salvi, S., Boccardo, S., Gualco, M., Spagnolo, F., Jager, M. J., Mosci, C., Rossello, A., & Ferrini, S. (2014). ADAM10 correlates with uveal melanoma metastasis and promotes in vitro invasion. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *27*(6), 1138-1148. https://doi.org/10.1111/pcmr.12306

Garbe, C., & Leiter, U. (2009). Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in Dermatology*, *27*(1), 3-9. https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.09.001

Garber, J. E., & Offit, K. (2005). Hereditary cancer predisposition syndromes. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *23*(2), 276-292. https://doi.org/10.1200/JCO.2005.10.042

Garibyan, L., & Fisher, D. E. (2010). How sunlight causes melanoma. *Current Oncology Reports*, *12*(5), 319-326. https://doi.org/10.1007/s11912-010-0119-y

Giacinti, C., & Giordano, A. (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene*, *25*(38), 5220-5227. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209615

Giuliano, S., Cheli, Y., Ohanna, M., Bonet, C., Beuret, L., Bille, K., Loubat, A., Hofman, V., Hofman, P., Ponzio, G., Bahadoran, P., Ballotti, R., & Bertolotto, C. (2010). Microphthalmia-

associated transcription factor controls the DNA damage response and a lineage-specific senescence program in melanomas. *Cancer Research*, *70*(9), 3813-3822. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2913

Goding, C. R., & Arnheiter, H. (2019). MITF-the first 25 years. *Genes & Development*, *33*(15-16), 983-1007. https://doi.org/10.1101/gad.324657.119

Goodall, J., Carreira, S., Denat, L., Kobi, D., Davidson, I., Nuciforo, P., Sturm, R. A., Larue, L., & Goding, C. R. (2008). Brn-2 represses microphthalmia-associated transcription factor expression and marks a distinct subpopulation of microphthalmia-associated transcription factor-negative melanoma cells. *Cancer Research*, *68*(19), 7788-7794. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1053

Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., … Demaria, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, *179*(4), 813-827. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005

Grant, T. J., Hua, K., & Singh, A. (2016). Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *144*, 241-275. https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.09.008

Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., & Spies, T. (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(22), 12445-12450. https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12445

Groot, V. P., Rezaee, N., Wu, W., Cameron, J. L., Fishman, E. K., Hruban, R. H., Weiss, M. J., Zheng, L., Wolfgang, C. L., & He, J. (2018). Patterns, Timing, and Predictors of Recurrence Following Pancreatectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Annals of Surgery*, *267*(5), 936-945. https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000002234

Guo, J. Y., & White, E. (2016). Autophagy, Metabolism, and Cancer. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *81*, 73-78. https://doi.org/10.1101/sqb.2016.81.030981

Guo, J., Zhang, J. F., Wang, W. M., Cheung, F. W., Lu, Y., Ng, C., Kung, H., & Liu, W. (2014). MicroRNA-218 inhibits melanogenesis by directly suppressing microphthalmia-associated transcription factor expression. *RNA Biology*, *11*(6), 732-741. https://doi.org/10.4161/rna.28865

Guo, W., Wang, H., & Li, C. (2021). Signal pathways of melanoma and targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 424. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00827-6

Gupta, R., Janostiak, R., & Wajapeyee, N. (2020). Transcriptional regulators and alterations that drive melanoma initiation and progression. *Oncogene*, *39*(48), 7093-7105. https://doi.org/10.1038/s41388-020-01490-x

Haflidadóttir, B. S., Bergsteinsdóttir, K., Praetorius, C., & Steingrímsson, E. (2010). miR-148 Regulates Mitf in Melanoma Cells. *PLoS ONE*, *5*(7), e11574. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011574

Halbrook, C. J., Lyssiotis, C. A., Pasca di Magliano, M., & Maitra, A. (2023). Pancreatic cancer: Advances and challenges. *Cell*, *186*(8), 1729-1754. https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.02.014

Han, S., Ren, Y., He, W., Liu, H., Zhi, Z., Zhu, X., Yang, T., Rong, Y., Ma, B., Purwin, T. J., Ouyang, Z., Li, C., Wang, X., Wang, X., Yang, H., Zheng, Y., Aplin, A. E., Liu, J., & Shao, Y. (2018). Publisher Correction: ERK-mediated phosphorylation regulates SOX10 sumoylation and targets expression in mutant BRAF melanoma. *Nature Communications*, *9*(1), 1404. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03710-1

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31-46. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Hauseman, Z. J., Fodor, M., Dhembi, A., Viscomi, J., Egli, D., Bleu, M., Katz, S., Park, E., Jang, D. M., Porter, K. A., Meili, F., Guo, H., Kerr, G., Mollé, S., Velez-Vega, C., Beyer, K. S., Galli, G. G., Maira, S.-M., Stams, T., … King, D. A. (2022). Structure of the MRAS-SHOC2-PP1C phosphatase complex. *Nature*, *609*(7926), 416-423. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05086-1

Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry. Biokhimiia*, *62*(11), 1180-1190.

Helmink, B. A., Khan, M. A. W., Hermann, A., Gopalakrishnan, V., & Wargo, J. A. (2019). The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nature Medicine*, *25*(3), 377-388. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0377-7

Hemesath, T. J., Price, E. R., Takemoto, C., Badalian, T., & Fisher, D. E. (1998). MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature*, *391*(6664), 298-301. https://doi.org/10.1038/34681

Hemesath, T. J., Steingrímsson, E., McGill, G., Hansen, M. J., Vaught, J., Hodgkinson, C. A., Arnheiter, H., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Fisher, D. E. (1994). Microphthalmia, a critical

factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. *Genes & Development*, *8*(22), 2770-2780. https://doi.org/10.1101/gad.8.22.2770

Hezel, A. F., & Bardeesy, N. (2008). LKB1; linking cell structure and tumor suppression. *Oncogene*, *27*(55), 6908-6919. https://doi.org/10.1038/onc.2008.342

Hida, T., Kamiya, T., Kawakami, A., Ogino, J., Sohma, H., Uhara, H., & Jimbow, K. (2020). Elucidation of Melanogenesis Cascade for Identifying Pathophysiology and Therapeutic Approach of Pigmentary Disorders and Melanoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 6129. https://doi.org/10.3390/ijms21176129

Hodgkinson, C. A., Moore, K. J., Nakayama, A., Steingrímsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Arnheiter, H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*, *74*(2), 395-404. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90429-t

Hodi, F. S., Corless, C. L., Giobbie-Hurder, A., Fletcher, J. A., Zhu, M., Marino-Enriquez, A., Friedlander, P., Gonzalez, R., Weber, J. S., Gajewski, T. F., O'Day, S. J., Kim, K. B., Lawrence, D., Flaherty, K. T., Luke, J. J., Collichio, F. A., Ernstoff, M. S., Heinrich, M. C., Beadling, C., … Fisher, D. E. (2013). Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *31*(26), 3182-3190. https://doi.org/10.1200/JCO.2012.47.7836

Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, *411*(6835), 366-374. https://doi.org/10.1038/35077232

Hoek, K. S., & Goding, C. R. (2010). Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *23*(6), 746-759. https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00757.x

Hoffman, E. A., Frey, B. L., Smith, L. M., & Auble, D. T. (2015). Formaldehyde crosslinking: A tool for the study of chromatin complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(44), 26404-26411. https://doi.org/10.1074/jbc.R115.651679

Huber, V., Camisaschi, C., Berzi, A., Ferro, S., Lugini, L., Triulzi, T., Tuccitto, A., Tagliabue, E., Castelli, C., & Rivoltini, L. (2017). Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation. *Seminars in Cancer Biology*, *43*, 74-89. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.03.001

Hughes, A. E., Newton, V. E., Liu, X. Z., & Read, A. P. (1994). A gene for Waardenburg syndrome type 2 maps close to the human homologue of the microphthalmia gene at chromosome 3p12-p14.1. *Nature Genetics*, *7*(4), 509-512. https://doi.org/10.1038/ng0894-509

Ince, F. A., Shariev, A., & Dixon, K. (2022). PTEN as a target in melanoma. *Journal of Clinical Pathology*, jclinpath-2021-208008. https://doi.org/10.1136/jclinpath-2021-208008

Iyer, M. K., Niknafs, Y. S., Malik, R., Singhal, U., Sahu, A., Hosono, Y., Barrette, T. R., Prensner, J. R., Evans, J. R., Zhao, S., Poliakov, A., Cao, X., Dhanasekaran, S. M., Wu, Y.-M., Robinson, D. R., Beer, D. G., Feng, F. Y., Iyer, H. K., & Chinnaiyan, A. M. (2015). The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nature Genetics*, *47*(3), 199-208. https://doi.org/10.1038/ng.3192

Jackson, H. J., Rafiq, S., & Brentjens, R. J. (2016). Driving CAR T-cells forward. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *13*(6), 370-383. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.36

Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, *461*(7267), 1071-1078. https://doi.org/10.1038/nature08467

Jafari Nivlouei, S., Soltani, M., Carvalho, J., Travasso, R., Salimpour, M. R., & Shirani, E. (2021). Multiscale modeling of tumor growth and angiogenesis: Evaluation of tumor-targeted therapy. *PLoS Computational Biology*, *17*(6), e1009081. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009081

Jassim, A., Rahrmann, E. P., Simons, B. D., & Gilbertson, R. J. (2023). Cancers make their own luck: Theories of cancer origins. *Nature Reviews. Cancer*. https://doi.org/10.1038/s41568-023-00602-5

Javelaud, D., Alexaki, V. I., Pierrat, M. J., Hoek, K. S., Dennler, S., Van Kempen, L., Bertolotto, C., Ballotti, R., Saule, S., Delmas, V., & Mauviel, A. (2011). GLI2 and M-MITF transcription factors control exclusive gene expression programs and inversely regulate invasion in human melanoma cells. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *24*(5), 932-943. https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2011.00893.x

