

Universitat de Lleida

TESI DOCTORAL

Modulació de l'autofàgia com a nova estratègia terapèutica en el melanoma. Estudi de les resistències a fàrmacs convencionals.

Carla Barceló Gómez

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida
Programa de Doctorat en Salut

Directores

Rosa M^a Martí Laborda
Anna Macià Armengol

Tutora

Rosa M^a Martí Laborda

Lleida, 2019

“Res no s’acaba, tot comença”

J.V. Foix

Als meus Pares,
A la meva Germana,
Als Tiets,
A n’Arturo.

AGRAÏMENTS

RESUMS

RESUM

El melanoma és una neoplàsia maligna derivada dels melanòcits que, un cop disseminada, desenvolupa una gran resistència a la quimioteràpia i s'associa amb un mal pronòstic. Al voltant del 50% dels melanomes porten la mutació BRAF^{V600E}. Els inhibidors de la quinasa BRAF, com el Vemurafenib, redueixen la càrrega tumoral en el melanoma disseminat. No obstant això, la resistència adquirida es produeix molt sovint i els tumors comencen a progressar sota el tractament. En estudis anteriors, hem demostrat que els canals de calci tipus T (TTCCs) estan sobreexpressats en cèl·lules de melanoma i tenen un paper important en la progressió tumoral. A més, hem descrit que els inhibidors farmacològics dels TTCCs (Mibefradil i Pimozide) redueixen la proliferació i desregulen l'autofàgia induint apoptosi. En la secció de resultats previs, hem analitzat el paper de l'autofàgia durant la migració i invasió en el melanoma. El TTCC Cav3.1 i la proteïna LC3II estan altament expressats en els melanomes BRAF^{V600E} en comparació amb les línies cel·lulars o biòpsies que presenten la mutació NRAS^{Q61}. Per altra banda, hem constatat que el bloqueig farmacològic o el silenciament gènic dels TTCCs i la Cloroquina, inhibeixen el flux autofàgic i dificulten les capacitats d'invasió i migració cel·lulars, específicament en cèl·lules de melanoma amb la mutació BRAF^{V600E}. Atès que Snail1 és un factor de transcripció amb un paper important en la motilitat i la invasió de les cèl·lules de melanoma, hem demostrat que Snail1 està fortament expressat en les línies cel·lulars i en biòpsies de melanoma BRAF^{V600E} i la seva expressió disminueix quan l'autofàgia està bloquejada.

En la primera part del treball, hem investigat l'impacte de la inhibició dels TTCCs en melanomes BRAF^{V600E} resistents a Vemurafenib. Els resultats indiquen que els nivells de TTCC Cav3.1 estan incrementats en totes les línies cel·lulars resistents a Vemurafenib i en biòpsies de melanoma humà en comparació amb les seves parentals corresponents. A més, tant en les cèl·lules resistents com en les biòpsies, s'han observat nivells proteics de LC3 superiors, resultant en un augment de l'autofàgia basal. Particularment, l'inhibidor dels TTCCs, Mibefradil, induïx apoptosi i disminueix les taxes de migració i invasió mitjançant el bloqueig de l'autofàgia també en les cèl·lules resistents *in vitro* i en *xenografts* de ratolins *in vivo*. Per altra banda, la teràpia combinada (Vem + Mib) redueix o manté la viabilitat cel·lular i les taxes de migració i invasió segons l'estat funcional de PTEN. Així doncs, quan PTEN no és funcional, s'observa un retràs en la inducció de mort i la inhibició de la migració cel·lular amb la teràpia combinada en les línies resistents a Vemurafenib. Finalment, l'exposició combinada de Mibefradil i Vemurafenib impedeix el desenvolupament de línies de melanoma BRAF^{V600E} resistents a inhibidors de BRAF. En conjunt, els nostres resultats suggereixen que els TTCCs podrien ser dianes terapèutiques vàlides en melanomes ja resistents a Vemurafenib i obren la porta a explorar la inhibició dels TTCCs com estratègia per evitar l'adquisició de resistències a aquest inhibidor de BRAF.

En la segona part d'aquest treball, hem avaluat el potencial terapèutic de l'anticòs neutralitzant de M-CSF durant l'adquisició de resistència de les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} mitjançant l'ús de medis condicionats. El secretoma dels medis de cultius de cèl·lules resistents a Vemurafenib induïx resistència al tractament i modula el fenotip de les cèl·lules parentals. A més, hem observat que el secretoma de les cèl·lules resistents presenta un increment de la secreció de citoquines pro-tumorals, entre les que s'inclou M-CSF, la qual promou l'adquisició de resistència en melanomes BRAF^{V600E} amb PTEN no funcional (*knockout* o mutació). Per altra banda, el plasma de ratolins amb tumors subcutanis de cèl·lules resistents, induïx un fenotip de resistència a les cèl·lules parentals *in vitro*. En conseqüència, la neutralització de la citoquina M-CSF, mitjançant l'anticòs monoclonal, inhibeix l'adquisició del fenotip de resistència en les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} amb PTEN no funcional.

RESÚMEN

El melanoma es una neoplasia maligna derivada de los melanocitos que, una vez diseminada, desarrolla una gran resistencia a la quimioterapia y se asocia con un mal pronóstico. Alrededor del 50% de los melanomas llevan la mutación BRAF^{V600E}. Los inhibidores de la quinasa BRAF, como Vemurafenib, reducen la carga tumoral en el melanoma diseminado. Sin embargo, la adquisición de resistencia se produce muy a menudo y los tumores comienzan a progresar bajo el tratamiento. En estudios anteriores, hemos demostrado que los canales de calcio tipo T (TTCCs) están sobreexpresados en células de melanoma y tienen un papel importante en la progresión tumoral. Además, hemos descrito que los inhibidores farmacológicos de los TTCCs (Mibefradil y Pimozide) reducen la proliferación y desregulan la autofagia induciendo apoptosis. En la sección de resultados previos, hemos analizado el papel de la autofagia durante la migración e invasión en el melanoma. El TTCC Cav3.1 y la proteína LC3II están altamente expresados en los melanomas BRAF^{V600E} en comparación con las líneas o biopsias que presentan la mutación NRAS^{Q61}. El bloqueo farmacológico o el silenciamiento génico de los TTCCs y la Cloroquina, inhiben el flujo autofágico y dificultan las capacidades de migración e invasión, específicamente en células de melanoma BRAF^{V600E}. Dado que Snail1 tiene un papel importante en la motilidad y la invasión de las células de melanoma, hemos demostrado que Snail1 está fuertemente expresado en las líneas celulares y biopsias de melanoma BRAF^{V600E} y su expresión disminuye cuando la autofagia está bloqueada.

En la primera parte del trabajo, hemos investigado el impacto de la inhibición de los TTCCs en melanomas BRAF^{V600E} resistentes a Vemurafenib. Los resultados indican que los niveles de TTCC Cav3.1 están incrementados en todas las líneas celulares resistentes a Vemurafenib y en biopsias de melanoma humano en comparación con sus parentales correspondientes. Además, tanto en las células resistentes como en las biopsias, se observaron niveles proteicos de LC3 superiores, resultando en un aumento de la autofagia basal. Particularmente, el inhibidor de los TTCCs, Mibefradil, induce apoptosis y disminuye las tasas de migración mediante el bloqueo de la autofagia también en las células resistentes *in vitro* y en *xenografts* de ratones *in vivo*. Por otra parte, la terapia combinada (Vem + Mib) reduce o mantiene la viabilidad celular y las tasas de migración e invasión según el estado funcional de PTEN. Así pues, cuando PTEN no es funcional, se observa un retraso en la inducción de muerte y la inhibición de la migración celular con la terapia combinada en las líneas resistentes a Vemurafenib. Finalmente, el Mibefradil inhibe la adquisición de resistencia en las células de melanoma BRAF^{V600E} en combinación con Vemurafenib. En conjunto, nuestros resultados sugieren que los TTCCs podrían ser dianas terapéuticas válidas en melanomas ya resistentes a Vemurafenib y abren la puerta a explorar la inhibición de los TTCCs como estrategia para evitar la adquisición de resistencias a este inhibidor de BRAF.

En la segunda parte, hemos evaluado el potencial terapéutico del anticuerpo neutralizante de M-CSF durante la adquisición de resistencia de las células de melanoma BRAF^{V600E} mediante el uso de medios condicionados. El secretoma de los cultivos celulares de células resistentes a Vemurafenib induce resistencia al tratamiento y modula el fenotipo de las células parentales. Además, hemos observado que el secretoma de las células resistentes presenta un incremento de la secreción de citoquinas pro-tumorales entre las que se incluye M-CSF, que promueve la adquisición de resistencia en melanomas BRAF^{V600E} con PTEN no funcional (*knockout* o mutación). Además, el plasma de ratones con tumores subcutáneos de células resistentes, induce un fenotipo de resistencia a las células parentales *in vitro*. En consecuencia, la neutralización de M-CSF, mediante el anticuerpo monoclonal, inhibe la adquisición del fenotipo de resistencia en las células de melanoma BRAF^{V600E} con PTEN no funcional.

ABSTRACT

Melanoma is a malignant neoplasia derived from melanocytes that once disseminated becomes highly resistant to chemotherapy and is associated with poor prognosis. Around 50% of melanomas carry the BRAF^{V600E} mutation. Targeting BRAF mutant kinase by inhibitors, such as Vemurafenib, reduce tumor burden in disseminated melanoma. However, acquired resistance very frequently develops and tumors begin to progress under treatment. In previous studies, we have reported that T-type calcium channels (TTCCs) are overexpressed in melanoma cells and play an important role in melanoma progression. Importantly, TTCC pharmacological blockers (Mibefradil and Pimozide) reduce proliferation and deregulate autophagy leading to apoptosis. Therefore, in the previous results section, we analyzed the role of autophagy during migration and invasion processes of melanoma cells. TTCCs Cav3.1 and LC3II protein are highly expressed in BRAF^{V600E} both in cell lines and biopsies compared to NRAS^{Q61} mutant melanomas. Pharmacological blockade or gene silencing of TTCCs and Chloroquine, inhibit the autophagic flux and impair the migration and invasion capabilities, specifically in BRAF^{V600E} melanoma cells. Because of Snail1 plays an important role in motility and invasion of melanoma cells, we showed that Snail1 is strongly expressed in BRAF^{V600E} melanoma cells and patient biopsies, and its expression decreases when autophagy is blocked.

In the first part of this work, we investigated the impact of inhibiting TTCCs in Vemurafenib resistant BRAF^{V600E} melanomas. The results indicate that TTCC Cav3.1 is highly expressed in all Vemurafenib resistant melanoma cell lines and human melanoma biopsies compared to their parental counterparts. Besides, in Vemurafenib resistant cells or biopsies, we observed higher LC3 protein levels, in turn, increased autophagy. Particularly, TTCC blocker, Mibefradil, induces apoptosis and impaires migration rates while inhibiting autophagy in Vemurafenib resistant cells cells *in vitro* and in mouse xenografts *in vivo*. In addition, combination therapy (Vem+Mib) reduced or restored cell viability and migration/invasion rates depending on PTEN status. Therefore, when PTEN is non-functional, there is a delay in the death induction and an inhibition of cell migration in combination therapy in Vemurafenib resistant cell lines. Finally, Mibefradil inhibits the acquisition of resistance in BRAF^{V600E} melanoma cells in combination with Vemurafenib. Taken together, our results suggest TTCCs as targetable in Vemurafenib resistant BRAF^{V600E} melanomas and open the possibility to explore TTCC inhibition as a tool to avoid the acquisition of resistance to this BRAF inhibitor.

In the second part of the present word, we have evaluated the therapeutic potential of M-CSF neutralizing antibody during resistance acquisition to BRAFi of BRAF^{V600E} melanoma cells by conditioned media. First, supernatant of cell cultures from resistant melanomas induces therapy resistance and modulates the phenotype of parental cells. Furthermore, we have observed that Vemurafenib resistant secretoma presents an increase of pro-tumor cytokines secretion, including M-CSF that promotes the acquisition of resistance in BRAF^{V600E} melanomas with loss of PTEN (*knockout* o mutation). On the other hand, plasma mice from subcutaneous tumors of resistant cells induce a resistant phenotype in cultured parental cells. Consequently, M-CSF neutralization by monoclonal antibody inhibits resistance development in BRAF^{V600E} melanomas with non-functional PTEN.

ÍNDEX

ÍNDEX

ABREVIATURES	5
INTRODUCCIÓ	11
1. MELANOMA	11
1.1 Melanoma: Introducció.....	11
1.2 Epidemiologia del melanoma.....	12
1.3 Factors de risc en el melanoma.....	16
1.4 Tipus de melanomes primaris.....	19
1.5 Progressió del melanoma.....	21
1.6 Estadiatge i pronòstic del melanoma.....	24
1.7 Mutacions somàtiques i alteracions moleculars més prevalents en el melanoma.....	27
1.8 Tractament del melanoma.....	31
1.9 Mecanismes de resistència als inhibidors de BRAF ^{V600}	37
2. AUTOFÀGIA	43
2.1 Homòstasi cel·lular.....	43
2.2 Macroautofàgia.....	43
2.3 Regulació de l'autofàgia.....	49
2.4 Autofàgia en càncer.....	54
2.4.1 Autofàgia com a supressor tumoral.....	55
2.4.2 Autofàgia en la progressió tumoral.....	56
2.4.3 Autofàgia com un mecanisme de resistència a les teràpies establertes.....	57
2.4.4 Autofàgia i microambient tumoral.....	59
2.4.5 Interacció entre l'Autofàgia i l'Apoptosi cel·lular.....	59
2.5 Autofàgia en el melanoma primari, metastàtic i de recurrència.....	61
2.6 Inhibició de l'Autofàgia com a estratègia terapèutica.....	64
3. CANALS DE CALCI DE TIPUS T (TTCCs)	65
3.1 Senyalització per Ca ²⁺ en el melanoma.....	65
3.2 VGCCs: Estructura, tipus i propietats.....	66
3.3 Canals de Calci de Tipus T (TTCCs) i melanoma.....	67
3.4 Inhibidors farmacològics dels TTCCs: Implicacions terapèutiques.....	69
4. SECRETOMA I MICROAMBIENT TUMORAL EN EL MELANOMA	72
4.1 Microambient del melanoma.....	72
4.2 Interaccions intercel·lulars en el microambient del melanoma.....	74
4.3 Secreció de citoquines i microambient tumoral del melanoma.....	78
4.4 Modulació del secretoma en la resistència terapèutica.....	82
5. RESULTATS PREVIS	88
HIPÒTESIS I OBJECTIUS	117
MATERIALS I MÈTODES	119
1. Tècniques de Biologia Cel·lular	119
1.1 Cultius cel·lulars.....	119
1.2 Assajos de proliferació <i>in vitro</i> i viabilitat cel·lular.....	122
1.3 Assajos de migració i invasió cel·lular.....	125
1.4 Tractaments i drogues per als experiments <i>in vitro</i>	128
1.5 Producció de lentivirus i infecció.....	128
1.6 Transfecció amb Lipofectamina del plàsmid ptf-LC3.....	130
2. Tècniques de Bioquímica i Biologia Molecular	131
2.1 Construccions plasmídiques.....	131

Índex

2.2	Anàlisi de l'expressió gènica	133
2.3	Immunodetecció de proteïnes.....	136
3.	Aïllament i purificació d'exosomes.....	142
4.	Immunohistoquímia (IHC) i TMA (Tissue Microarray)	143
4.1	Histologia bàsica i Preparació de les biòpsies.....	143
4.2	Construcció de TMA.....	143
4.3	Immunohistoquímica	144
4.4	Avaluació dels resultats de l'anàlisi immunohistoquímic.....	145
5.	Animals d'experimentació	146
5.1	Consideracions prèvies	146
5.2	Ratolins SCID	146
5.3	Establiment de tumors subcutanis en ratolins SCID	147
5.4	Tractaments farmacològics <i>in vivo</i>	147
5.5	Extracció de plasma de ratolí	148
6.	Eines bioinformàtiques	149
RESULTATS.....		151
1.	Creació i caracterització de línies cel·lulars de melanoma humà BRAF ^{V600E} resistents a Vemurafenib. Anàlisi de l'efecte dels inhibidors (Mibefradil) dels TTCCs sobre l'autofàgia i la mort cel·lular així com sobre els processos de migració i invasió	151
2.	Estudi del secretoma de les línies cel·lulars de melanoma metastàtic BRAF ^{V600E} resistents a Vemurafenib	183
DISCUSSIÓ.....		209
CONCLUSIONS.....		225
BIBLIOGRAFIA		227
ANNEX		249

ABREVIATURES

ABREVIATURES

A

AJCC *American Joint Committee on Cancer*

ALM *Acral lentiginous melanoma*

AMP *Adenosine monophosphate*

AMPK *AMP-activated protein kinase*

ATG *Autophagy related genes*

ATP *Adenosine triphosphate*

B

BECN1 *Beclin1*

BRAFi *BRAF inhibitors*

BSA *Bovine serum albumin*

C

Ca²⁺ *Ionized Calcium*

CAF *Cancer-associated fibroblast*

CaM *Calmodulin*

CCND1 *Cyclin D1 gene*

CQ *Chloroquine*

CDK *Cyclin-dependent kinase*

CDKN2A *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*

CSCs *Cancer stem-like cells*

Abreviatures

CSFR *Macrophage colony-stimulating factor receptor*

D

DAMP *Damage-associated molecular patterns*

DAPK *Death-associated protein kinase*

DC *Dendritic cells*

DRAMs *Damage-regulated autophagy modulators*

DTIC *Dacarbazine*

DMSO *Dimethyl sulfoxide*

E

EGF *Epidermal growth factor*

ECO *European Cancer Observatory*

EGFR *Human epidermal growth factor receptor*

EMT *Epithelial-mesenchymal transition*

ER *Endoplasmic reticulum*

ERK *Extracellular signal-regulated kinase*

F

FDA *Food and Drug Administration*

FBS *Fetal bovine serum*

FFPE *Formalin-fixed paraffin-embedded*

FGF *Fibroblast growth factor*

FGFR *Fibroblast growth factor receptor*

FU *Fluorouracil*

G

G-CSF *Granulocyte colony-stimulating factor*

GM-CSF *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GSEA *Gene Set Enrichment Analysis*

H

HCQ *Hidroxicloroquine*

HE *Hematoxilin-eosin*

HGF *Hepatocyte growth factor*

I

ICQ *Immunocytochemistry*

IFN *Interferon*

IGF *Insulin growth factor*

IGFR *Insulin growth factor receptor*

IHC *Immunohistochemistry*

IP3 *Inositol 3, 4, 5 triphosphayye*

IP3R *Inositol triphosphate receptor*

L

LC3 *Autophagic mamifer ATG8 protein*

LMM *Lentigo malignant melanoma*

LVA *Low voltaje-activated*

M

MAPK *Mitogen-activated protein kinase*

Abreviatures

MC1R	<i>Melanocortin 1 Receptor</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MDM2	<i>Murine Double Minute 2</i>
MDSC	<i>Myeloid derived suppressor cells</i>
MEKi	<i>MEK inhibitors</i>
MERTK	<i>c-mer proto-oncogene tyrosine kinase</i>
Mib	<i>Mibefradil</i>
MITF	<i>Microphthalmia-associated Transcription Factor</i>
mLST8	<i>Mammalian Lethal with SEC13 protein 8</i>
MMPs	<i>Matrix metalloproteinases</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
mTORC	<i>Mammalian target of rapamycin complex</i>
MTT	<i>Dimethylthiazol-diphenylformazan</i>
N	
NF1	<i>Neurofibromatosis type 1</i>
NM	<i>Nodular melanoma</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
O	
OS	<i>Overall Survival</i>
P	
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PDT	<i>Photodynamic therapy</i>
PFS	<i>Progression free survival</i>
Pim	<i>Pimozide</i>
PIP2	<i>Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
pRB	<i>Retinoblastoma Protein</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Q	
QCSOL	<i>Queensland Cancer Statistics Online</i>
R	
RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RAPA	<i>Rapamycin</i>
RAPTOR	<i>Regulatory-Associated Protein of mTOR</i>
RGP	<i>Radial Growth Phase</i>
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i>
S	
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SNARE	<i>Soluble NSF attachment protein</i>
SSMM	<i>Superficial spreading malignant melanoma</i>
SQSTM1	<i>Sequestome-1</i>

Abreviatures

T

TAMs *Tumor-associated macrophages*

TGF- β *Transforming growth factor*

TMA *Tissue Microarray*

TNF *Tumoral necrosis factor*

TNM *Classification of Malignant Tumors*

TTCCs *T-type calcium channels*

TKI *Tyrosine kinase inhibitors*

U

UICC *Union for International Cancer Control*

ULK1/2 *Unc-51-like kinase 1/2*

UV *Ultraviolet light*

V

VEGF *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR *Vascular endothelial growth factor receptor*

VGCCs *Voltage-gated calcium channels*

Vem *Vemurafenib*

VGP *Vertical growth phase*

W

WB *Western Blot*

WT *Wild-type*

INTRODUCCIÓ

1. MELANOMA

1.1 Melanoma: Introducció

El melanoma cutani és una neoplàsia maligna derivada dels melanòcits epidèrmics. Els melanòcits s'originen a la cresta neural i durant el desenvolupament embrionari migren cap a l'epidermis i el fol·licle pilós on s'especialitzen en la producció de melanina, el principal pigment responsable de la coloració de la pell i els cabells. Els melanòcits doncs, són les cèl·lules pigmentàries de la pell. Tenen una morfologia dendrítica amb prolongacions que s'estenen entre els queratinòcits des de la capa basal fins a les altres capes de l'epidermis. Representen entre l'1-3% de totes les cèl·lules de la epidermis adulta (Yamaguchi and Hearing 2014).

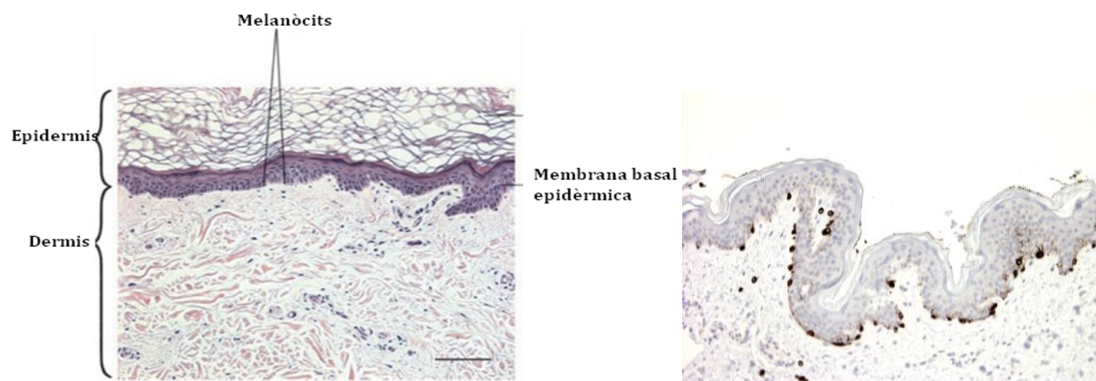


Figura 1. Representació esquemàtica de la pell normal. A la dreta s'observen amb més detall els melanòcits positius per a Melan-A (marcador de diferenciació melanocítica). *Modificat de (Chudnovsky et al. 2005).*

El **melanoma** pot sorgir *de novo* a partir de melanòcits transformats de la pell normal o a partir de nevus melanocítics congènits o adquirits preexistents. Originàriament i en un sentit ampli, es va anomenar nevus o *naevus* a lesions malformatives circumscrites de la pell o de les mucoses degudes a un desenvolupament exagerat o una hipertròfia de diferents components de les mateixes. Així, podem trobar nevus congènits de substrat molt variat com nevus epidèrmics, nevus sebàcics, nevus connectius, nevus acròmics, nevus anèmics i nevus melanocítics congènits, entre d'altres. Per extensió, el terme nevus s'ha acabat utilitzant també per les neoplàsies benignes derivades dels melanòcits, que reben el nom de nevus melanocítics adquirits. Els nevus melanocítics congènits es classifiquen segons la seva mida, i els nevus melanocítics adquirits es classifiquen, per ordre de freqüència, en nevus melanocítics comuns adquirits, nevus displàsics (clínicament atípics o nevus de Clark), nevus blau i nevus de Spitz/Reed, a part d'altres tipus molt poc habituals (Johnson 2013).

Introducció

La majoria dels melanomes (>90%) es localitzen en la pell (melanoma cutani), però també es poden observar en altres localitzacions com l'ull (especialment en la úvea), les mucoses i les meninges on també hi migren els melanòcits des de la cresta neural.