Jiang, S., Fagman, J. B., Ma, Y., Liu, J., Vihav, C., Engstrom, C., Liu, B., & Chen, C. (2022). A comprehensive review of pancreatic cancer and its therapeutic challenges. *Aging*, *14*(18), 7635-7649. https://doi.org/10.18632/aging.204310

Jiang, Y., Chen, M., Nie, H., & Yuan, Y. (2019). PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: Clinical implications and future considerations. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *15*(5), 1111-1122. https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1571892

Jones, A. B., Rocco, A., Lamb, L. S., Friedman, G. K., & Hjelmeland, A. B. (2022). Regulation of NKG2D Stress Ligands and Its Relevance in Cancer Progression. *Cancers*, *14*(9), 2339. https://doi.org/10.3390/cancers14092339

Jones, G. (2018). *The SHOC2 phosphatase complex as a therapeutic target for ERK pathway inhibition in RAS-driven tumors.* [Tesis de Doctorado, University College London]. https://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/10060157/

Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, *128*(4), 683-692. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.029

Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., Hong, S.-M., Fu, B., Lin, M. T., Calhoun, E. S., Kamiyama, M., Walter, K., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Hartigan, J., … Kinzler, K. W. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science (New York, N.Y.)*, *321*(5897), 1801-1806. https://doi.org/10.1126/science.1164368

Kaiser, B. K., Yim, D., Chow, I.-T., Gonzalez, S., Dai, Z., Mann, H. H., Strong, R. K., Groh, V., & Spies, T. (2007). Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature*, *447*(7143), 482-486. https://doi.org/10.1038/nature05768

Katada, S., Imhof, A., & Sassone-Corsi, P. (2012). Connecting threads: Epigenetics and metabolism. *Cell*, *148*(1-2), 24-28. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.001

Kaufman, C. K., Mosimann, C., Fan, Z. P., Yang, S., Thomas, A. J., Ablain, J., Tan, J. L., Fogley, R. D., van Rooijen, E., Hagedorn, E. J., Ciarlo, C., White, R. M., Matos, D. A., Puller, A.-C., Santoriello, C., Liao, E. C., Young, R. A., & Zon, L. I. (2016). A zebrafish melanoma model reveals emergence of neural crest identity during melanoma initiation. *Science (New York, N.Y.)*, *351*(6272), aad2197. https://doi.org/10.1126/science.aad2197

Kaufman, H. L., Kohlhapp, F. J., & Zloza, A. (2015). Oncolytic viruses: A new class of immunotherapy drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *14*(9), 642-662. https://doi.org/10.1038/nrd4663

Kawakami, A., & Fisher, D. E. (2017). The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *97*(6), 649-656. https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.9

Kawata, M., Koinuma, D., Ogami, T., Umezawa, K., Iwata, C., Watabe, T., & Miyazono, K. (2012). TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Biochemistry*, *151*(2), 205-216. https://doi.org/10.1093/jb/mvr136

Kersemans, V., Cornelissen, B., Allen, P. D., Beech, J. S., & Smart, S. C. (2013). Subcutaneous tumor volume measurement in the awake, manually restrained mouse using MRI. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI*, *37*(6), 1499-1504. https://doi.org/10.1002/jmri.23829

Khoo, K. H., Verma, C. S., & Lane, D. P. (2014). Drugging the p53 pathway: Understanding the route to clinical efficacy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *13*(3), 217-236. https://doi.org/10.1038/nrd4236

Kida, H., Ihara, S., & Kumanogoh, A. (2013). Involvement of STAT3 in immune evasion during lung tumorigenesis. *Oncoimmunology*, *2*(1), e22653. https://doi.org/10.4161/onci.22653

Kim, J., & Bae, J.-S. (2016). Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediators of Inflammation*, *2016*, 6058147. https://doi.org/10.1155/2016/6058147

Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S., & Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, *362*(6423), 841-844. https://doi.org/10.1038/362841a0

Kim, M. P., Li, X., Deng, J., Zhang, Y., Dai, B., Allton, K. L., Hughes, T. G., Siangco, C., Augustine, J. J., Kang, Y., McDaniel, J. M., Xiong, S., Koay, E. J., McAllister, F., Bristow, C. A., Heffernan, T. P., Maitra, A., Liu, B., Barton, M. C., … Lozano, G. (2021). Oncogenic KRAS Recruits an Expansive Transcriptional Network through Mutant p53 to Drive Pancreatic Cancer Metastasis. *Cancer Discovery*, *11*(8), 2094-2111. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1228

Kim, N., Cheng, J., Jung, I., Liang, J. D., Shih, Y. L., Huang, W.-Y., Kimura, T., Lee, V. H. F., Zeng, Z. C., Zhenggan, R., Kay, C. S., Heo, S. J., Won, J. Y., & Seong, J. (2020). Stereotactic body radiation therapy vs. Radiofrequency ablation in Asian patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, *73*(1), 121-129. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.03.005

Kimmelman, A. C. (2015). Metabolic Dependencies in RAS-Driven Cancers. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *21*(8), 1828-1834. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2425

Kindler, H. L., Wroblewski, K., Wallace, J. A., Hall, M. J., Locker, G., Nattam, S., Agamah, E., Stadler, W. M., & Vokes, E. E. (2012). Gemcitabine plus sorafenib in patients with advanced pancreatic cancer: A phase II trial of the University of Chicago Phase II Consortium. *Investigational new drugs*, *30*(1), 382-386. https://doi.org/10.1007/s10637-010-9526-z

Kinsey, C. G., Camolotto, S. A., Boespflug, A. M., Guillen, K. P., Foth, M., Truong, A., Schuman, S. S., Shea, J. E., Seipp, M. T., Yap, J. T., Burrell, L. D., Lum, D. H., Whisenant, J. R., Gilcrease, G. W., Cavalieri, C. C., Rehbein, K. M., Cutler, S. L., Affolter, K. E., Welm, A. L., … McMahon, M. (2019). Protective autophagy elicited by RAF→MEK→ERK inhibition suggests a treatment strategy for RAS-driven cancers. *Nature Medicine*, *25*(4), 620-627. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0367-9

Kiuru, M., & Busam, K. J. (2017). The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, *97*(2), 146-157. https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.142

Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C. D., Biankin, A. V., Neale, R. E., Tempero, M., Tuveson, D. A., Hruban, R. H., & Neoptolemos, J. P. (2016). Pancreatic cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, *2*, 16022. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.22

Knudson, A. G. (1971). Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *68*(4), 820-823. https://doi.org/10.1073/pnas.68.4.820

Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., Smyth, M. J., & Schreiber, R. D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, *450*(7171), 903-907. https://doi.org/10.1038/nature06309

Köhler, C., Nittner, D., Rambow, F., Radaelli, E., Stanchi, F., Vandamme, N., Baggiolini, A., Sommer, L., Berx, G., van den Oord, J. J., Gerhardt, H., Blanpain, C., & Marine, J.-C. (2017). Mouse Cutaneous Melanoma Induced by Mutant BRaf Arises from Expansion and Dedifferentiation of Mature Pigmented Melanocytes. *Cell Stem Cell*, *21*(5), 679-693.e6. https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.08.003

Kong, Y., Si, L., Li, Y., Wu, X., Xu, X., Dai, J., Tang, H., Ma, M., Chi, Z., Sheng, X., Cui, C., & Guo, J. (2016). Analysis of mTOR Gene Aberrations in Melanoma Patients and Evaluation of Their Sensitivity to PI3K-AKT-mTOR Pathway Inhibitors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *22*(4), 1018-1027. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1110

Kopp, F., & Mendell, J. T. (2018). Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell*, *172*(3), 393-407. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.011

Kovacs, D., Migliano, E., Muscardin, L., Silipo, V., Catricalà, C., Picardo, M., & Bellei, B. (2016). The role of WNT/β-catenin signaling pathway in melanoma epithelial-to-mesenchymal-like switching: Evidences from patients-derived cell lines. *Oncotarget*, *7*(28), 43295-43314. https://doi.org/10.18632/oncotarget.9232

Krah, N. M., De La O, J. P., Swift, G. H., Hoang, C. Q., Willet, S. G., Chen Pan, F., Cash, G. M., Bronner, M. P., Wright, C. V., MacDonald, R. J., & Murtaugh, L. C. (2015). The acinar differentiation determinant PTF1A inhibits initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *eLife*, *4*, e07125. https://doi.org/10.7554/eLife.07125

Lakshmi Narendra, B., Eshvendar Reddy, K., Shantikumar, S., & Ramakrishna, S. (2013). Immune system: A double-edged sword in cancer. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, *62*(9), 823-834. https://doi.org/10.1007/s00011-013-0645-9

Lambrecht, B. N., Vanderkerken, M., & Hammad, H. (2018). The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. *Nature Reviews. Immunology*, *18*(12), 745-758. https://doi.org/10.1038/s41577-018-0068-5

Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *15*(3), 178-196. https://doi.org/10.1038/nrm3758

Lan, F., & Shi, Y. (2009). Epigenetic regulation: Methylation of histone and non-histone proteins. *Science in China Series C: Life Sciences*, *52*(4), 311-322. https://doi.org/10.1007/s11427-009-0054-z

Lansdorp, P. M. (2022). Telomeres, Telomerase and Cancer. *Archives of Medical Research*, *53*(8), 741-746. https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2022.10.004

Larkin, J., Ascierto, P. A., Dréno, B., Atkinson, V., Liszkay, G., Maio, M., Mandalà, M., Demidov, L., Stroyakovskiy, D., Thomas, L., de la Cruz-Merino, L., Dutriaux, C., Garbe, C., Sovak, M. A., Chang, I., Choong, N., Hack, S. P., McArthur, G. A., & Ribas, A. (2014). Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *The New England Journal of Medicine*, *371*(20), 1867-1876. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408868

Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A. J., Brown, J. A., Nunes, R., Greenfield, E. A., Bourque, K., Boussiotis, V. A., Carter, L. L., Carreno, B. M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., … Freeman, G. J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*, *2*(3), 261-268. https://doi.org/10.1038/85330

Lavoie, H., & Therrien, M. (2015). Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *16*(5), 281-298. https://doi.org/10.1038/nrm3979

Leão, R., Apolónio, J. D., Lee, D., Figueiredo, A., Tabori, U., & Castelo-Branco, P. (2018). Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: Clinical impacts in cancer. *Journal of Biomedical Science*, *25*(1), 22. https://doi.org/10.1186/s12929-018-0422-8

Lee, E. Y. H. P., & Muller, W. J. (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(10), a003236. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003236

Lee, S. B., Schramme, A., Doberstein, K., Dummer, R., Abdel-Bakky, M. S., Keller, S., Altevogt, P., Oh, S. T., Reichrath, J., Oxmann, D., Pfeilschifter, J., Mihic-Probst, D., & Gutwein, P. (2010). ADAM10 is upregulated in melanoma metastasis compared with primary melanoma. *The Journal of Investigative Dermatology*, *130*(3), 763-773. https://doi.org/10.1038/jid.2009.335

Lee, S., & Schmitt, C. A. (2019). The dynamic nature of senescence in cancer. *Nature Cell Biology*, *21*(1), 94-101. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0249-2

Leiter, U., Eigentler, T., & Garbe, C. (2014). Epidemiology of skin cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *810*, 120-140. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0437-2_7

Leucci, E., Vendramin, R., Spinazzi, M., Laurette, P., Fiers, M., Wouters, J., Radaelli, E., Eyckerman, S., Leonelli, C., Vanderheyden, K., Rogiers, A., Hermans, E., Baatsen, P., Aerts, S., Amant, F., Van Aelst, S., van den Oord, J., de Strooper, B., Davidson, I., … Marine, J.-C. (2016). Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. *Nature*, *531*(7595), 518-522. https://doi.org/10.1038/nature17161

Levy, C., Khaled, M., Robinson, K. C., Veguilla, R. A., Chen, P.-H., Yokoyama, S., Makino, E., Lu, J., Larue, L., Beermann, F., Chin, L., Bosenberg, M., Song, J. S., & Fisher, D. E. (2010). Lineage-specific transcriptional regulation of DICER by MITF in melanocytes. *Cell*, *141*(6), 994-1005. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.004

Lewis, D. I. (2019). Animal experimentation: Implementation and application of the 3Rs. *Emerging Topics in Life Sciences*, *3*(6), 675-679. https://doi.org/10.1042/ETLS20190061

Li, P., Morris, D. L., Willcox, B. E., Steinle, A., Spies, T., & Strong, R. K. (2001). Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nature Immunology*, *2*(5), 443-451. https://doi.org/10.1038/87757

Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, *41*(3), 211-218. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001

Liu, G., Atteridge, C. L., Wang, X., Lundgren, A. D., & Wu, J. D. (2010). The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *184*(7), 3346-3350. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903789

Liu, J., Xiao, Q., Xiao, J., Niu, C., Li, Y., Zhang, X., Zhou, Z., Shu, G., & Yin, G. (2022). Wnt/β-catenin signalling: Function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*, 3. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6

Liu, J., Zhang, C., Wang, J., Hu, W., & Feng, Z. (2020). The Regulation of Ferroptosis by Tumor Suppressor p53 and its Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21), 8387. https://doi.org/10.3390/ijms21218387

Livingstone, E., Zimmer, L., Vaubel, J., & Schadendorf, D. (2014). BRAF, MEK and KIT inhibitors for melanoma: Adverse events and their management. *Chinese Clinical Oncology*, *3*(3), 29. https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3865.2014.03.03

Loercher, A. E., Tank, E. M. H., Delston, R. B., & Harbour, J. W. (2005). MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *The Journal of Cell Biology*, *168*(1), 35-40. https://doi.org/10.1083/jcb.200410115

Lokhandwala, P. M., Tseng, L.-H., Rodriguez, E., Zheng, G., Pallavajjalla, A., Gocke, C. D., Eshleman, J. R., & Lin, M.-T. (2019). Clinical mutational profiling and categorization of BRAF mutations in melanomas using next generation sequencing. *BMC Cancer*, *19*(1), 665. https://doi.org/10.1186/s12885-019-5864-1

Loras, A., Gil-Barrachina, M., Marqués-Torrejón, M. Á., Perez-Pastor, G., & Martinez-Cadenas, C. (2022). UV-Induced Somatic Mutations Driving Clonal Evolution in Healthy Skin, Nevus, and Cutaneous Melanoma. *Life (Basel, Switzerland)*, *12*(9), 1339. https://doi.org/10.3390/life12091339

Lu, Z., Zou, J., Li, S., Topper, M. J., Tao, Y., Zhang, H., Jiao, X., Xie, W., Kong, X., Vaz, M., Li, H., Cai, Y., Xia, L., Huang, P., Rodgers, K., Lee, B., Riemer, J. B., Day, C.-P., Yen, R.-W. C., … Brock, M. V. (2020). Epigenetic therapy inhibits metastases by disrupting premetastatic niches. *Nature*, *579*(7798), 284-290. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2054-x

Luchini, C., Grillo, F., Fassan, M., Vanoli, A., Capelli, P., Paolino, G., Ingravallo, G., Renzulli, G., Doglioni, C., D'Amuri, A., Mattiolo, P., Pecori, S., Parente, P., Florena, A. M., Zamboni, G., & Scarpa, A. (2020). Malignant epithelial/exocrine tumors of the pancreas. *Pathologica*, *112*(3), 210-226. https://doi.org/10.32074/1591-951X-167

Luo, C., Merz, P. R., Chen, Y., Dickes, E., Pscherer, A., Schadendorf, D., & Eichmüller, S. B. (2013). MiR-101 inhibits melanoma cell invasion and proliferation by targeting MITF and EZH2. *Cancer Letters*, *341*(2), 240-247. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.08.021

Luo, D., Li, X., Tang, S., Song, F., Li, W., Xie, G., Liang, J., & Zhou, J. (2021). Epigenetic modifications in neuropathic pain. *Molecular Pain*, *17*, 17448069211056767. https://doi.org/10.1177/17448069211056767

Lutzky, J., Sullivan, R. J., Cohen, J. V., Ren, Y., Li, A., & Haq, R. (2023). Phase 1b study of intravenous coxsackievirus A21 (V937) and ipilimumab for patients with metastatic uveal melanoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *149*(9), 6059-6066. https://doi.org/10.1007/s00432-022-04510-3

Lyon, P., Strippoli, V., Fang, B., & Cimmino, L. (2020). B Vitamins and One-Carbon Metabolism: Implications in Human Health and Disease. *Nutrients*, *12*(9), 2867. https://doi.org/10.3390/nu12092867

Maitra, A., Adsay, N. V., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., De Marzo, A., Cameron, J. L., Yeo, C. J., & Hruban, R. H. (2003). Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *16*(9), 902-912. https://doi.org/10.1097/01.MP.0000086072.56290.FB

Maitra, A., & Hruban, R. H. (2008). Pancreatic cancer. *Annual Review of Pathology*, *3*, 157-188. https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154305

Mallarino, R., Henegar, C., Mirasierra, M., Manceau, M., Schradin, C., Vallejo, M., Beronja, S., Barsh, G. S., & Hoekstra, H. E. (2016). Developmental mechanisms of stripe patterns in rodents. *Nature*, *539*(7630), 518-523. https://doi.org/10.1038/nature20109

Mansky, K. C., Sankar, U., Han, J., & Ostrowski, M. C. (2002). Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(13), 11077-11083. https://doi.org/10.1074/jbc.M111696200

Marino, M. L., Carrera, C., Marchetti, M. A., & Marghoob, A. A. (2016). Practice Gaps in Dermatology: Melanocytic Lesions and Melanoma. *Dermatologic Clinics*, *34*(3), 353-362. https://doi.org/10.1016/j.det.2016.03.003

Marusyk, A., Janiszewska, M., & Polyak, K. (2020). Intratumor heterogeneity: The Rosetta stone of therapy resistance. *Cancer cell*, *37*(4), 471-484. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.007

Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1α pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, *5*(5), 378-389. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.007

Mathew, R., Khor, S., Hackett, S. R., Rabinowitz, J. D., Perlman, D. H., & White, E. (2014). Functional role of autophagy-mediated proteome remodeling in cell survival signaling and innate immunity. *Molecular Cell*, *55*(6), 916-930. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.07.019

McGill, G. G., Horstmann, M., Widlund, H. R., Du, J., Motyckova, G., Nishimura, E. K., Lin, Y.-L., Ramaswamy, S., Avery, W., Ding, H.-F., Jordan, S. A., Jackson, I. J., Korsmeyer, S. J., Golub, T. R., & Fisher, D. E. (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell*, *109*(6), 707-718. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00762-6

McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*, *24*(43), 4846-4861. https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i43.4846

Merhavi-Shoham, E., Itzhaki, O., Markel, G., Schachter, J., & Besser, M. J. (2017). Adoptive Cell Therapy for Metastatic Melanoma. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, *23*(1), 48-53. https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000240

Midha, S., Chawla, S., & Garg, P. K. (2016). Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Letters*, *381*(1), 269-277. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.07.022

Miller, A. J., Levy, C., Davis, I. J., Razin, E., & Fisher, D. E. (2005). Sumoylation of MITF and its related family members TFE3 and TFEB. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(1), 146-155. https://doi.org/10.1074/jbc.M411757200