El melanoma és el tipus més letal i més greu de tots els càncers de pell. Es caracteritza per ser una neoplàsia altament invasiva i fàcilment metastatitzant, fins i tot a partir de tumors primaris de volum molt reduït (Gray-Schopfer et al. 2007), de manera que molts casos encara s'escapen del diagnòstic precoç i evolucionen cap a la disseminació. Un cop disseminat, el melanoma és altament resistent als tractaments antineoplàsics convencionals, com ara la quimioteràpia o la radioteràpia, presentant un mal pronòstic (Faião-Flores et al. 2017; Krepler et al. 2016; Pollack et al. 2011). El melanoma pot afectar a adults d'edat jove i mitjana (Ríos et al. 2013) causant una mort desproporcionada en aquesta població, ja que és responsable d'una de les taxes més altes de pèrdua de vida potencial per càncer en adults (Ekwueme et al. 2011). En definitiva, el melanoma continua sent un greu problema de salut i la investigació sobre la biologia d'aquesta patologia i les seves implicacions clíniques segueix sent un tema candent.

1.2 Epidemiologia del melanoma

El melanoma és un problema de salut a nivell mundial, ja que és un dels deu tipus de càncer més comú amb una incidència cada vegada més gran. Tot i que el melanoma només engloba el 4% de tots els càncers de pell, és responsable del 80% de les morts.

Taxa d'incidència

La seva incidència ha anat en augment al llarg de les darreres dues dècades en la població dels països industrialitzats, sobretot en les poblacions caucàsiques i depenent de la zona geogràfica (Leiter and Garbe 2008). En el 2012, segons *European Cancer Observatory* (ECO), es van diagnosticar a nivell mundial 232.000 casos nous de melanoma. La incidència més alta s'ha observat a Queensland, Austràlia, seguida de Nord Amèrica i el Nord d'Europa (Marcos-Gragera et al. 2010).

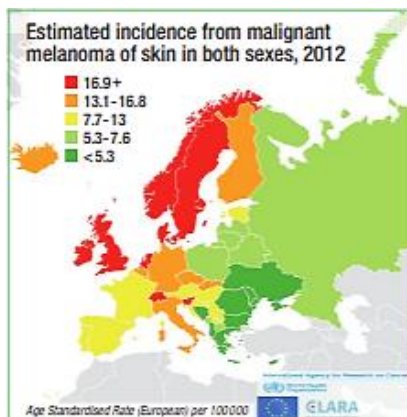


Figura 2. Incidència estimada del melanoma cutani en ambdós sexes al 2012. Extret de (*The European Cancer Observatory (ECO)*,2015).

La taxa d'incidència del melanoma varia àmpliament també en relació amb la raça. La població blanca té un risc aproximadament 10 vegades més gran de desenvolupar melanoma cutani que les poblacions negres, asiàtiques o hispàniques, i aquest risc està relacionat amb una exposició intensa i intermitent als raigs UV, a més d'una història personal de cremades solars a la pell, especialment durant la infància (Marcos-Gragera et al. 2010; Rastrelli et al. 2014). No obstant, tant les poblacions blanques com les afroamericanes tenen un risc similar al desenvolupament del melanoma plantar, mentre que els melanomes no cutanis (com el de la mucosa) són més freqüents en poblacions no blanques (Rastrelli et al. 2014).

Segons les dades obtingudes durant l'any 2007 per *National Cancer Institute*, la taxa d'incidència del melanoma cutani en la població blanca dels Estats Units era de 27,5 nous casos per 100.000 habitants, mentre que en les persones negres era d'1.1 per cada 100.000 (Rastrelli et al. 2014). En el 2014, a Austràlia es van estimar 89,5 nous casos/100.000 habitants/any en homes i 58,6 nous casos/100.000 habitants/any en dones (*Queensland Cancer Statistics Online (QCSOL)*). A Europa, el 2012, es van produir 100.300 nous casos (Ferlay et al. 2015). Els països europeus amb una taxa d'incidència major en aquest mateix any són Suïssa (25,8 nous casos/100.000 habitants/any), Noruega i Països Baixos. Tot i que les ràtios a Espanya són més baixes que en el nord d'Europa, durant els últims anys, els nous casos de melanoma han augmentat substancialment de forma accelerada (Bernal et al. 2013; Marcos-Gragera et al. 2010). Així, la incidència estimada del melanoma cutani a Espanya a l'any 2012 va ser de 8,3 nous casos/100.000 habitants/any en homes i de 9 nous casos/100.000 habitants/any en dones (European Cancer Observatory (EUCAN)

Introducció

<http://eco.iarc.fr>), mentre que a Catalunya a l'any 2016 hi varen haver 10,7 nous casos/100.000 habitants/any en homes i 11 nous casos/100.000 habitants/any en dones.

Pel que fa a la incidència del melanoma en relació amb el sexe, diferents estudis mostren resultats que no sempre són coincidents. Segons *Markovic et al.*, els homes tenen aproximadament 1,5 vegades més probabilitats de desenvolupar melanoma que les dones, mentre que d'acord amb altres estudis, als països europeus, la incidència de melanoma és més gran entre les dones. No obstant, en altres poblacions predominantment caucàsiques, com a Austràlia i els Estats Units, aquest càncer és més freqüent entre els homes (Marcos-Gragera et al. 2010; Rastrelli et al. 2014). Aquesta controvèrsia depèn de la prevalença a ambdós sexes en relació amb l'edat. La taxa d'incidència del melanoma és més intensa en les dones que en els homes fins als 40 anys, però amb 75 anys d'edat, la incidència és gairebé 3 vegades més elevada en homes respecte a les dones.

Encara que el melanoma té diferents taxes d'incidència segons l'edat, a diferència d'altres tumors sòlids, el melanoma afecta principalment a persones joves i de mitjana edat. L'edat mitjana en el moment del diagnòstic del melanoma és de 57 anys i s'ha observat que la incidència d'aquest càncer augmenta linealment després dels 25 anys fins als 50 anys, moment en que la taxa d'incidència s'estabilitza, especialment en les dones (Rastrelli et al. 2014). Els epidemiòlegs de *GlobalData* comparteixen que, a partir dels 60 anys d'edat la incidència és més alta en els homes grans en els que es solen diagnosticar melanomes més gruixuts i, per tant, més perillosos i amb major risc de disseminació (Tan 2018). A banda, tot i que el melanoma és rar en nens (es calcula que és del 1-2% de tots els casos), hi ha dades que proven que eventualment poden presentar-se amb lesions més gruixudes. Això s'ha atribuït a una major incidència de lesions atípiques i un possible retard en la presentació i el diagnòstic, a causa de la raresa d'aparició d'aquesta neoplàsia en aquest grup d'edat (Tan 2018).

A Espanya, com a la majoria de les poblacions caucàsiques, la distribució dels llocs corporals més freqüents d'aparició d'aquest tumor també depèn en gran mesura del sexe: les àrees més comunes són el tors o cos superior i l'esquena dels homes i els braços i cames per a les dones (Marcos-Gragera et al. 2010).

Taxa de mortalitat

Paral·lelament a aquest augment de la taxa d'incidència, també hi ha un increment de la taxa de mortalitat relacionada amb el melanoma, tot i que en menor grau. En general, el nombre de morts per melanoma en les poblacions blanques de pell clara a tot el món, ha augmentat en les últimes dècades (Leiter and Garbe 2008). Als Estats Units, la taxa de mortalitat va augmentar un 1,4% anualment entre 1977 i 1990. Des de 1990, ha mostrat una petita tendència a la baixa reduint-se a un 0,3% anual de 1990 a 2002. Tot i així, segons l'*American Cancer Society*, es van registrar taxes de mortalitat entre el 2011-2015 de 2,6/100.000 habitants/any. Als països europeus la màxima taxa de mortalitat estimada en el 2012 es va trobar a Noruega (5,1/100.000 habitants/any), Eslovènia (4,4/100.000 habitants/any) i Suècia (4/100.000 habitants/any) en comparació amb la mitjana europea de 2,3 morts per cada 100.000 habitants. Espanya, segons l'*Instituto Nacional de Estadística* presenta una de les taxes estandarditzades de mortalitat més baixes de la Unió Europea (1,4 per 100.000 habitants en el 2009), que suposen 864 defuncions cada any.



Figura 3. Incidència i taxa de mortalitat estimada del melanoma cutani en ambdós sexes al 2012. Extret de (The European Cancer Observatory (ECO),2015).

Introducció

Encara que la taxa de mortalitat del melanoma continua augmentant més ràpidament en comparació amb les taxes de mortalitat de la majoria dels altres càncers, en general, les taxes de mortalitat atribuïdes al melanoma romanen baixes respecte la taxa d'incidència.

Segons *Rigel et al.*, entre el 2003 i el 2007, l'edat mitjana de mort per melanoma als Estats Units va ser de 68 anys. Hi ha una major mortalitat en els homes en comparació amb les dones de la mateixa edat als Estats Units (Rastrelli 2014). Pel que fa a Catalunya, durant el període 2000-2004, la taxa de mortalitat del melanoma va ser major en homes (1,82) que en dones (1,27), traduint-se a una mitjana anual de 55 dones i 66 homes (Marcos-Gragera et al. 2010).

1.3 Factors de risc en el melanoma

L'epidemiologia del melanoma és complexa, considerant-se una malaltia multi-factorial derivada de la interacció entre l'exposició ambiental i la susceptibilitat genètica (Berwick et al. 2015; Rastrelli et al. 2014). S'han identificat una sèrie de factors de risc que en conjunt s'agrupen en tres categories: 1. Medi ambient. 2. Genètica. 3. Immunosupressió.

1) Nombrosos estudis epidemiològics mostren que el factor de risc ambiental més important per desenvolupar un melanoma és l'exposició als raigs UV, a causa del seu efecte genotòxic. L'exposició al sol es pot classificar com a exposició intermitent, crònica o acumulativa (general), i cadascuna té un efecte diferent sobre el tipus de melanoma, considerant-se un factor de risc determinant (Rastrelli et al. 2014). El mecanisme exacte i les longituds d'ona de la llum ultraviolada més crítiques continuen sent controvertits, però s'han atribuït principalment als rajos UV-B (longitud d'ona= 290-320 nm) (Chudnovsky et al. 2005; Fabo et al. 2004), sense menysprear l'acció dels UV-A (Khan et al. 2018). Hi ha una gran evidència que un patró intermitent d'exposició al sol augmenta el risc de melanoma (Fabo et al. 2004). De fet, la proporció de melanoma atribuït a l'exposició intermitent al sol s'ha estimat en més del 90% dels casos a Austràlia, Canadà, Països nòrdics, Suïssa i els Estats Units i entre el 78 i el 90% en diversos països europeus incloent el Regne Unit (Berwick et al. 2015).

El risc del melanoma es diferencia no només pel patró d'exposició al sol, sinó també per la localització anatòmica, l'edat i el fenotip de la pell. Això indica que el melanoma pot sorgir a través de múltiples vies causals. Els melanomes de cap i coll s'han relacionat amb l'exposició al sol crònica, amb edat avançada en el diagnòstic, mentre que el melanoma al tronc i les extremitats

s'associa a edats més joves i a l'exposició solar intermitent (Berwick et al. 2015; Sigall et al. 2010). Altres factors ambientals, com ara exposicions químiques, poden augmentar el risc de melanoma, però avui en dia encara es requereix investigació addicional per descriure aquest tipus d'exposicions (Berwick et al. 2015; Rastrelli et al. 2014).

Els factors hostes es refereixen a les característiques de la pigmentació (pell pàl·lida que es crema i/o desenvolupa efèlides amb facilitat amb l'exposició al sol, cabell ros o pèl-roig, ulls blaus) i el nombre i el tipus de nevus melanocítics. Aproximadament el 25% dels casos de melanoma es produeixen conjuntament amb un nevus preexistent. A més, el recompte total de nevus es correlaciona positivament amb el risc de melanoma i varia en funció del nombre, mida i tipus de nevus (comuns vs displàsics) (Berwick et al. 2015).

2) Per altra banda, la història familiar del melanoma constitueix un fort factor de risc per al desenvolupament de la patologia. En les últimes dues dècades, hi ha hagut un increment en la investigació orientada a dilucidar les bases genètiques germinals hereditàries de l'aparició del melanoma (Rastrelli et al. 2014). Els factors genètics es classifiquen com gens d'alta penetrància, gens de risc moderat o polimorfismes genètics de baix risc.

Entre els gens d'alta penetrància els primers que es varen identificar varen ser CDKN2A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A), el qual codifica per dues proteïnes diferents depenent de les seves formes d'*splicing* (p16^{INK4a} i p14^{ARF}) i CDK4. Tant p16 com p14 participen en el control negatiu del cycle cel·lular, la supressió tumoral i l'aparició de la senescència dels melanòcits (Berwick et al. 2015; Chin 2003). p16 és un inhibidor de CDK4, que s'uneix a la Ciclina D i fosforila pRB (Retinoblastoma Protein), el qual allibera els factors de transcripció E2F que promouen la transició entre les fases G1 i S del cycle cel·lular. Per tant, p16 inhibeix la proliferació dels melanòcits. En la mateixa línia, p14^{ARF} és un inhibidor de MDM2 (Murine Double Minute 2), que inhibeix la proliferació dels melanòcits a més de promoure la senescència dels mateixos. Però, per altra banda, accelera la destrucció de p53. La pèrdua de p53 comporta a la cèl·lula un desajustament en els punts de control del cycle cel·lular i en la capacitat d'induir apoptosi.

La deleció i/o mutació de CDKN2A és altament prevalent en els casos de melanoma familiar (del 25 al 40%, depenent dels criteris emprats i àrea geogràfica) (Chin 2003; Potrony et al. 2015) i comporta una desregulació severa del cycle cel·lular, afavorint la proliferació dels melanòcits i l'escapada al procés de senescència cel·lular. Només un 2% de tots els casos de melanoma a la

Introducció

població tenen mutat el gen CDKN2A, però la probabilitat de presentar la mutació és molt més gran quan hi ha una forta història familiar de melanoma o tumors primaris múltiples (Berwick et al. 2015).

Pel que fa al gen CDK4, de forma similar amb el que passa amb el gen CDKN2A, participa també en la via de supressió tumoral i s'ha descrit igualment com un gen d'alt risc per susceptibilitat en el melanoma, encara que es troba alterat en probablement menys de l'1% de les famílies afectes.

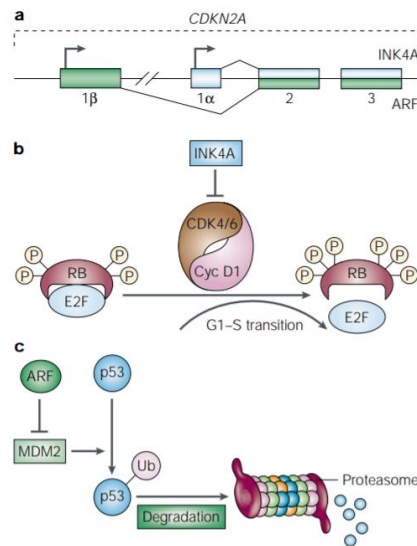


Figura 4. Transcrits del gen CDKN2A: INK4A (p16) i ARF (p14^{ARF}). Extret de (Chin 2003).

Altres gens d'alt risc pel que fa a la susceptibilitat a melanoma, més recentment descrits, però també excepcionals són BAP1, CXCL1, TERT, POT1, ACD i TERF2IP (Potrony et al. 2015).

El primer gen de susceptibilitat a melanoma de risc moderat que es va descriure és MC1R (**Melanocortin 1 Receptor**). Aquest gen s'expressa en els melanòcits i la proteïna resultant té un paper rellevant en la síntesi de melanina. Concretament, quan la proteïna està activada indueix la síntesi d'eumelanina (pigment melànic marró o negre), en canvi, quan resta poc activa es produeix feomelanina (pigment groc o vermell). Les variants al·lèliques disfuncionals en aquest gen són relativament freqüents entre la població pèl-roja i s'associen a un increment en el risc de patir melanoma, doncs l'absència d'eumelanina resta protecció contra els rajos UV en aquests individus (Rosenkranz et al. 2013).

Més recentment, s'ha identificat una variant del gen MITF (**M**icrophthalmia-associated **T**ranscription **F**actor), també considerada com de risc moderat per a l'aparició de melanoma. MITF regula diversos gens implicats en el desenvolupament de melanòcits així com també en la diferenciació, la supervivència, la regulació del cicle cel·lular i la producció de pigments (Berwick et al. 2015).

Entre el gens de susceptibilitat a melanoma de baix risc ja confirmats o candidats, es troba una llarga llista de gens responsables de la pigmentació de la pell, el ulls i el cabell, el nombre de nevus (gens de nevogenicitat), la resposta immune, els mecanismes de reparació de l'ADN, diferents processos metabòlics, la proliferació cel·lular (com ara el gen del receptor de la vitamina D), etc (Potrony et al. 2015). De fet, molts dels gens de susceptibilitat a melanoma de baix risc recullen els trets constitucionals de l'hoste que s'han relacionat epidemiològicament amb el risc de desenvolupar melanoma.

3) El melanoma cutani és un tumor immunogènic amb capacitat de propagació a través del sistema limfàtic, evitant i superant simultàniament el sistema de vigilància (Wolchok and Saenger 2008). La immunosupressió induïda per melanoma es desenvolupa a través de nombrosos mecanismes com ara la regulació a la baixa dels antígens superficials, les mutacions dins de les cèl·lules malignes, la manca de funció co-estimuladora, la secreció de citoquines immunosupressores i la inducció de tolerància (Kubica and Brewer 2012). Els pacients amb leucèmia, limfomes, trasplantaments d'òrgans, VIH, o qualsevol altra patologia que produeixin una immunodepressió, tenen major probabilitat d'adquirir el tumor (Sigall et al. 2010).

1.4 Tipus de melanomes primaris

Clínicament, els melanomes primaris es classifiquen en quatre subtipus principals. El melanoma d'extensió superficial (*Superficial Spreading Malignant Melanoma*, SSMM), melanoma nodular (*Nodular Melanoma*, NM) i el melanoma lentigen maligne (*Lentigo Malignant Melanoma*, LMM), van ser descrits per primera vegada per Wallace Clark el 1969 (Clark et al. 1969). El melanoma lentiginós acral (*Acral Lentiginous Melanoma*, ALM) va ser descrit deu anys més tard per Arrington (Arrington et al. 1977) (Figura 5).

Introducció

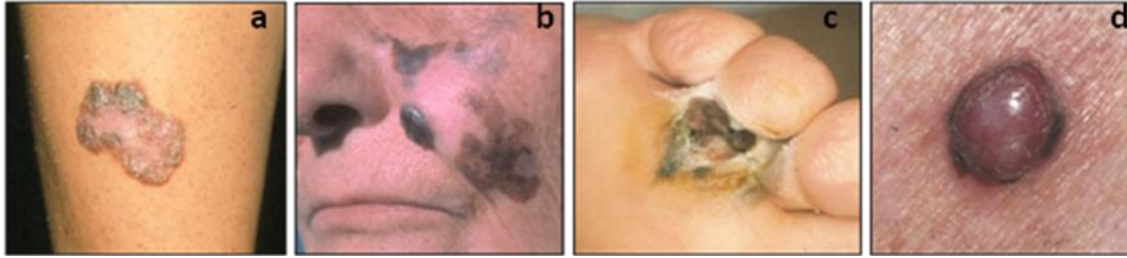


Figura 5. Tipus de melanomes primaris. a) Melanoma d'extensió superficial (SSMM) b) Melanoma sobre lentigen maligne (LMM) c) Melanoma lentiginos acral (ALM) d) Melanoma nodular (NM). Imatges cedides pel Servei de Dermatologia del Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida.

El **SSMM** és el subtipus més comú i representa gairebé dos terços de tots els melanomes primaris (Tan 2018). Es pot originar gairebé en qualsevol part de la pell, però és més freqüent en els llocs amb exposició al sol de manera intermitent (Schadendorf et al. 2013; Scolyer et al. 2011). SSMM es presenta com una lesió cutània plana asimètrica amb pigmentació irregular, i amb fenòmens de regressió. A més, presenta freqüentment una prolongada fase *in situ* pre-invasiva amb un creixement lent durant mesos o anys (Tan 2018).

NM és el segon subtipus més comú i també pot originar-se en qualsevol part de la pell, sobretot en el tronc, el cap i el coll (Schadendorf et al. 2013; Scolyer et al. 2011). Sovint, és una lesió nodular pigmentada total o parcialment de color rosa, vermell, marró o negre, encara que també pot ser amelanòtica (Tan 2018). Presenta un creixement ràpid (des de diverses setmanes a mesos) i té més probabilitats de sagnar o d'ulcerar que el SSMM. No té fase de creixement *in situ*.

LMM és generalment pla en aparença i es presenta com una piga gran i irregular de coloració fosca. Es produeix en zones exposades al sol de forma crònica amb danys solars majors, sobretot a la cara, però també en els llocs extrafacials incloent el coll, el cap, l'esquena i l'avantbraç (Tan 2018). Sol presentar-se en persones grans. Normalment té un període pre-invasiu *in situ* molt llarg (d'anys a dècades).

ALM és el subtipus que representa menys del 5% de tots els casos en la població caucàsica. Tot i que encara és relativament rar, és el subtipus més comú en les poblacions de pell fosca. Aquest subtipus de melanoma es produeix en els palmells de les mans, plantes dels peus i llocs subunguials i epidemiològicament no té res a veure amb l'exposició solar (Tan 2018).

A banda, hi ha diverses variants rares com el melanoma desmoplàsic, nevoide, spitzoide, o nevus blau maligne que, en conjunt, constitueixen aproximadament el 5% de tots els casos.

Els especialistes utilitzen la denominada "**regla ABCDE**" per a la identificació precoç del melanoma. Es tenen en compte les següents característiques clíniques del melanoma: (A) L'asimetria de les lesions, (B) els marges irregulars, (C) les variacions de color, (D) el diàmetre major de 6 mm i (E) l'evolució (respecte a la grandària, forma, tons de color, característiques de la superfície o símptomes) (Abbasi et al. 2004).

Actualment s'utilitza el sistema "**7 punts de Glasgow**" de forma complementària a la regla de l'ABCDE, ja que aquest es focalitza en els canvis que es poden observar en una lesió de la pell. Així doncs, permet detectar alguns melanomes que no compleixen la regla de l'ABCDE. *Keefe et al* de l'Hospital General Stobhill de Glasgow, van desenvolupar aquesta llista de verificació per avaluar una lesió cutània pigmentada la qual consta de 7 criteris: **3 criteris majors i 4 criteris menors** (Walter et al. 2013):

<i>CRITERIS MAJORS (2 punts)</i>	<i>CRITERIS MENORS (1 punt)</i>
<i>Modificació de mida</i>	Inflamació
Modificació de la forma (marge irregular)	Hemorràgia
Canvi de color (pigmentació irregular)	Canvis sensorials (dolor o picor)
	Diàmetre de lesió ≥ 6 mm

Taula 1. Criteris del sistema 7 punts de Glasgow. Modificat de (Walter et al. 2013).

A cadascun dels criteris majors presents se li assignen 2 punts i a cada un dels criteris menors se li assigna 1 punt. Es considera que una lesió és sospitosa de melanoma si suma 3 o més punts.

No obstant, el diagnòstic clínic de les lesions pigmentades pot ser difícil i la dermatoscòpia i altres tècniques més sofisticades, como la microscòpia confocal, són eines addicionals que s'utilitzen per orientar millor el diagnòstic. L'examen histopatològic es considera el *gold standard* per confirmar el diagnòstic de melanoma però, en alguns casos poc freqüents, encara planteja dubtes, i algunes lesions melanocítiques resten diagnosticades com de comportament biològic incert (Walter et al. 2013).

1.5 Progressió del melanoma

En el diagnòstic histopatològic dels melanomes primaris s'utilitzen dos conceptes essencials relacionats amb la seva progressió com la forma d'invasió i la profunditat (mesurada pel nivell de

Introducció

Clark o el gruix de Breslow, veure pàg 22 i 23). Els melanomes primaris normalment progressen a través de dues fases ben definides. La fase de creixement radial (**Radial Growth Phase, RGP**), l'etapa inicial de la progressió del tumor, caracteritzada clínicament per una lesió plana amb expansió horitzontal que es confina histopatològicament a l'epidermis i la dermis més superficial (Clark et al. 1969; Elder et al. 2005). La segona etapa de la progressió, la fase de creixement vertical (**Vertical Growth Phase, VGP**), es caracteritza per la invasió de la dermis més profunda i dels teixits subcutanis subjacents (Figura 8) i clínicament provoca lesions que ja tenen un cert volum i profunditat (Clark et al. 1975).