Mitchell, D., Chintala, S., & Dey, M. (2018). Plasmacytoid dendritic cell in immunity and cancer. *Journal of Neuroimmunology*, *322*, 63-73. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.06.012

Mitra, D., Luo, X., Morgan, A., Wang, J., Hoang, M. P., Lo, J., Guerrero, C. R., Lennerz, J. K., Mihm, M. C., Wargo, J. A., Robinson, K. C., Devi, S. P., Vanover, J. C., D'Orazio, J. A., McMahon, M., Bosenberg, M. W., Haigis, K. M., Haber, D. A., Wang, Y., & Fisher, D. E. (2012). An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature*, *491*(7424), 449-453. https://doi.org/10.1038/nature11624

Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(3), 1101-1111. https://doi.org/10.1091/mbc.e03-09-0704

Mohania, D., Chandel, S., Kumar, P., Verma, V., Digvijay, K., Tripathi, D., Choudhury, K., Mitten, S. K., & Shah, D. (2017). Ultraviolet Radiations: Skin Defense-Damage Mechanism. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *996*, 71-87. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_7

Möller, K., Sigurbjornsdottir, S., Arnthorsson, A. O., Pogenberg, V., Dilshat, R., Fock, V., Brynjolfsdottir, S. H., Bindesboll, C., Bessadottir, M., Ogmundsdottir, H. M., Simonsen, A., Larue, L., Wilmanns, M., Thorsson, V., Steingrimsson, E., & Ogmundsdottir, M. H. (2019). MITF has a central role in regulating starvation-induced autophagy in melanoma. *Scientific Reports*, *9*(1), 1055. https://doi.org/10.1038/s41598-018-37522-6

Montenegro, M. F., Collado-González, M. D. M., Fernández-Pérez, M. P., Hammouda, M. B., Tolordava, L., Gamkrelidze, M., & Rodríguez-López, J. N. (2014). Promoting E2F1-mediated apoptosis in oestrogen receptor-α-negative breast cancer cells. BMC Cancer, 14, 539. https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-539

Montenegro, M. F., González-Guerrero, R., Sánchez-del-Campo, L., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2020). PRMT1-dependent methylation of BRCA1 contributes to the epigenetic defense of breast cancer cells against ionizing radiation. Scientific Reports, 10(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41598-020-70289-3

Montenegro, M. F., González-Guerrero, R., Sánchez-del-Campo, L., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2016a). Targeting the epigenetics of the DNA damage response in breast cancer. *Cell Death & Disease*, *7*, e2180. https://doi.org/10.1038/cddis.2016.85

Montenegro, M. F., Sáez-Ayala, M., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2012). Reactivation of the tumour suppressor RASSF1A in breast cancer by simultaneous targeting of DNA and E2F1 methylation. PloS One, 7(12), e52231. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052231

Montenegro, M. F., Sánchez-del-Campo, L., Fernández-Pérez, M. P., Sáez-Ayala, M., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2015). Targeting the epigenetic machinery of cancer cells. Oncogene, 34(2), Article 2. https://doi.org/10.1038/onc.2013.605

Montenegro, M. F., Sánchez-Del-Campo, L., González-Guerrero, R., Martínez-Barba, E., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2016b). Tumor suppressor SET9 guides the epigenetic plasticity of breast cancer cells and serves as an early-stage biomarker for predicting metastasis. Oncogene, 35(47), 6143-6152. https://doi.org/10.1038/onc.2016.154

Montes, M., Nielsen, M. M., Maglieri, G., Jacobsen, A., Højfeldt, J., Agrawal-Singh, S., Hansen, K., Helin, K., van de Werken, H. J. G., Pedersen, J. S., & Lund, A. H. (2015). The lncRNA MIR31HG regulates p16(INK4A) expression to modulate senescence. *Nature Communications*, *6*, 6967. https://doi.org/10.1038/ncomms7967

Morris, E. J., Jha, S., Restaino, C. R., Dayananth, P., Zhu, H., Cooper, A., Carr, D., Deng, Y., Jin, W., Black, S., Long, B., Liu, J., Dinunzio, E., Windsor, W., Zhang, R., Zhao, S., Angagaw, M. H., Pinheiro, E. M., Desai, J., … Samatar, A. A. (2013). Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Discovery*, *3*(7), 742-750. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0070

Mpilla, G. B., Philip, P. A., El-Rayes, B., & Azmi, A. S. (2020). Pancreatic neuroendocrine tumors: Therapeutic challenges and research limitations. *World Journal of Gastroenterology*, *26*(28), 4036-4054. https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i28.4036

Muenst, S., Läubli, H., Soysal, S. D., Zippelius, A., Tzankov, A., & Hoeller, S. (2016). The immune system and cancer evasion strategies: Therapeutic concepts. *Journal of Internal Medicine*, *279*(6), 541-562. https://doi.org/10.1111/joim.12470

Müller, J., Krijgsman, O., Tsoi, J., Robert, L., Hugo, W., Song, C., Kong, X., Possik, P. A., Cornelissen-Steijger, P. D. M., Geukes Foppen, M. H., Kemper, K., Goding, C. R., McDermott, U., Blank, C., Haanen, J., Graeber, T. G., Ribas, A., Lo, R. S., & Peeper, D. S. (2014). Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nature Communications*, *5*, 5712. https://doi.org/10.1038/ncomms6712

Murtas, D., Piras, F., Minerba, L., Maxia, C., Ferreli, C., Demurtas, P., Lai, S., Mura, E., Corrias, M., Sirigu, P., & Perra, M. T. (2015). Activated Notch1 expression is associated with angiogenesis in cutaneous melanoma. *Clinical and Experimental Medicine*, *15*(3), 351-360. https://doi.org/10.1007/s10238-014-0300-y

Musial, C., Kuban-Jankowska, A., & Gorska-Ponikowska, M. (2020). Beneficial Properties of Green Tea Catechins. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(5), 1744. https://doi.org/10.3390/ijms21051744

Nakayama, A., Nguyen, M. T., Chen, C. C., Opdecamp, K., Hodgkinson, C. A., & Arnheiter, H. (1998). Mutations in microphthalmia, the mouse homolog of the human deafness gene MITF, affect neuroepithelial and neural crest-derived melanocytes differently. *Mechanisms of Development*, *70*(1-2), 155-166. https://doi.org/10.1016/s0925-4773(97)00188-3

Nasti, T. H., & Timares, L. (2015). Invited Review MC1R, Eumelanin and Pheomelanin: Their role in determining the susceptibility to skin cancer. *Photochemistry and photobiology*, *91*(1), 188-200. https://doi.org/10.1111/php.12335

Navarro-Perán, E., Cabezas-Herrera, J., Campo, L. S. D., & Rodríguez-López, J. N. (2007). Effects of folate cycle disruption by the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. The

International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39(12), 2215-2225. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.06.005

Navarro-Perán, E., Cabezas-Herrera, J., García-Cánovas, F., Durrant, M. C., Thorneley, R. N. F., & Rodríguez-López, J. N. (2005a). The antifolate activity of tea catechins. Cancer Research, 65(6), 2059-2064. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3469

Navarro-Perán, E., Cabezas-Herrera, J., Hiner, A. N. P., Sadunishvili, T., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2005b). Kinetics of the inhibition of bovine liver dihydrofolate reductase by tea catechins: Origin of slow-binding inhibition and pH studies. Biochemistry, 44(20), 7512-7525. https://doi.org/10.1021/bi050160t

Navarro-Perán, E., Cabezas-Herrera, J., Sánchez-Del-Campo, L., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2008). The anti-inflammatory and anti-cancer properties of epigallocatechin-3-gallate are mediated by folate cycle disruption, adenosine release and NF-kappaB suppression. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, *57*(10), 472-478. https://doi.org/10.1007/s00011-008-8013-x

Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability—An evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *11*(3), 220-228. https://doi.org/10.1038/nrm2858

Nejman, D., Livyatan, I., Fuks, G., Gavert, N., Zwang, Y., Geller, L. T., Rotter-Maskowitz, A., Weiser, R., Mallel, G., Gigi, E., Meltser, A., Douglas, G. M., Kamer, I., Gopalakrishnan, V., Dadosh, T., Levin-Zaidman, S., Avnet, S., Atlan, T., Cooper, Z. A., … Straussman, R. (2020). The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, *368*(6494), 973-980. https://doi.org/10.1126/science.aay9189

Neoptolemos, J. P., Kleeff, J., Michl, P., Costello, E., Greenhalf, W., & Palmer, D. H. (2018). Therapeutic developments in pancreatic cancer: Current and future perspectives. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *15*(6), 333-348. https://doi.org/10.1038/s41575-018-0005-x

Neoptolemos, J. P., Palmer, D. H., Ghaneh, P., Psarelli, E. E., Valle, J. W., Halloran, C. M., Faluyi, O., O'Reilly, D. A., Cunningham, D., Wadsley, J., Darby, S., Meyer, T., Gillmore, R., Anthoney, A., Lind, P., Glimelius, B., Falk, S., Izbicki, J. R., Middleton, G. W., … European Study Group for Pancreatic Cancer. (2017). Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): A multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, *389*(10073), 1011-1024. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32409-6

Ng, M. F., Simmons, J. L., & Boyle, G. M. (2022). Heterogeneity in Melanoma. *Cancers*, *14*(12), 3030. https://doi.org/10.3390/cancers14123030

Nicholson, K. M., & Anderson, N. G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling*, *14*(5), 381-395. https://doi.org/10.1016/s0898-6568(01)00271-6

Nishimura, E. K., Suzuki, M., Igras, V., Du, J., Lonning, S., Miyachi, Y., Roes, J., Beermann, F., & Fisher, D. E. (2010). Key roles for transforming growth factor beta in melanocyte stem cell maintenance. *Cell Stem Cell*, *6*(2), 130-140. https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.12.010