Nivell d'invasió de Clark i índex o gruix de Breslow

El gruix del tumor i la profunditat de la invasió són els factors pronòstics més precisos per als melanomes. El **mètode de classificació de Clark** correlaciona el nivell d'invasió anatòmic amb el pronòstic, on els nivells més alts tenen implicacions pronòstiques pitjors (Chudnovsky et al. 2005; Elder et al. 2005).

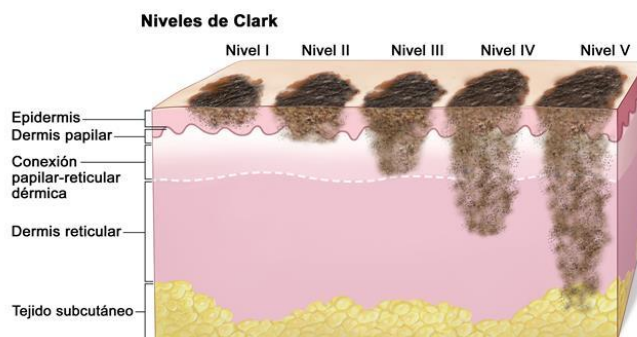


Figura 6. Nivells d'invasió de Clark. Extret de (Instituto Nacional del Cancer).

En el nivell de Clark I, el melanoma es troba confinat en l'epidermis (melanoma *in situ*). En el nivell de Clark II, es produeix infiltració cap a la dermis papil·lar (capa superior de la dermis). El nivell de Clark III resulta en la invasió a la unió de la dermis papil·lar cap a la connexió papil·lar-reticular dèrmica, però no cap a la dermis reticular (capa inferior de la dermis). En el nivell de Clark IV, es produeix la invasió a la dermis reticular. En el nivell de Clark V, el melanoma és dissemina cap al teixit subcutani (Clark et al. 1969; Elder et al. 2005).

El nivell de Clark va ser clau com a sistema d'estadificació del melanoma, però des del 2010 la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* va considerar el nivell de Clark amb menys importància

pronòstica en comparació amb la profunditat de Breslow que s'ha demostrat ser més reproduïble i amb major valor predictiu. De manera que, malgrat que encara es fa constar el nivell de Clark al informe anatomopatològic del melanoma primari, ja no es té en consideració per calcular l'estadificació del melanoma en cap de les dues darreres classificacions de l'AJCC, és a dir, la del 2010 i la del 2018 (Balch et al. 2009; Gershenwald et al. 2017).

L'**índex o gruix de Breslow** és una mesura directa en mil·límetres del gruix del tumor entre la part superior de la capa de cèl·lules granulars de l'epidermis i el punt més profund de penetració del tumor (Breslow 1970). Aquest segon mètode ha estat acceptat com un indicador més fiable de pronòstic, ja que s'avalua més fàcilment i és més objectiu que el mètode de Clark (Chin 2003). Com més fi sigui el melanoma, millor serà el pronòstic de la neoplàsia. Per tant, el gruix de Breslow és considerat un dels factors més importants del tumor primari en la predicció del pronòstic del melanoma.

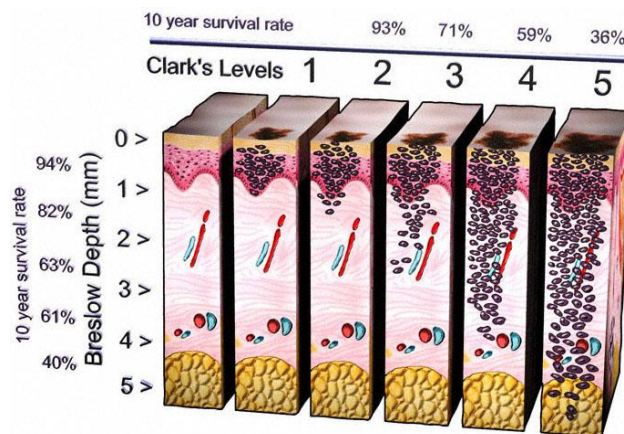


Figura 7. Comparació gràfica entre l'índex de Breslow i els nivells de Clark. Punts de tall actuals de l'índex de Breslow: ≤1, 1-≤2, 2-≤4, >4. Extret de (PathologyOutlines).

Melanoma de novo vs melanoma sobre nevus

Segons el model de carcinogènesi i progressió tumoral del melanoma, descrit inicialment per Clark, la proliferació dels melanòcits normals, presumiblement en resposta a la radiació UV, dóna lloc a la formació de nevus comuns que, eventualment, poden transformar-se en displàsics i aquests, a la vegada, en melanoma. En la fase de creixement radial (RGP) el melanoma presenta la capacitat de creixement intraepidèrmic i en el derma superficial, seguit de la invasió de la dermis en la fase de

Introducció

creixement vertical (VGP), procés que culmina amb la invasió vascular, disseminació limfàtica o sanguínia i la formació de metàstasi. És important destacar que actualment es coneix que només el 20-40% dels melanomes es desenvolupen a partir de nevus preexistents, que tant poden ser comuns com displàsics (Martín-Gorgojo and Nagore 2018; Silva et al. 2011). La resta apareixen a partir de melanòcits transformats de *novo*, sense passar per totes les etapes descrites (Clark et al. 1975). Per altra banda, en el cas de la progressió del melanoma nodular manca la fase de creixement radial, ja que aquest envaeix verticalment la dermis des del seu inici.

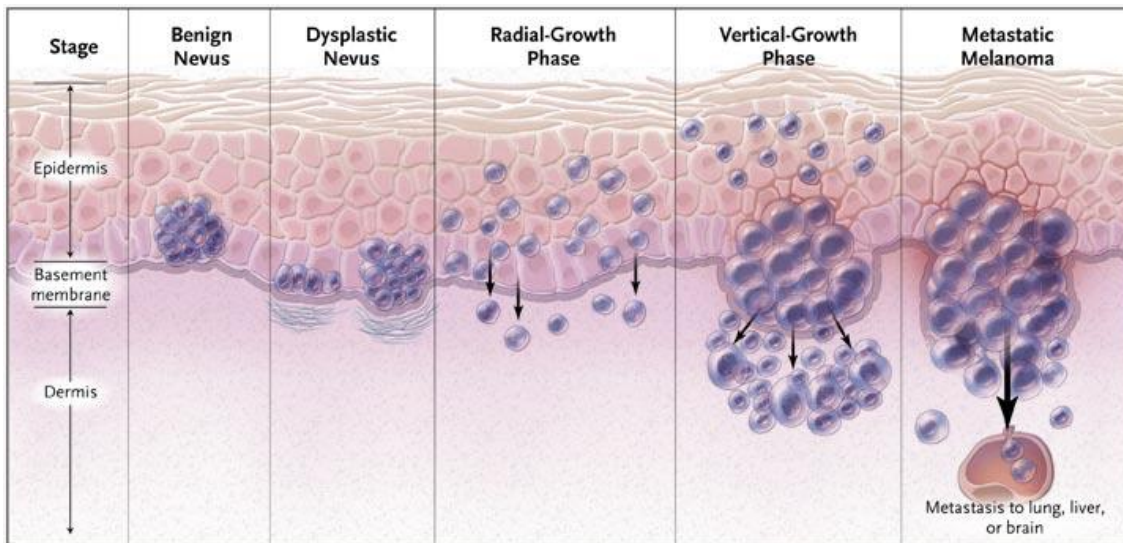


Figura 8. Progressió de la pell normal a melanoma in situ que culmina en metàstasi. Extret de (Miller and Mihm 2006).

1.6 Estadiatge i pronòstic del melanoma

El sistema de classificació de tumors malignes (Classification of Malignant Tumours, TNM) va ser desenvolupat per American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control (AJCC/UICC). En les seves sigles, **T** significa tumor primari; **N**, ganglis limfàtics i altres tipus de malaltia metastàtica regional no ganglionar, i **M**, metàstasi a distància. Segons la darrera classificació TNM de la AJCC (Gershenwald et al. 2017), en l'estadi 0 els melanomes no són invasius i no han trencat la integritat de la membrana basal epidèrmica (melanoma "*in situ*"). L'estadi I (≤ 2 mm d'índex de Breslow, sense ulceració) i l'estadi II (>1 mm d'índex de Breslow amb ulceració o qualsevol tumor amb >2 mm d'índex de Breslow) es caracteritzen per tumors primaris invasius, en absència de metàstasi locorregionals o a distància. En l'estadi III, ja s'ha produït la propagació regional a través dels vasos limfàtics als ganglis del territori anatómic corresponent o als teixits veïns

i en l'estadi IV s'observen metàstasis a distància produïdes per via sanguínia (Gershenwald et al. 2017).

Biòpsia selectiva del gangli sentinella

Per a l'estadificació de la malaltia locoregional (**N**), des de finals del 90, inici del 2000, es va introduir una tècnica, anomenada "estudi del gangli sentinella o biòpsia selectiva del gangli sentinella" que va significar una revolució en l'estadificació del melanoma i ja va ser incorporada a la classificació de l'AJCC de 2001. La biòpsia selectiva del gangli sentinella permet detectar la presència de metàstasis ganglionars regionals ocultes, és a dir, no detectables per exploració clínica ni per tècniques d'imatge. Per això, mitjançant mètodes de Medicina Nuclear, es localitza el primer gangli (o primers 1-3 ganglis) de la cadena ganglionar de la zona de drenatge limfàtic del tumor primari. Aquest primer gangli s'extirpa quirúrgicament, amb una tècnica quirúrgica relativament senzilla i amb poques complicacions, i s'estudia anatomopatològicament. En el cas de que estigui lliure de metàstasis (gangli sentinella negatiu), es considera que tota la resta de ganglis de la cadena ganglionar regional també estan lliure de metàstasis, el que és una dada de bon pronòstic (Morton et al. 2006; Morton et al. 2005). Actualment, la biòpsia selectiva del gangli sentinella s'ofereix a tots el pacients amb tumors primaris amb Breslow > 1 mm i es pot considerar en tumors amb Breslow ≤ 1mm, però amb altres factors de mal pronòstic, com un gruix de 0,8-1 mm, combinat amb la presència d'ulceració i/o mitosi (Gonzalez 2018). En cas de que sigui positiva, és un clar marcador de mal pronòstic.

Introducció

Estadi	Sub-estadi	Característiques
0		- El melanoma solament es troba en la epidermis. Aquesta etapa també es denomina <i>in situ</i> .
I	IA	- Tumor de ≤1mm de gruix, sense ulceració
	IB	- Tumor de ≤1mm de gruix, amb ulceració - Tumor de 1-2 mm de gruix, sense ulceració.
II	IIA	- Tumor de 1-2 mm de gruix, amb ulceració. - Tumor de 2-4 mm de gruix, sense ulceració.
	IIB	- Tumor de 2-4 mm de gruix, amb ulceració. - Tumor de >4 mm de gruix, sense ulceració.
	IIC	- Tumor de >4 mm de gruix, amb ulceració.
III	IIIA	- Metàstasis clínicament ocultes en 1-3 ganglis limfàtics regionals (detectades per estudi de gangli sentinella), en tumors primaris de gruix 1-2 no ulcerats.
	IIIB	- 1) Un sol gangli regional clínicament afecte o 2) malaltia regional no ganglionar sense primari conegut - 1) Un sol gangli regional clínicament afecte o 2) malaltia regional no ganglionar o 3) 2-3 ganglis afectes, al menys un detectable clínicament, en tumors primaris de gruix 1-2 mm no ulcerats - 1) Metàstasis clínicament ocultes en 1 gangli limfàtic regional (detectat per estudi de gangli sentinella) o 2) un sol gangli regional clínicament afecte o 3) malaltia regional no ganglionar o 4) metàstasis clínicament ocultes en 2-3 ganglis limfàtics regionals (detectades per estudi de gangli sentinella) o 5) 2-3 ganglis afectes, al menys un detectable clínicament, en tumors primaris d'1-2 mm amb ulceració o de 2-4 mm sense ulceració.
	IIIC	- 1) 2-3 ganglis regionals afectes, al menys un detectable clínicament o 2) combinació d'un gangli clínicament ocult (detectat per gangli sentinella) o clínicament evident + malaltia regional no ganglionar o 3) 4 o més ganglis, al menys 1 detectat clínicament o massacot ganglionar sense malaltia regional no ganglionar o 4) combinació de 2 o més ganglis detectats clínicament o ocults + malaltia regional no ganglionar, sense primari conegut - 1) Combinació d'un gangli regional clínicament ocult (detectat per gangli sentinella) o clínicament evident + malaltia regional no ganglionar o 2) 4 o més ganglis clínicament ocults (detectats per gangli sentinella) o 3) 4 o més ganglis, al menys 1 detectat clínicament o massacot ganglionar sense malaltia regional no ganglionar o 4) combinació de 2 o més ganglis detectats clínicament o ocults + malaltia regional no ganglionar, en tumors primaris fins a 4 mm sense ulceració. - Qualsevol afectació ganglionar regional més greu que tan sols 1 gangli afecte (clínicament o no) o tan sols malaltia regional no ganglionar, en tumors primaris de 2-4 mm ulcerats o > 4 mm no ulcerats. - 1) Combinació d'un gangli regional clínicament ocult (detectat per gangli sentinella) o clínicament evident + malaltia regional no ganglionar o 2) 4 o més ganglis clínicament ocults (detectats per gangli sentinella) o 3) 4 o més ganglis, al menys 1 detectat clínicament o massacot ganglionar sense malaltia regional no ganglionar o 4) metàstasis clínicament ocultes en 2-3 ganglis limfàtics regionals (detectades per estudi de gangli sentinella) o 5) 2-3 ganglis afectes, al menys un detectable clínicament o 6)) combinació d'un gangli clínicament ocult (detectat per gangli sentinella) o clínicament evident + malaltia regional no ganglionar, en tumors primaris de més de 4 mm i ulcerats.
	IIID	- 4 o més ganglis regionals clínicament ocults (detectats per gangli sentinella) o 4 o més ganglis, al menys 1 detectat clínicament o massacot ganglionar sense malaltia regional no ganglionar o combinació de 2 o més ganglis detectats clínicament o ocults + malaltia regional no ganglionar, en tumors primaris de més de 4 mm i ulcerats.
IV		- El melanoma s'ha disseminat a òrgans o ganglis limfàtics distants del tumor original (metàstasi a distància)

Taula 2. Sistema d'estadificació TNM del melanoma segons l'AJCC 2018 Extret de (Gershenwald et al. 2017).

D'aquesta manera, les característiques dels tumors primaris i metastàtics afecten al pronòstic. I aquest, depèn del gruix del melanoma (la profunditat del melanoma que penetra a la dermis) i la ulceració. A més, el pronòstic està directament relacionat amb l'etapa de l'estadiatge en el diagnòstic segons la classificació de TNM dels tumors malignes.

Segons dades del *National Cancer Institute*, les ràtios de supervivència als 5 anys es mostren a la taula contigua:

Estadi en el diagnòstic	Taxa de supervivència als 5 anys
Totes les etapes	90.5%
Estadi 0	100%
Estadi I-II (Localitzat)	97.6%
Estadi III (Regional)	60.3%
Estadi IV (Distància)	16.2%

Taula 3. Ràtios de supervivència als 5 anys segons l'estadi al diagnòstic. Modificat de (SEER Training).

Aproximadament el 83% dels melanomes es diagnostiquen en una etapa localitzada.

És possible que amb els nous tractaments disponibles pel melanoma metastàtic, la taxa de supervivència actual dels pacients en estadi IV sigui millor que la que reflecteix la taula, però els canvis són tan recents que, segons el document a on es recull la darrera classificació de la AJCC, les dades son massa limitades com per a pronunciar-se (Gershenwald et al. 2017).

1.7 Mutacions somàtiques i alteracions moleculars més prevalents en el melanoma

L'aparició d'alteracions moleculars i cromosòmiques en cèl·lules melanocítiques benignes estan directament implicades en la diferenciació, l'aparició i l'evolució dels melanomes. Aquestes alteracions es poden detectar a l'inici del tumor (mutacions, pèrdua d'heterozigosi, amplificació gènica, guany i pèrdua de cromosomes), durant la progressió (pèrdua del control del cicle cel·lular, factors de creixement, neovascularització), en la resistència a l'apoptosi (inactivació de vies de mort cel·lular, guany de factors antiapoptòtics i de supervivència), en la invasió i la metàstasi (motilitat cel·lular, adhesió cel·lular, enzims proteolítics) i també durant l'escapament de la vigilància immune

Introducció

(pèrdua o guany de reguladors immunològics). Tots aquests factors diferencien les cèl·lules del melanoma a partir de melanòcits normals i nevus melanocítics benignes (Carlson et al. 2005).

Així, diverses són les mutacions genètiques que s'han associat al desenvolupament i la progressió del melanoma. En general, al voltant del 40-50% dels melanomes cutanis que apareixen sobre pell amb dany solar no crònic (o dany solar intermitent) són portadors de mutacions en el gen BRAF. D'aquests, el 90% presenta la mutació BRAF^{V600E} (Banzi et al. 2016; Dhomen et al. 2009), produïda per substitució d'una valina en el codó 600. L'activació de les mutacions de BRAF es troba implicada també en altres tumors com el càncer colorectal, l'ovari o la tiroide (Manzano et al. 2016).

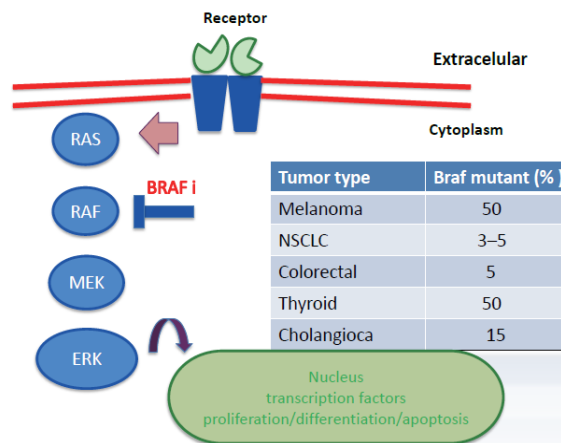


Figura 9. Mutació de BRAF en diferents tipus tumorals. Extret de (Manzano et al. 2016). NSCLC: Carcinoma de pulmó de cèl·lules no petites.

Al voltant del 20% dels casos de melanoma presenten mutacions en el gen de NRAS afectant majoritàriament al codó Q61 (Jakob et al. 2012). Les mutacions de NRAS i BRAF són mútuament excloents sent la taxa de coexistència <1%.

Al voltant del 14% dels casos presenten mutacions en NF1, un supressor tumoral i regulador negatiu de la senyalització de Ras (Manzano et al. 2016; Sullivan et al. 2013; Wood and Luke 2017).

A més s'han descrit melanomes que no presenten cap de les tres mutacions esmentades i per tant són triple negatius, sent un nou grup de melanomes. Actualment es parla de melanomes amb mutacions de BRAF, de NRAS, de NF1 i "triple negatius" per englobar a la resta.

Tot i la gran prevalença de mutacions de BRAF en el melanoma cutani, les aberracions moleculars del melanoma en general són heterogènies i complexes (Carlson et al. 2005). S'han descrit moltes altres alteracions genètiques que confereixen la funció de guany/pèrdua de gens que activen anormalment les vies de senyalització com KIT, GNAQ/GNA11, CDKN2A, PTEN, NF1, BAP1, entre d'altres (Berwick et al. 2015; Griewank et al. 2014).

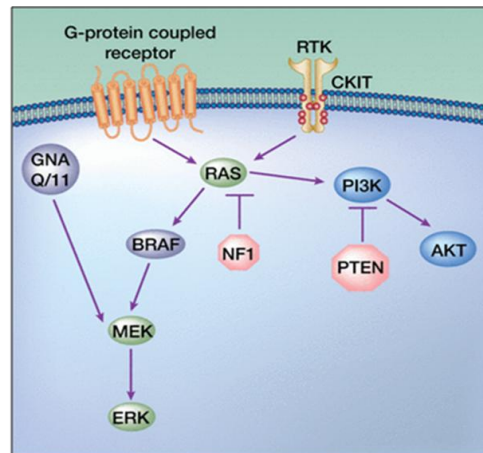


Figura 10. Representació esquemàtica de les mutacions oncogèniques en el Melanoma. Les mutacions oncogèniques i les aberracions moleculars es presenten regularment a la via de senyalització de les MAPK i també a la via de la PI3K/AKT. **Extret de (Sullivan et al. 2013).**

En general, les mutacions genètiques més conegudes en el melanoma afecten principalment a la via de senyalització de les MAPKs (**Mitogen-Activated Protein Kinase**) i la via PI3K/AKT. Per ordre de freqüència, es detecten diverses anomalies moleculars que afavoreixen l'aparició del melanoma com són les mutacions puntuals en els gens BRAF i NRAS, la pèrdua dels supressors tumorals PTEN i NF1, a més de mutacions o amplificació de cKIT i GNAQ/GNA11 (<1% de tots els casos de melanoma,> 80% en el melanoma ocular).

La proteïna BRAF és una serina/treonina quinasa i és el component central de la via de senyalització RAS/BRAF/MEK/ERK, la qual regula el creixement cel·lular, la proliferació, supervivència, la invasió i la melanomagènesi en resposta a varis factors de creixement, citoquines i hormones (Davies et al. 2002). Les mutacions en BRAF són més comunes en aquells melanomes que ocorren en pell que ha estat exposada al sol de forma intermitent.

Introducció

NRAS és un GTPasa de la família de Ras, que quan està mutada a banda d'hiperactivar la via RAS/BRAF/MEK/ERK, també activa la senyalització de la via PI3K/AKT, fet que també succeeix amb la pèrdua de funció de PTEN (gen supressor tumoral que inhibeix PI3K en condicions normals) ja sigui per mutació, deleció, o silenciament (20-30% dels melanoma) (Wu et al. 2003). Igualment que BRAF, NRAS es troba freqüentment mutat en els melanomes que ocorren en les mateixes condicions.

La pèrdua de PTEN es sol associar a mutacions de BRAF, però no de NRAS o c-KIT (Griewank et al. 2014). De fet, la pèrdua de PTEN és mútuament exclouent de les mutacions NRAS i coexisteix amb la mutació de BRAF (Manzano et al. 2016).

Alguns estudis suggereixen que els pacients amb melanoma BRAF^{V600E} o NRAS primari tenen una pitjor taxa de supervivència en comparació amb els pacients amb melanoma de tipus salvatge (WT) per ambdós gens (Davies et al. 2002; Long et al. 2011). No obstant, sembla que, un cop disseminada la patologia, l'estat de mutació BRAF i NRAS no influeix en la supervivència del melanoma metastàtic (Carlini et al. 2014).

NF1 és un supressor tumoral i regulador negatiu de la senyalització de Ras. Sota condicions fisiològiques, actua per estimular l'activitat GTPasa de Ras que condueix a la seva acumulació en l'estat (inactiu) de GDP-RAS. La pèrdua de la funció NF1 allibera la regulació negativa de Ras resultant en una major senyalització a través de vies de senyalització *downstream*, incloses les cascades de transducció de senyals PI3K/AKT i MAPKs (Kiuru and Busam 2017).

De forma interessant, aquells melanomes amb BRAF i NRAS salvatge (WT), presenten un nombre més elevat de còpies dels gens CDK4 i CCND1 (**Gen de la Ciclina D1**), els quals participen en la fase G1 del cicle cel·lular i són activats per la via de senyalització de les MAPKs (Curtin et al. 2005).

Els melanomes que contenen aberracions en KIT (mutacions i amplificacions), particularment són melanomes de mucoses o melanomes acrals o, menys freqüentment, melanomes que es presenten en llocs danyats pel sol de forma crònica. Aquests melanomes que presenten alteracions de c-KIT activarien tant la via de senyalització de les MAPKs com la de la PI3K/AKT a través d'NRAS (Griewank et al. 2014).

Recentment, s'han descrit mutacions en GNAQ/11 en un gran percentatge de melanomes uveals (Berwick et al. 2015). Aquest gen codifica per les subunitats *alfa* de les proteïnes G, les quals porten

a terme la senyalització entre els receptors acoblats a proteïnes G i els seus efectors *downstream*, com per exemple Ras i MEK (Van Raamsdonk et al. 2009).

La detecció de diverses mutacions en l'aparició del melanoma posa de manifest la necessitat de seguir investigant en el descobriment de marcadors moleculars únics per fer possible un diagnòstic més precís, una predicció més exacte de la progressió i supervivència dels pacients amb la finalitat de servir com a base potencial en el desenvolupament de teràpies úniques i personalitzades (Carlson et al. 2005).