Nsengimana, J., Laye, J., Filia, A., O'Shea, S., Muralidhar, S., Poźniak, J., Droop, A., Chan, M., Walker, C., Parkinson, L., Gascoyne, J., Mell, T., Polso, M., Jewell, R., Randerson-Moor, J., Cook, G. P., Bishop, D. T., & Newton-Bishop, J. (2018). β-Catenin-mediated immune evasion pathway frequently operates in primary cutaneous melanomas. *The Journal of Clinical Investigation*, *128*(5), 2048-2063. https://doi.org/10.1172/JCI95351

Odenthal, J., Takes, R., & Friedl, P. (2016). Plasticity of tumor cell invasion: Governance by growth factors and cytokines. *Carcinogenesis*, *37*(12), 1117-1128. https://doi.org/10.1093/carcin/bgw098

Oh, M. H., Sun, I. H., Zhao, L., Leone, R. D., Sun, I. M., Xu, W., Collins, S. L., Tam, A. J., Blosser, R. L., Patel, C. H., Englert, J. M., Arwood, M. L., Wen, J., Chan-Li, Y., Tenora, L., Majer, P., Rais, R., Slusher, B. S., Horton, M. R., & Powell, J. D. (2020). Targeting glutamine metabolism enhances tumor-specific immunity by modulating suppressive myeloid cells. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(7), 3865-3884. https://doi.org/10.1172/JCI131859

Ohanna, M., Bonet, C., Bille, K., Allegra, M., Davidson, I., Bahadoran, P., Lacour, J. P., Ballotti, R., & Bertolotto, C. (2014). SIRT1 promotes proliferation and inhibits the senescence-like phenotype in human melanoma cells. *Oncotarget*, *5*(8), 2085-2095. https://doi.org/10.18632/oncotarget.1791

O'Leary, B., Finn, R. S., & Turner, N. C. (2016). Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *13*(7), 417-430. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.26

Opdecamp, K., Nakayama, A., Nguyen, M. T., Hodgkinson, C. A., Pavan, W. J., & Arnheiter, H. (1997). Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: Crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. *Development (Cambridge, England)*, *124*(12), 2377-2386. https://doi.org/10.1242/dev.124.12.2377

Oppezzo, A., & Rosselli, F. (2021). The underestimated role of the microphthalmia-associated transcription factor (MiTF) in normal and pathological haematopoiesis. *Cell & Bioscience*, *11*(1), 18. https://doi.org/10.1186/s13578-021-00529-0

Orth, M., Metzger, P., Gerum, S., Mayerle, J., Schneider, G., Belka, C., Schnurr, M., & Lauber, K. (2019). Pancreatic ductal adenocarcinoma: Biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. *Radiation Oncology (London, England)*, *14*(1), 141. https://doi.org/10.1186/s13014-019-1345-6

Ostrowski, S. M., & Fisher, D. E. (2021). Biology of Melanoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *35*(1), 29-56. https://doi.org/10.1016/j.hoc.2020.08.010

Pai, S. G., Carneiro, B. A., Mota, J. M., Costa, R., Leite, C. A., Barroso-Sousa, R., Kaplan, J. B., Chae, Y. K., & Giles, F. J. (2017). Wnt/beta-catenin pathway: Modulating anticancer immune response. *Journal of Hematology & Oncology*, *10*(1), 101. https://doi.org/10.1186/s13045-017-0471-6

Palmieri, G., Ombra, M., Colombino, M., Casula, M., Sini, M., Manca, A., Paliogiannis, P., Ascierto, P. A., & Cossu, A. (2015). Multiple Molecular Pathways in Melanomagenesis: Characterization of Therapeutic Targets. *Frontiers in Oncology*, *5*, 183. https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00183

Papa, A., & Pandolfi, P. P. (2019). The PTEN⁻PI3K Axis in Cancer. *Biomolecules*, *9*(4), 153. https://doi.org/10.3390/biom9040153

Papac, R. J. (1996). Spontaneous regression of cancer. *Cancer Treatment Reviews*, *22*(6), 395-423. https://doi.org/10.1016/s0305-7372(96)90023-7

Parish, C. R. (2003). Cancer immunotherapy: The past, the present and the future. *Immunology and Cell Biology*, *81*(2), 106-113. https://doi.org/10.1046/j.0818-9641.2003.01151.x

Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., Van Keymeulen, A., Brown, D., Moers, V., Lemaire, S., De Clercq, S., Minguijón, E., Balsat, C., Sokolow, Y., Dubois, C., De Cock, F., Scozzaro, S., Sopena, F., Lanas, A., … Blanpain, C. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*, *556*(7702), 463-468. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0040-3

Patton, E. E., Mueller, K. L., Adams, D. J., Anandasabapathy, N., Aplin, A. E., Bertolotto, C., Bosenberg, M., Ceol, C. J., Burd, C. E., Chi, P., Herlyn, M., Holmen, S. L., Karreth, F. A., Kaufman, C. K., Khan, S., Kobold, S., Leucci, E., Levy, C., Lombard, D. B., … Merlino, G. (2021). Melanoma models for the next generation of therapies. *Cancer cell*, *39*(5), 610-631. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.01.011

Paul, S., & Lal, G. (2017). The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1124. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01124

Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). THE EMERGING HALLMARKS OF CANCER METABOLISM. *Cell metabolism*, *23*(1), 27-47. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006

Pham, D. (Daniel) M., Guhan, S., & Tsao, H. (2020). KIT and Melanoma: Biological Insights and Clinical Implications. *Yonsei Medical Journal*, *61*(7), 562-571. https://doi.org/10.3349/ymj.2020.61.7.562

Pinnix, C. C., Lee, J. T., Liu, Z.-J., McDaid, R., Balint, K., Beverly, L. J., Brafford, P. A., Xiao, M., Himes, B., Zabierowski, S. E., Yashiro-Ohtani, Y., Nathanson, K. L., Bengston, A., Pollock, P. M., Weeraratna, A. T., Nickoloff, B. J., Pear, W. S., Capobianco, A. J., & Herlyn, M. (2009). Active Notch1 confers a transformed phenotype to primary human melanocytes. *Cancer Research*, *69*(13), 5312-5320. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3767

Pistritto, G., Trisciuoglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, *8*(4), 603-619. https://doi.org/10.18632/aging.100934

Ploper, D., Taelman, V. F., Robert, L., Perez, B. S., Titz, B., Chen, H. W., Graeber, T. G., von Euw, E., Ribas, A., & De Robertis, E. M. (2015). MITF drives endolysosomal biogenesis and potentiates Wnt signaling in melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(5), E420-E429. https://doi.org/10.1073/pnas.1424576112

Pol, J., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2016). First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. *Oncoimmunology*, *5*(1), e1115641. https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1115641

Pollock, P. M., Harper, U. L., Hansen, K. S., Yudt, L. M., Stark, M., Robbins, C. M., Moses, T. Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., Salem, G., Pohida, T., Heenan, P., Duray, P., Kallioniemi, O., Hayward, N. K., Trent, J. M., & Meltzer, P. S. (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature Genetics*, *33*(1), 19-20. https://doi.org/10.1038/ng1054

Pon, J. R., & Marra, M. A. (2015). Driver and passenger mutations in cancer. *Annual Review of Pathology*, *10*, 25-50. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040312

Pópulo, H., Caldas, R., Lopes, J. M., Pardal, J., Máximo, V., & Soares, P. (2015). Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase supports dichloroacetate as a candidate for cutaneous melanoma therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *19*(6), 733-745. https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1045416

Pópulo, H., Soares, P., & Lopes, J. M. (2012). Insights into melanoma: Targeting the mTOR pathway for therapeutics. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *16*(7), 689-705. https://doi.org/10.1517/14728222.2012.691472

Porcelli, L., Mazzotta, A., Garofoli, M., Di Fonte, R., Guida, G., Guida, M., Tommasi, S., & Azzariti, A. (2021). Active notch protects MAPK activated melanoma cell lines from MEK inhibitor cobimetinib. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *133*, 111006. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111006

Poto, R., Troiani, T., Criscuolo, G., Marone, G., Ciardiello, F., Tocchetti, C. G., & Varricchi, G. (2022). Holistic Approach to Immune Checkpoint Inhibitor-Related Adverse Events. *Frontiers in Immunology*, *13*, 804597. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.804597

Puram, S. V., Tirosh, I., Parikh, A. S., Patel, A. P., Yizhak, K., Gillespie, S., Rodman, C., Luo, C. L., Mroz, E. A., Emerick, K. S., Deschler, D. G., Varvares, M. A., Mylvaganam, R., Rozenblatt-Rosen, O., Rocco, J. W., Faquin, W. C., Lin, D. T., Regev, A., & Bernstein, B. E. (2017). Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell*, *171*(7), 1611-1624.e24. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.044

Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., & Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: Weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews. Cancer*, *11*(11), 761-774. https://doi.org/10.1038/nrc3106

Raimondi, S., Suppa, M., & Gandini, S. (2020). Melanoma Epidemiology and Sun Exposure. *Acta Dermato-Venereologica*, *100*(11), adv00136. https://doi.org/10.2340/00015555-3491

Rambow, F., Marine, J.-C., & Goding, C. R. (2019). Melanoma plasticity and phenotypic diversity: Therapeutic barriers and opportunities. *Genes & Development*, *33*(19-20), 1295-1318. https://doi.org/10.1101/gad.329771.119

Randic, T., Kozar, I., Margue, C., Utikal, J., & Kreis, S. (2021). NRAS mutant melanoma: Towards better therapies. *Cancer Treatment Reviews*, *99*, 102238. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102238

Rastrelli, M., Tropea, S., Pigozzo, J., Bezzon, E., Campana, L. G., Stramare, R., Alaibac, M., & Rossi, C. R. (2014). Melanoma m1: Diagnosis and therapy. *In Vivo (Athens, Greece)*, *28*(3), 273-285.

Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology*, *10*(1), 10-27. https://doi.org/10.14740/wjon1166

Renault, T. T., & Chipuk, J. E. (2013). Getting away with murder: How do the BCL-2 family of proteins kill with immunity? *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1285*(1), 59-79. https://doi.org/10.1111/nyas.12045

Ribas, A., Daud, A., Pavlick, A. C., Gonzalez, R., Lewis, K. D., Hamid, O., Gajewski, T. F., Puzanov, I., Wongchenko, M., Rooney, I., Hsu, J. J., Yan, Y., Park, E., & McArthur, G. A. (2020). Extended 5-Year Follow-up Results of a Phase Ib Study (BRIM7) of Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutant Melanoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *26*(1), 46-53. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4180

Ribas, A., & Wolchok, J. D. (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science (New York, N.Y.)*, *359*(6382), 1350-1355. https://doi.org/10.1126/science.aar4060

Rizos, H., Menzies, A. M., Pupo, G. M., Carlino, M. S., Fung, C., Hyman, J., Haydu, L. E., Mijatov, B., Becker, T. M., Boyd, S. C., Howle, J., Saw, R., Thompson, J. F., Kefford, R. F., Scolyer, R. A., & Long, G. V. (2014). BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: Spectrum and clinical impact. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American*

*Association for Cancer Research*, *20*(7), 1965-1977. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3122

Robert, C., Schachter, J., Long, G. V., Arance, A., Grob, J. J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M. S., McNeil, C., Lotem, M., Larkin, J., Lorigan, P., Neyns, B., Blank, C. U., Hamid, O., Mateus, C., Shapira-Frommer, R., Kosh, M., Zhou, H., … KEYNOTE-006 investigators. (2015). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, *372*(26), 2521-2532. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503093

Rojas, L. A., Sethna, Z., Soares, K. C., Olcese, C., Pang, N., Patterson, E., Lihm, J., Ceglia, N., Guasp, P., Chu, A., Yu, R., Chandra, A. K., Waters, T., Ruan, J., Amisaki, M., Zebboudj, A., Odgerel, Z., Payne, G., Derhovanessian, E., … Balachandran, V. P. (2023). Personalized RNA neoantigen vaccines stimulate T cells in pancreatic cancer. *Nature*, *618*(7963), 144-150. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06063-y

Rothberg, J. M., Bailey, K. M., Wojtkowiak, J. W., Ben-Nun, Y., Bogyo, M., Weber, E., Moin, K., Blum, G., Mattingly, R. R., Gillies, R. J., & Sloane, B. F. (2013). Acid-mediated tumor proteolysis: Contribution of cysteine cathepsins. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *15*(10), 1125-1137. https://doi.org/10.1593/neo.13946

Roufayel, R., Younes, K., Al-Sabi, A., & Murshid, N. (2022). BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis. *Life*, *12*(2), 256. https://doi.org/10.3390/life12020256

Ryan, M. B., Der, C. J., Wang-Gillam, A., & Cox, A. D. (2015). Targeting RAS-mutant cancers: Is ERK the key? *Trends in Cancer*, *1*(3), 183-198. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2015.10.001

Sáenz, S., Conejo-Mir, J., & Cayuela, A. (2005). [Melanoma epidemiology in Spain]. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, *96*(7), 411-418. https://doi.org/10.1016/s0001-7310(05)73105-7

Sáez-Ayala, M., Montenegro, M. F., Sánchez-Del-Campo, L., Fernández-Pérez, M. P., Chazarra, S., Freter, R., Middleton, M., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., Goding, C. R., & Rodríguez-López, J. N. (2013). Directed phenotype switching as an effective antimelanoma strategy. *Cancer Cell*, *24*(1), 105-119. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.05.009

Sáez-Ayala, M., Sánchez-del-Campo, L., Montenegro, M. F., Chazarra, S., Tárraga, A., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2011). Comparison of a pair of synthetic tea-catechin-derived epimers: Synthesis, antifolate activity, and tyrosinase-mediated activation in melanoma. *ChemMedChem*, *6*(3), 440-449. https://doi.org/10.1002/cmdc.201000482

Saghafinia, S., Homicsko, K., Di Domenico, A., Wullschleger, S., Perren, A., Marinoni, I., Ciriello, G., Michael, I. P., & Hanahan, D. (2021). Cancer Cells Retrace a Stepwise Differentiation Program during Malignant Progression. *Cancer Discovery*, *11*(10), 2638-2657. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1637

Saitoh, M. (2018). Involvement of partial EMT in cancer progression. *Journal of Biochemistry*, *164*(4), 257-264. https://doi.org/10.1093/jb/mvy047

Saman, H., Raza, S. S., Uddin, S., & Rasul, K. (2020). Inducing Angiogenesis, a Key Step in Cancer Vascularization, and Treatment Approaches. *Cancers*, *12*(5), 1172. https://doi.org/10.3390/cancers12051172

Sánchez-del-Campo, L., Otón, F., Tárraga, A., Cabezas-Herrera, J., Chazarra, S., & Rodríguez-López, J. N. (2008). Synthesis and biological activity of a 3,4,5-trimethoxybenzoyl ester analogue of epicatechin-3-gallate. *Journal of Medicinal Chemistry*, *51*(7), 2018-2026. https://doi.org/10.1021/jm701346h

Sánchez-del-Campo, L., & Rodríguez-López, J. N. (2008). Targeting the methionine cycle for melanoma therapy with 3-O-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)-(-)-epicatechin. *International Journal of Cancer*, *123*(10), 2446-2455. https://doi.org/10.1002/ijc.23813

Sánchez-Del-Campo, L., Sáez-Ayala, M., Chazarra, S., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2009a). Binding of natural and synthetic polyphenols to human dihydrofolate reductase. International Journal of Molecular Sciences, 10(12), 5398-5410. https://doi.org/10.3390/ijms10125398

Sánchez-del-Campo, L., Tárraga, A., Montenegro, M. F., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2009b). Melanoma activation of 3-o-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)-(-)-epicatechin to a potent irreversible inhibitor of dihydrofolate reductase. Molecular Pharmaceutics, 6(3), 883-894. https://doi.org/10.1021/mp800259k

Sautès-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J., & Fridman, W. H. (2019). Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, *19*(6), 307-325. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0144-6

Scatena, C., Murtas, D., & Tomei, S. (2021). Cutaneous Melanoma Classification: The Importance of High-Throughput Genomic Technologies. *Frontiers in Oncology*, *11*, 635488. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.635488

Schneider, G., & Schmid, R. M. (2003). Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Molecular Cancer*, *2*, 15. https://doi.org/10.1186/1476-4598-2-15

Schwarz, T. (2008). 25 years of UV-induced immunosuppression mediated by T cells-from disregarded T suppressor cells to highly respected regulatory T cells. *Photochemistry and Photobiology*, *84*(1), 10-18. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00223.x

Sears, C. L., & Garrett, W. S. (2014). Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host & Microbe*, *15*(3), 317-328. https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.007

Segura, M. F., Hanniford, D., Menendez, S., Reavie, L., Zou, X., Alvarez-Diaz, S., Zakrzewski, J., Blochin, E., Rose, A., Bogunovic, D., Polsky, D., Wei, J., Lee, P., Belitskaya-Levy, I., Bhardwaj,

N., Osman, I., & Hernando, E. (2009). Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(6), 1814-1819. https://doi.org/10.1073/pnas.0808263106

Semenza, G. L. (2009). Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Seminars in Cancer Biology*, *19*(1), 12-16. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.11.009

Sepich-Poore, G. D., Zitvogel, L., Straussman, R., Hasty, J., Wargo, J. A., & Knight, R. (2021). The microbiome and human cancer. *Science (New York, N.Y.)*, *371*(6536), eabc4552. https://doi.org/10.1126/science.abc4552

Shah, M., Bhoumik, A., Goel, V., Dewing, A., Breitwieser, W., Kluger, H., Krajewski, S., Krajewska, M., Dehart, J., Lau, E., Kallenberg, D. M., Jeong, H., Eroshkin, A., Bennett, D. C., Chin, L., Bosenberg, M., Jones, N., & Ronai, Z. A. (2010). A role for ATF2 in regulating MITF and melanoma development. *PLoS Genetics*, *6*(12), e1001258. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001258

Shay, J. W., & Wright, W. E. (2005). Senescence and immortalization: Role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*, *26*(5), 867-874. https://doi.org/10.1093/carcin/bgh296

Sherr, C. J. (2001). The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *2*(10), 731-737. https://doi.org/10.1038/35096061

Sherr, C. J., & McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, *2*(2), 103-112. https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00102-2

Shulpekova, Y., Nechaev, V., Kardasheva, S., Sedova, A., Kurbatova, A., Bueverova, E., Kopylov, A., Malsagova, K., Dlamini, J. C., & Ivashkin, V. (2021). The Concept of Folic Acid in Health and Disease. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(12), 3731. https://doi.org/10.3390/molecules26123731

Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *73*(1), 17-48. https://doi.org/10.3322/caac.21763

Sigal, A., & Rotter, V. (2000). Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: The demons of the guardian of the genome. *Cancer Research*, *60*(24), 6788-6793.