1.8 Tractament del melanoma

El melanoma és la forma més agressiva del càncer de pell, que representa menys del 5% de tots els càncers de pell, però n'és el responsable de més del 80% de les morts (Manzano et al. 2016).

Els tipus de tractament depèn bàsicament de l'etapa de la patologia. Durant les primeres etapes, els melanomes primaris es poden extirpar mitjançant cirurgia amb una alta taxa d'èxit. En els pacients lliures de malaltia després de la intervenció quirúrgica, però que, per les característiques del melanoma primari (tumors amb Breslow > 4 mm o entre 2-4 mm i ulcerats) o perquè ja presenten metàstasis locals en el moment del diagnòstic (encara que siguin resecables quirúrgicament), es preveu que molt fàcilment acabaran desenvolupant noves metàstasis locals i/o metàstasis a distància, s'intenta a més, aplicar un tractament adjuvant per ajudar a detenir la recurrència o la propagació del tumor. A mesura que el tumor envaeix i es dissemina, el melanoma és difícil de tractar amb les teràpies convencionals com la quimioteràpia i la radioteràpia. Actualment, ja s'han introduït i s'estan investigant altres opcions, com la immunoteràpia i la teràpia dirigida, com a tractaments per als melanomes en etapa avançada (melanomes amb metàstasis a distància o grans metàstasis locals inextirpables quirúrgicament).

Tractament del tumor primari i de les metàstasis ganglionars regionals

Com hem comentat, el tractament del tumor primari és fonamentalment l'extirpació quirúrgica del mateix. L'examen anatomopatològic de la peça quirúrgica permet confirmar el diagnòstic de melanoma i establir els factors pronòstics del tumor primari (Breslow, ulceració) que guiaran les etapes següents de l'estudi d'extensió i tractament.

Introducció

Un cop conegudes aquestes dades, es procedeix a ampliar les marges quirúrgiques bilateralment 1 o 2 cm, segons la profunditat del tumor, i en fondària fins la fàscia muscular. En molts casos (melanomes primis, sense metàstasis locals ni a distància en el moment del diagnòstic) aquest és tot el tractament que cal fer. En cas de metàstasis locals ganglionars evidents clínicament o per tècniques d'imatge en el moment del diagnòstic, aquestes també s'extirpen quirúrgicament.

Fins fa poc, quan l'estudi del gangli sentinella era positiu, es procedia sempre a extirpar tots el ganglis del mateix territori, mitjançant el que es coneix com a "buidament ganglionar o limfadenectomia". Actualment s'ha comprovat que la supervivència dels pacients amb estudi del gangli sentinella positiu no canvia si no es practica immediatament la limfadenectomia (que sí produeix seqüeles amb freqüència), doncs es segueixen de prop clínicament i per tècniques d'imatge, i es limita la limfadenectomia per aquells pacients que acaben desenvolupant metàstasis ganglionars evidents (Faries et. al. 2017; Leiter et al. 2016). Amb aquesta informació, es recomana discutir amb els pacients amb gangli sentinella positiu les avantatges i els inconvenients de realitzar o no la limfadenectomia immediata. No obstant, un resultat positiu en l'estudi del gangli sentinella sempre és un indicador de pitjor pronòstic i el pacients portadors són candidats a rebre un tractament adjuvant i precisen d'un seguiment estricte.

Tractaments adjuvants o complementaris

Són aquells que poden oferir-se a pacients en principi lliures de malaltia una vegada extirpat el tumor primari i/o les metàstasis ganglionars (o actualment amb metàstasis ganglionars clínicament ocultes detectades per un estudi de gangli sentinella positiu, no sotmesos a limfadenectomia), però que tenen un risc considerable de recidiva (estadis IIB, IIC, IIIA i altres estadis III, o inclús IV amb metàstasi a distància úniques, quirúrgicament reseccables). La finalitat del tractament és evitar o retardar la recidiva locoregional i/o a distància.

- **Interferó α** . Fins fa molt poc, i depenent de les escoles, s'utilitzava la pauta d'interferó α a dosis altes descrita per Kirkwood al 1996. Malgrat la seva alta toxicitat, era un dels pocs tractaments en que s'havia demostrat un augment del temps lliure de malaltia (**Progression Free Survival, PFS**) i un molt discutit augment de la supervivència, amb forces discrepàncies entre estudis (Gordon 2010).

- **Immunoteràpia amb anticossos anti-PD1 i teràpies dirigides anti-BRAF i anti-MEK**. Molt recentment, aquests tractaments assajats amb èxit pel melanoma metastàtic o disseminat (veure

següent apartat “Tractament del melanoma disseminat”), han demostrat també la seva eficàcia com a tractament adjuvant en pacients amb melanoma en estadis IIIA, IIIB, IIIC i IV ressecat quirúrgicament (Weber et al. 2017) i s’estan assajant per estadis IIB i IIC. Per les primeres indicacions ja estan aprovats a Estats Units i Europa i sembla que han desplaçat completament al sempre controvertit interferó α .

- **Radioteràpia.** El melanoma és comunament considerat com una entitat tumoral radioresistent. No obstant, la radioteràpia adjuvant ha jugat fins ara un paper rellevant en el control de la malaltia locorregional, després de l’extirpació quirúrgica de metàstasis ganglionars extenses reduint el risc de recidiva local (Najem et al. 2017). El seu paper després de la introducció dels nous tractaments adjuvants basats en immunoteràpia o teràpies dirigides està encara per definir.

D'altra banda, la radioteràpia s'utilitza sovint per alleujar els símptomes causats per la propagació del melanoma, especialment al cervell o als ossos. Tot i això, la radiació, com una varietat d'altres factors d'estrès cel·lular, pot activar o reduir-regular múltiples vies de senyalització, que poden provocar tant un augment de la mort cel·lular com una major proliferació cel·lular. Diferents estudis suggereixen que la via de senyalització de les MAPKs pot influir potencialment en la radiosensibilitat de la cèl·lula tumoral per la seva activitat associada amb la resposta a danys de l'ADN induïda per radiació. De fet, les mutacions que es produeixen en la via RAS/RAF i l’activació de la proteïna ERK activen molt ràpidament la proliferació i supervivència de la cèl·lula tumoral en resposta a la radioteràpia (Najem et al. 2017).

Tractament del melanoma disseminat

Molts pocs pacients presenten metàstasi a distància en el moment del diagnòstic que els situïn en un estadi IV. La majoria de les metàstasis a distància es manifesten en els primers 2-3 anys i en el 94-99% dels casos abans dels primers 10 anys post diagnòstic d’un melanoma primari.

Abans de la introducció dels nous tractaments, el DTIC (dacarbazina) era el citostàtic que es considerava més actiu pel melanoma disseminat, però únicament produïa respostes objectives en un 12-30% dels pacients, amb tan sols un 3% de remissions completes i una durada de la resposta de només 3-6 mesos.

Introducció

○ Teràpia dirigida

Un alt percentatge de melanomes (40-50%) són portadors de la mutació BRAF^{V600} (V600E o V600K) (Aya et al. 2017). El primer fàrmac inhibidor de BRAF^{V600} aprovat el 2011 per la *Food and Drug Administration* (FDA) per al tractament del melanoma avançat va ser el Vemurafenib (PLX4032). S'ha demostrat que el Vemurafenib té un impacte important sobre la supervivència lliure de malaltia (PFS) i la supervivència global (Overall Survival, OS) (Hao et al. 2015).

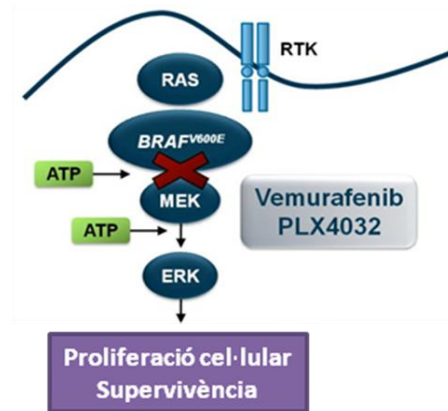


Figura 11. Esquema del mecanisme d'acció de Vemurafenib. Modificat de (<https://www.medscape.com/>).

La MAP quinasa transdueix senyals dels receptors tirosina quinasa a través de RAS, RAF, MEK i ERK, que promouen la proliferació cel·lular i la supervivència.

El **Vemurafenib (PLX4032)** és un inhibidor tirosina quinasa que és dirigit específicament sobre BRAF^{V600E}, evitant la fosforilació de MEK i posterior senyalització a través de la via molecular de les MAPKs, conduint en una parada del cicle cel·lular i mort per apoptosi (Kim and Cohen 2016; Poulidakos et al. 2011).

El seu principal problema (comú a altres inhibidors de BRAF, com Dabrafenib) és el desenvolupament freqüent de resistències secundàries, que es pot veure facilitat per un petit nombre de cèl·lules canceroses preexistents que són intrínsecament resistents o que adquireixen la resistència com a conseqüència d'una adaptació ràpida al tractament farmacològic (Larkin et al. 2014; Nazarian et al. 2010; Shi et al. 2014; Sosman et al. 2012). Tot i que les respostes i el control tumoral són impressionants al principi del tractament (resposta objectiva ràpida del 50-80%), la durabilitat de la resposta és limitada a causa del desenvolupament de la resistència, observant-se una progressió de la malaltia dins dels 6 a 8 mesos posteriors des de l'inici de la terapia (Manzano et

al. 2016). És per això que actualment els inhibidors de BRAF sempre s'administren en combinació amb inhibidors de MEK (Trametinib o Cobimetinib) (Luke et al. 2017; Najem et al. 2017). Estudis recents mostren que la teràpia combinada amb inhibidors de BRAF i MEK produeixen millors resultats en la supervivència lliure de malaltia (PFS) i en la taxa de resposta, en comparació amb la monoteràpia, retardant l'aparició de la resistència (Manzano et al. 2016). De fet, gràcies a l'aprovació tant dels inhibidors de BRAF^{V600E} (Vemurafenib i Dabrafenib) com dels inhibidors de MEK (Trametinib o Cobimetinib) diferents estudis mostren millors taxes de supervivència en comparació amb la quimioteràpia en assaigs clínics de fase III (Najem et al. 2017). Altres estudis preclínic en fase II han demostrat que la teràpia intermitent i no contínua amb un inhibidor de BRAF/MEK (dosificació seqüencial o intermitent) pot retardar el desenvolupament de la resistència adquirida (estudis actualment en curs) (Manzano et al. 2016). Així doncs, actualment, la combinació d'inhibidors BRAF i MEK representa l'estàndard d'or de la teràpia específica en el melanoma amb mutació en BRAF. Però tot i que sembla estar justificada, encara mostra resultats clínics subòptims (Amann et al. 2017; Muñoz-Couselo et al. 2017).

D'altra banda, els melanomes amb mutacions en NRAS (10-25% casos) o wild type (WT) per a tots dos gens, encara no disposen de teràpies específiques i dirigides. No obstant, Pimasertib i Binimetinib (nous inhibidors de MEK) són especialment prometedors en el cas dels pacients amb melanoma NRAS mutat (Najem et al. 2017). En els últims anys, s'han publicat resultats d'assaigs clínics que avaluen els inhibidors de RTKs (**R**eceptor **T**irosine **K**inase), Sunitinib i Imatinib, en pacients que presenten mutacions de c-KIT i mostren una taxa de resposta mitjana del 20% (Najem et al. 2017).

- *Immunoteràpia*

La Immunoteràpia és una altra modalitat en el tractament del melanoma avançat. Els inhibidors del control immune, anti CTLA-4 (Ipilimumab) i anticossos anti-PD1/PDL1 (Pembrolizumab, Nivolumab, MPDL3280) han resultat ser immunoterapèutics revolucionaris (Najem et al. 2017). Concretament, els anticossos anti-PD-1 (Pembrolizumab, Nivolumab) mostren una activitat molt més alta i menys tòxica que els anticossos anti-CTLA4 (Manzano et al. 2016). A més del seu ús com a monoteràpia, actualment es combinen concurrent o seqüencialment anti-CTLA-4 i anti-PD1/PDL1 en assaigs clínics mostrant taxes de resposta impressionants (40%) (Najem et al. 2017).