Somasundaram, R., Herlyn, M., & Wagner, S. N. (2016). The role of tumor microenvironment in melanoma therapy resistance. *Melanoma Management*, *3*(1), 23-32. https://doi.org/10.2217/mmt.15.37

Soularue, E., Lepage, P., Colombel, J. F., Coutzac, C., Faleck, D., Marthey, L., Collins, M., Chaput, N., Robert, C., & Carbonnel, F. (2018). Enterocolitis due to immune checkpoint inhibitors: A systematic review. *Gut*, *67*(11), 2056-2067. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316948

Specenier, P. (2016). Nivolumab in melanoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *16*(12), 1247-1261. https://doi.org/10.1080/14737140.2016.1249856

Stahl, J. M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J. Q., Bosenberg, M. W., Kester, M., Sandirasegarane, L., & Robertson, G. P. (2004). Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Research*, *64*(19), 7002-7010. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1399

Stephen, A. G., Esposito, D., Bagni, R. K., & McCormick, F. (2014). Dragging ras back in the ring. *Cancer Cell*, *25*(3), 272-281. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.017

Strub, T., Giuliano, S., Ye, T., Bonet, C., Keime, C., Kobi, D., Le Gras, S., Cormont, M., Ballotti, R., Bertolotto, C., & Davidson, I. (2011). Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. *Oncogene*, *30*(20), 2319-2332. https://doi.org/10.1038/onc.2010.612

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209-249. https://doi.org/10.3322/caac.21660

Svastová, E., Hulíková, A., Rafajová, M., Zat'ovicová, M., Gibadulinová, A., Casini, A., Cecchi, A., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Pastorek, J., & Pastoreková, S. (2004). Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Letters*, *577*(3), 439-445. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.043

Swietach, P., Rossini, A., Spitzer, K. W., & Vaughan-Jones, R. D. (2007). H+ ion activation and inactivation of the ventricular gap junction: A basis for spatial regulation of intracellular pH. *Circulation Research*, *100*(7), 1045-1054. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000264071.11619.47

Tachibana, M. (2000). MITF: A stream flowing for pigment cells. *Pigment Cell Research*, *13*(4), 230-240. https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2000.130404.x

Tachibana, M., Perez-Jurado, L. A., Nakayama, A., Hodgkinson, C. A., Li, X., Schneider, M., Miki, T., Fex, J., Francke, U., & Arnheiter, H. (1994). Cloning of MITF, the human homolog of the mouse microphthalmia gene and assignment to chromosome 3p14.1-p12.3. *Human Molecular Genetics*, *3*(4), 553-557. https://doi.org/10.1093/hmg/3.4.553

Takeda, K., Takemoto, C., Kobayashi, I., Watanabe, A., Nobukuni, Y., Fisher, D. E., & Tachibana, M. (2000). Ser298 of MITF, a mutation site in Waardenburg syndrome type 2, is a phosphorylation site with functional significance. *Human Molecular Genetics*, *9*(1), 125-132. https://doi.org/10.1093/hmg/9.1.125

Talmadge, J. E., Donkor, M., & Scholar, E. (2007). Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Reviews*, *26*(3-4), 373-400. https://doi.org/10.1007/s10555-007-9072-0

Tarrado-Castellarnau, M., de Atauri, P., & Cascante, M. (2016). Oncogenic regulation of tumor metabolic reprogramming. *Oncotarget*, *7*(38), 62726-62753. https://doi.org/10.18632/oncotarget.10911

Tassabehji, M., Newton, V. E., & Read, A. P. (1994). Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nature Genetics*, *8*(3), 251-255. https://doi.org/10.1038/ng1194-251

Tauriello, D. V. F., Sancho, E., & Batlle, E. (2022). Overcoming TGFβ-mediated immune evasion in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *22*(1), 25-44. https://doi.org/10.1038/s41568-021-00413-6

Tempero, M. A., Pelzer, U., O'Reilly, E. M., Winter, J., Oh, D.-Y., Li, C.-P., Tortora, G., Chang, H.-M., Lopez, C. D., Bekaii-Saab, T., Ko, A. H., Santoro, A., Park, J. O., Noel, M. S., Frassineti, G. L., Shan, Y.-S., Dean, A., Riess, H., Van Cutsem, E., … APACT Investigators. (2023). Adjuvant nab-Paclitaxel + Gemcitabine in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Results From a Randomized, Open-Label, Phase III Trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *41*(11), 2007-2019. https://doi.org/10.1200/JCO.22.01134

Thienpont, B., Van Dyck, L., & Lambrechts, D. (2016). Tumors smother their epigenome. *Molecular & Cellular Oncology*, *3*(6), e1240549. https://doi.org/10.1080/23723556.2016.1240549

Thomas, A. J., & Erickson, C. A. (2009). FOXD3 regulates the lineage switch between neural crest-derived glial cells and pigment cells by repressing MITF through a non-canonical mechanism. *Development (Cambridge, England)*, *136*(11), 1849-1858. https://doi.org/10.1242/dev.031989

Thomas, S., Izard, J., Walsh, E., Batich, K., Chongsathidkiet, P., Clarke, G., Sela, D. A., Muller, A. J., Mullin, J. M., Albert, K., Gilligan, J. P., DiGuilio, K., Dilbarova, R., Alexander, W., & Prendergast, G. C. (2017). The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. *Cancer Research*, *77*(8), 1783-1812. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2929

Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2015). Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer cell*, *27*(4), 450-461. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.001

Torres, C. M., Biran, A., Burney, M. J., Patel, H., Henser-Brownhill, T., Cohen, A.-H. S., Li, Y., Ben-Hamo, R., Nye, E., Spencer-Dene, B., Chakravarty, P., Efroni, S., Matthews, N., Misteli,

T., Meshorer, E., & Scaffidi, P. (2016). The linker histone H1.0 generates epigenetic and functional intratumor heterogeneity. *Science (New York, N.Y.)*, *353*(6307), aaf1644. https://doi.org/10.1126/science.aaf1644

Toussi, A., Mans, N., Welborn, J., & Kiuru, M. (2020). Germline mutations predisposing to melanoma. *Journal of Cutaneous Pathology*, *47*(7), 606-616. https://doi.org/10.1111/cup.13689

Ullrich, N., Löffek, S., Horn, S., Ennen, M., Sánchez-Del-Campo, L., Zhao, F., Breitenbuecher, F., Davidson, I., Singer, B. B., Schadendorf, D., Goding, C. R., & Helfrich, I. (2015). MITF is a critical regulator of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) in malignant melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *28*(6), 736-740. https://doi.org/10.1111/pcmr.12414

Umansky, V., & Sevko, A. (2012). Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization. *Seminars in Cancer Biology*, *22*(4), 319-326. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.02.003

Van Heek, N. T., Meeker, A. K., Kern, S. E., Yeo, C. J., Lillemoe, K. D., Cameron, J. L., Offerhaus, G. J. A., Hicks, J. L., Wilentz, R. E., Goggins, M. G., De Marzo, A. M., Hruban, R. H., & Maitra, A. (2002). Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *The American Journal of Pathology*, *161*(5), 1541-1547. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64432-X

Vance, K. W., & Ponting, C. P. (2014). Transcriptional regulatory functions of nuclear long noncoding RNAs. *Trends in Genetics*, *30*(8), 348-355. https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.06.001

Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, *324*(5930), 1029-1033. https://doi.org/10.1126/science.1160809

Vaupel, P., & Multhoff, G. (2021). Revisiting the Warburg effect: Historical dogma versus current understanding. *The Journal of Physiology*, *599*(6), 1745-1757. https://doi.org/10.1113/JP278810

Vazquez, F., Lim, J. H., Chim, H., Bhalla, K., Girnun, G., Pierce, K., Clish, C. B., Granter, S. R., Widlund, H. R., Spiegelman, B. M., & Puigserver, P. (2013). PGC1α expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell*, *23*(3), 287-301. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.020

Verfaillie, A., Imrichova, H., Atak, Z. K., Dewaele, M., Rambow, F., Hulselmans, G., Christiaens, V., Svetlichnyy, D., Luciani, F., Van den Mooter, L., Claerhout, S., Fiers, M., Journe, F., Ghanem, G.-E., Herrmann, C., Halder, G., Marine, J.-C., & Aerts, S. (2015). Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nature Communications*, *6*, 6683. https://doi.org/10.1038/ncomms7683

Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., & Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *Lancet (London, England)*, *378*(9791), 607-620. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0

Vivier, E., & Malissen, B. (2005). Innate and adaptive immunity: Specificities and signaling hierarchies revisited. *Nature Immunology*, *6*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/ni1153

Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M., & Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science (New York, N.Y.)*, *331*(6013), 44-49. https://doi.org/10.1126/science.1198687

Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S. A., Ma, W. W., Saleh, M. N., Harris, M., Reni, M., Dowden, S., Laheru, D., Bahary, N., Ramanathan, R. K., Tabernero, J., Hidalgo, M., Goldstein, D., … Renschler, M. F. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England Journal of Medicine*, *369*(18), 1691-1703. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304369

Waaler, J., Mygland, L., Tveita, A., Strand, M. F., Solberg, N. T., Olsen, P. A., Aizenshtadt, A., Fauskanger, M., Lund, K., Brinch, S. A., Lycke, M., Dybing, E., Nygaard, V., Bøe, S. L., Heintz, K.-M., Hovig, E., Hammarström, C., Corthay, A., & Krauss, S. (2020). Tankyrase inhibition sensitizes melanoma to PD-1 immune checkpoint blockade in syngeneic mouse models. *Communications Biology*, *3*(1), 196. https://doi.org/10.1038/s42003-020-0916-2

Waldhauer, I., Goehlsdorf, D., Gieseke, F., Weinschenk, T., Wittenbrink, M., Ludwig, A., Stevanovic, S., Rammensee, H.-G., & Steinle, A. (2008). Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Research*, *68*(15), 6368-6376. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6768

Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92(12), 5510-5514. https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5510

Wang, J. X., Fukunaga-Kalabis, M., & Herlyn, M. (2016). Crosstalk in skin: Melanocytes, keratinocytes, stem cells, and melanoma. *Journal of Cell Communication and Signaling*, *10*(3), 191-196. https://doi.org/10.1007/s12079-016-0349-3

Wang, R., He, Y., Robinson, V., Yang, Z., Hessler, P., Lasko, L. M., Lu, X., Bhathena, A., Lai, A., Uziel, T., & Lam, L. T. (2018). Targeting Lineage-specific MITF Pathway in Human Melanoma Cell Lines by A-485, the Selective Small-molecule Inhibitor of p300/CBP. *Molecular Cancer Therapeutics*, *17*(12), 2543-2550. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0511

Wang, S., Zheng, Y., Yang, F., Zhu, L., Zhu, X. Q., Wang, Z. F., Wu, X. L., Zhou, C. H., Yan, J. Y., Hu, B. Y., Kong, B., Fu, D. L., Bruns, C., Zhao, Y., Qin, L. X., & Dong, Q. Z. (2021). The molecular biology of pancreatic adenocarcinoma: Translational challenges and clinical

perspectives. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 249. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00659-4

Wang, X., Teng, F., Kong, L., & Yu, J. (2016). PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *OncoTargets and therapy*, *9*, 5023-5039. https://doi.org/10.2147/OTT.S105862

Wang-Gillam, A., Li, C.-P., Bodoky, G., Dean, A., Shan, Y. S., Jameson, G., Macarulla, T., Lee, K. H., Cunningham, D., Blanc, J. F., Hubner, R. A., Chiu, C. F., Schwartsmann, G., Siveke, J. T., Braiteh, F., Moyo, V., Belanger, B., Dhindsa, N., Bayever, E., … NAPOLI-1 Study Group. (2016). Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): A global, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, *387*(10018), 545-557. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00986-1

Wani, A. K., Akhtar, N., Mir, T. U. G., Singh, R., Jha, P. K., Mallik, S. K., Sinha, S., Tripathi, S. K., Jain, A., Jha, A., Devkota, H. P., & Prakash, A. (2023). Targeting Apoptotic Pathway of Cancer Cells with Phytochemicals and Plant-Based Nanomaterials. *Biomolecules*, *13*(2), 194. https://doi.org/10.3390/biom13020194

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)*, *123*(3191), 309-314. https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309

Waters, A. M., & Der, C. J. (2018). KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *8*(9), a031435. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031435

Wellbrock, C., & Arozarena, I. (2015). Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *28*(4), 390-406. https://doi.org/10.1111/pcmr.12370

Wellbrock, C., Rana, S., Paterson, H., Pickersgill, H., Brummelkamp, T., & Marais, R. (2008). Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PloS One*, *3*(7), e2734. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002734

Widlund, H. R., Horstmann, M. A., Price, E. R., Cui, J., Lessnick, S. L., Wu, M., He, X., & Fisher, D. E. (2002). Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *The Journal of Cell Biology*, *158*(6), 1079-1087. https://doi.org/10.1083/jcb.200202049

Wong, S. H. M., Fang, C. M., Chuah, L. H., Leong, C. O., & Ngai, S. C. (2018). E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *121*, 11-22. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.11.010

Wu, Z., Connolly, J., & Biggar, K. K. (2017). Beyond histones – the expanding roles of protein lysine methylation. *The FEBS Journal*, *284*(17), 2732-2744. https://doi.org/10.1111/febs.14056

Xie, Z., & Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: Core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, *9*(10), 1102-1109. https://doi.org/10.1038/ncb1007-1102

Xing, S., & Ferrari de Andrade, L. (2020). NKG2D and MICA/B shedding: A 'tag game' between NK cells and malignant cells. *Clinical & Translational Immunology*, *9*(12), e1230. https://doi.org/10.1002/cti2.1230

Xu, W., Gong, L., Haddad, M. M., Bischof, O., Campisi, J., Yeh, E. T., & Medrano, E. E. (2000). Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. *Experimental Cell Research*, *255*(2), 135-143. https://doi.org/10.1006/excr.2000.4803

Yan, X., Hu, Z., Feng, Y., Hu, X., Yuan, J., Zhao, S. D., Zhang, Y., Yang, L., Shan, W., He, Q., Fan, L., Kandalaft, L. E., Tanyi, J. L., Li, C., Yuan, C.-X., Zhang, D., Yuan, H., Hua, K., Lu, Y., … Zhang, L. (2015). Comprehensive Genomic Characterization of Long Non-coding RNAs across Human Cancers. *Cancer Cell*, *28*(4), 529-540. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.006

Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J. M., Dell'antonio, G., Mautner, J., Tonon, G., Haigis, M., Shirihai, O. S., Doglioni, C., Bardeesy, N., & Kimmelman, A. C. (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes & Development*, *25*(7), 717-729. https://doi.org/10.1101/gad.2016111

Yang, Y., & Bedford, M. T. (2013). Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *13*(1), 37-50. https://doi.org/10.1038/nrc3409

Yasumoto, K., Takeda, K., Saito, H., Watanabe, K., Takahashi, K., & Shibahara, S. (2002). Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. *The EMBO Journal*, *21*(11), 2703-2714. https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2703

Yasumoto, K., Yokoyama, K., Shibata, K., Tomita, Y., & Shibahara, S. (1994). Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(12), 8058-8070. https://doi.org/10.1128/mcb.14.12.8058-8070.1994

Ying, H., Dey, P., Yao, W., Kimmelman, A. C., Draetta, G. F., Maitra, A., & DePinho, R. A. (2016). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development*, *30*(4), 355-385. https://doi.org/10.1101/gad.275776.115

Ying, H., Kimmelman, A. C., Lyssiotis, C. A., Hua, S., Chu, G. C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J. W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J. L., Yan, H., Wang, W., Chen, S., Viale, A., Zheng, H., Paik, J., Lim, C., Guimaraes, A. R., Martin, E. S., … DePinho, R. A. (2012).

Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*, *149*(3), 656-670. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.058

Yoshida, G. J. (2015). Metabolic reprogramming: The emerging concept and associated therapeutic strategies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, *34*, 111. https://doi.org/10.1186/s13046-015-0221-y

Yuan, S., Norgard, R. J., & Stanger, B. Z. (2019). Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discovery*, *9*(7), 837-851. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0015

Zeng, H., Judson-Torres, R. L., & Shain, A. H. (2020). The Evolution of Melanoma—Moving beyond Binary Models of Genetic Progression. *The Journal of Investigative Dermatology*, *140*(2), 291-297. https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.08.002

Zhang, E., & Xu, H. (2017). A new insight in chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology*, *10*(1), 1. https://doi.org/10.1186/s13045-016-0379-6

Zhang, J., Liu, J., Sun, J., Chen, C., Foltz, G., & Lin, B. (2014). Identifying driver mutations from sequencing data of heterogeneous tumors in the era of personalized genome sequencing. *Briefings in Bioinformatics*, *15*(2), 244-255. https://doi.org/10.1093/bib/bbt042

Zhang, L., Sanderson, S. O., Lloyd, R. V., & Smyrk, T. C. (2007). Pancreatic intraepithelial neoplasia in heterotopic pancreas: Evidence for the progression model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, *31*(8), 1191-1195. https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31806841e1

Zhang, T., Zhou, Q., Ogmundsdottir, M. H., Möller, K., Siddaway, R., Larue, L., Hsing, M., Kong, S. W., Goding, C. R., Palsson, A., Steingrimsson, E., & Pignoni, F. (2015). Mitf is a master regulator of the v-ATPase, forming a control module for cellular homeostasis with v-ATPase and TORC1. *Journal of Cell Science*, *128*(15), 2938-2950. https://doi.org/10.1242/jcs.173807

Zhang, Y., & Wang, X. (2020). Targeting the Wnt/β-catenin signaling pathway in cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, *13*(1), 165. https://doi.org/10.1186/s13045-020-00990-3

Zhang, Y., & Xiong, Y. (2001). Control of p53 Ubiquitination and Nuclear Export by MDM2 and ARF1. *Cell Growth & Differentiation*, *12*(4), 175-186.

Zhang, Y., & Zhang, Z. (2020). The history and advances in cancer immunotherapy: Understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cellular & Molecular Immunology*, *17*(8), 807-821. https://doi.org/10.1038/s41423-020-0488-6

Zhao, H., & Zheng, B. (2019). Dual Targeting of Autophagy and MEK in KRAS Mutant Cancer. *Trends in Cancer*, *5*(6), 327-329. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.04.003

Zhao, Z., & Liu, W. (2020). Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *Technology in Cancer Research & Treatment*, *19*, 1533033820962117. https://doi.org/10.1177/1533033820962117

Zhu, S. Y., & Yu, K. D. (2022). Breast Cancer Vaccines: Disappointing or Promising? *Frontiers in Immunology*, *13*, 828386. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.828386

Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., & Sabatini, D. M. (2011). mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science (New York, N.Y.)*, *334*(6056), 678-683. https://doi.org/10.1126/science.1207056

Zou, W., Wolchok, J. D., & Chen, L. (2016). PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Science Translational Medicine*, *8*(328), 328rv4. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad7118

**Recursos electrónicos:**

- ATCC: https://www.atcc.org/
- Cellosaurus: https://www.cellosaurus.org/
- Cistrome: http://cistrome.org/
- Enclave de ciencia: https://enclavedeciencia.rae.es/contenidos/inicio
- Ensembl: https://www.ensembl.org/index.html
- GLOBOCAN: https://gco.iarc.fr/
- *McMaster Pathophysiology Review*: http://www.pathophys.org/melanoma/
- *National Cancer Institute:* https://www.cancer.gov/
- *National Cancer Institute Visuals Online:* https://visualsonline.cancer.gov/
- REDECAN: https://redecan.org/es
- TCGA: https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga
- *Vector Stock*: https://www.vectorstock.com/