Introducció

Per altra banda, diferents assajos apunten per una combinació entre immunoteràpia (anti-PD1 o anti-CTLA-4) i inhibidors de MAPKs (inhibidors de BRAF). La combinació d'anticossos anti-CTLA-4 i Vemurafenib ha resultat excessivament hepatotòxica. No obstant, cal seguir treballant en aquesta línia, ja que la infiltració del tumor és una resposta immune adaptativa dels melanomes després del tractament amb inhibidors de BRAF i, de fet, hi han força assajos clínics en marxa amb inhibidors de BRAF + inhibidors de MEK + anticossos anti-PD1 (Aya et al. 2017; Khanafer et al. 2018). Per tant, s'ha de continuar estudiant l'activitat clínica d'aquests tractaments i els efectes secundaris associats (Jiang et al. 2013; Sullivan et al. 2013), ja que malgrat que la inhibició immune és un avenç important en la teràpia del melanoma, també està associada a recurrències en més del 50% dels pacients (Giricz et al. 2018).

A banda, aquests últims anys s'està plantejant la neoadjuvència abans d'una possible cirurgia en els melanomes avançats en estadi III o IV (Ascierto and Eggermont 2018). Els inhibidors de punts de control immunitaris Nivolumab i Ipilimumab han transformat el tractament del melanoma, però fins ara el seu ús ha estat limitat a la teràpia per la neoplàsia metastàtica irreseccable i, més recentment, tal com hem comentant, s'estan començant a utilitzar com a teràpia adjuvant. Els pacients en aquests estadis tenen una probabilitat del 70% de desenvolupar recurrència de la malaltia després del tractament estàndard amb cirurgia seguida de teràpia sistèmica. Sembla doncs, que la teràpia neoadjuvant podria millorar els resultats per a aquests pacients. Resultats inicials d'un assaig clínic indiquen que la teràpia neoadjuvant amb inhibidors de BRAF millora la supervivència sense recurrència en aquests tipus de pacients en comparació amb el grup control el qual es va sotmetre a una cirurgia dins de les 4 setmanes del seu diagnòstic, seguida per una teràpia adjuvant estàndard (Ascierto and Eggermont 2018).

En conjunt, el descobriment de teràpies dirigides molecularment efectives i/o la immunoteràpia han conduït a millores espectaculars en el tractament del melanoma avançat. Malgrat els avenços, el tractament amb teràpia específica proporciona respostes antitumorals ràpides i efectives, però no duradores en la majoria dels pacients, degut a la gran varietat d'alternatives genètiques i epigenètiques presents en el desenvolupament i progressió del melanoma i en l'aparició de recurrències (Najem et al. 2017; Zuo et al. 2018).

1.9 Mecanismes de resistència a inhibidors de BRAF^{V600}

Es coneixen nombrosos mecanismes de resistència ja que les cèl·lules de melanoma són altament heterogènies independentment del seu perfil mutacional i epigenòmic, a banda de presentar una gran plasticitat de creixement i de transició epitelio-mesenquimal (EMT) sostinguda pel microambient tumoral (Dummer and Flaherty 2012).

En general, els mecanismes de resistència es poden classificar com a primaris o intrínsecs, secundaris o adquirits, i com adaptatius. No hi ha una separació clara entre aquests tres tipus de mecanismes, ja que el mateix esdeveniment pot ocórrer en diferents etapes de la resistència al tractament (Amaral et al. 2017). Els mecanismes de resistència primària inclouen mutacions en RAC1, pèrdua de PTEN, amplificació de la Ciclina D, pèrdua de NF1 i dintre dels mecanismes de resistència secundària hi ha dues subdivisions: els dependents de MAPKs i els independents de MAPKs. En la reactivació dependent de BRAF/MEK/ERK, els mecanismes de resistència inclouen: amplificació de BRAF, *splicing* alternatiu de BRAF, mutació de NRAS i mutació de MEK. En els mecanismes independents de les MAPKs s'inclouen: sobreexpressió de receptors tirosina quinasa (RTKS) i sobreexpressió de COT (Manzano et al. 2016).

Mecanismes de resistència primària o intrínseca

Els mecanismes de resistència intrínseca són mecanismes en els quals la quimiorresistència es deu a una falta de resposta al tractament des del seu inici.

Mutacions RAC1

RAC1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) és un regulador clau en la proliferació i migració a més de ser un efector GTPasa de RAS. Les mutacions de RAC estan presents en un 9% de melanomes, i coexisteixen amb mutacions BRAF i NRAS (Manzano et al. 2016).

Pèrdua de PTEN

PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) és una fosfatasa dual no redundant que actua sobre substrats lipídics i proteics (Stambolic et al. 1998). PTEN actua com a supressor tumoral sent el regulador negatiu principal de la via PI3K, inhibint així la proliferació cel·lular i promovent l'apoptosi (Xing et al. 2012; Zuo et al. 2018). La pèrdua de PTEN (homo o heterozigosi) o mutació o silenciament epigenètic (metilació) es produeix en el 10-35% dels

Introducció

melanomes. És mútuament exclouent de les mutacions NRAS i coexisteix amb mutacions de BRAF. PTEN no funcional s'associa amb una progressió lliure de malaltia (PFS) més curta en pacients tractats amb inhibidors de BRAF. Igualment, la pèrdua de PTEN no és suficient per conferir aquesta resistència, doncs calen altres alteracions concurrents, com ara l'activació d'AKT (Manzano et al. 2016).

Desregulació de la quinasa dependent de la Ciclina 4 (CDK4)

En el cicle cel·lular, la Ciclina D1 regula la proliferació mitjançant la seva unió a CDK4 i CDK6, que activen la proteïna del retinoblastoma i condueixen a la progressió del cicle cel·lular. Les mutacions en CDK4 i l'amplificació de la Ciclina D1 confereixen una forta resistència a la teràpia amb inhibidors de BRAF (Smalley et al. 2009). Les amplificacions de la Ciclina D1 es troben en aproximadament un 20% dels melanomes amb mutacions BRAF. Un estudi en ratolins mostra que els inhibidors de CDK4-6 combinats amb inhibidors de BRAF i MEK aconseguixen disminuir la mida del tumor de forma completa en el 30% dels casos (Manzano et al. 2016).

Pèrdua de NF1

NF1 (*Neurofibromatosis type 1*) és un supressor tumoral de RAS. Les mutacions de NF1 estan presents en un 14% de melanomes. La pèrdua de NF1 condueix a l'activació de les vies RAS, PI3K-AKT-mTOR i MAPKs. Les mutacions NF1 i les mutacions NRAS coexisteixen en la inactivació de BRAF, per tant es requereixen diferents isoformes de RAS per a l'activitat pro-tumorigènica d'aquestes cèl·lules. En aquest context, una manera de combatre la resistència desencadenada per a la inhibició de BRAF seria la combinació d'inhibidors de MEK i mTOR (Manzano et al. 2016; Sullivan et al. 2013; Wood and Luke 2017).

Mecanismes de resistència secundària o adquirida

La resistència secundària als BRAFi/MEKi es caracteritza per una resposta màxima inicial al tractament, seguida de la persistència d'una subpoblació de cèl·lules tolerants als fàrmacs i una etapa final en la qual proliferen els clons resistents, donant lloc a la recidiva i la progressió de la patologia (Amaral et al. 2017). Els mecanismes de resistència adquirits estan associats principalment amb la reactivació de la via de les MAPKs (> 70%), coincidint en gran part amb la reactivació de la via PI3K-AKT (Manzano et al. 2016) (Figura 12).

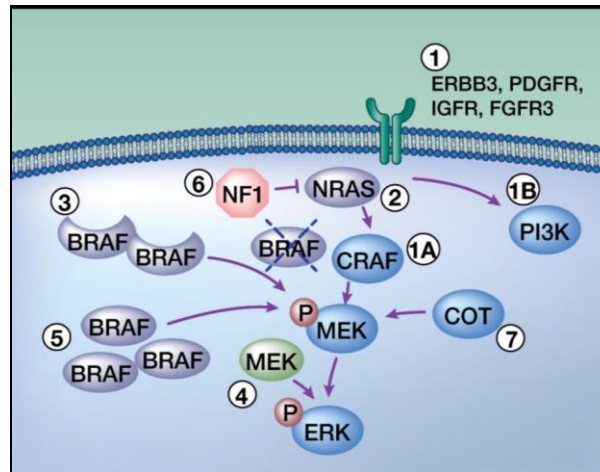


Figura 12. Esquema dels mecanismes de resistència secundària als BRAFi. 1) activació de RTKs que pot induir l'activació de CRAF (1A) o la ruta PI3K (1B); 2) mutació concomitant de NRAS; 3) aparició d'una variant truncada BRAF^{V600E} a partir d'un splicing alternatiu; 4) mutació concomitant de MEK; 5) sobreexpressió de BRAF^{V600}; 6) pèrdua de NF1; 7) COT, una activació de les MAPKs alternativa. **Extret de (Sullivan et al. 2013).**

Variants BRAF

S'han descrit dues aberracions que afecten al gen BRAF:

- 1) L'amplificació de BRAF (20% dels melanomes) consisteix en un augment del nombre de còpies de l'al·lel mutat que provoca la seva sobreexpressió i condueix a la reactivació d'ERK independentment de RAS, ja que en aquests casos no existeix el domini d'enllaç a RAS (Poulikakos et al. 2011). La reactivació d'ERK podria bloquejar-se amb dosis més altes d'inhibidors de BRAF o amb la combinació d'inhibidors de BRAF i MEK. No obstant això, sembla que l'amplificació de BRAF també s'ha detectat en pacients tractats amb la doble combinació MEKi i BRAFi (Sullivan et al. 2013).
- 2) L'*splicing* alternatiu de BRAF (32% dels melanomes) i per tant la seva reactivació s'ha detectat en pacients després de la teràpia combinada (Manzano et al. 2016).

Mutacions de NRAS

La mutació de NRAS activa senyals de transducció a través de CRAF en pacients tractats amb inhibidors de BRAF, resultant en una transactivació paradoxal de la senyalització de les MAPKs a través de la dimerització de BRAF i CRAF (Heidorn et al. 2010). Les dades preclíniques en pacients amb mutacions en NRAS van recolzar l'ús d'inhibidors de MEK, ERK i Pan-RAF a causa del seu elevat nivell d'activitat. En els assaigs clínics en fase II i fase III, un inhibidor de MEK (Binimetinib) va assolir una taxa de resposta del 20% en el melanoma amb mutació en NRAS (Manzano et al. 2016). Encara

Introducció

que les dades preclíniques són interessants, el benefici d'aquest tipus d'inhibidor és transitori (Manzano et al. 2016; Winder and Virós 2017).

Aberracions en la via PI3K

Entre el 10-20% dels casos en els que es desenvolupa una resistència primerenca, o que són intrínsecament resistents a la inhibició de les MAPKs, hi ha una pèrdua de PTEN, o mutacions en PI3K o AKT. Els experiments *in vitro* amb tractaments combinats d'inhibidors de BRAF/MEK juntament amb inhibidors de PI3K/AKT descriuen processos de superació de l'aparició de resistències. Tot i aquests resultats prometedors, actualment les dades clíniques romanen limitades (Manzano et al. 2016; Winder and Virós 2017).

Hiperactivació de RTKS

La sobreexpressió o hiperactivació (canvis epigenètics) de receptors tirosina quinasa (RTKs) és un dels primers mecanismes de resistència descrits, ja que desencadena l'activació de vies paral·leles (via PI3K) o bé la inducció directa de la via RAS (Sullivan et al. 2013; Wood and Luke 2017). Els receptors més freqüentment involucrats en l'aparició de resistències són el receptor del factor de creixement derivat de plaquetes (PDGFR β), el receptor del factor de creixement d'insulina (IGF-1R) i el gen del receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR), que no s'expressen normalment en el melanoma no tractat. En aquest últim cas, seria possible restaurar la sensibilitat inhibint l'EGFR (Manzano et al. 2016; Winder and Virós 2017).

Per altra banda, aquests receptors RTKs indueixen mitjançant la via PI3K o la via de les MAPKs l'activació de la isoforma C de RAF. Per tant, els inhibidors de BRAF actuen de forma paradoxal, ja que per una banda inhibeixen potentment a BRAF^{V600}, però per l'altra poden provocar l'activació de CRAF i facilitar la seva posterior dimerització donant lloc a la reactivació de la via de les MAPKs (Sullivan et al. 2013; Wood and Luke 2017). A més, es produeixen altres mecanismes de resistència als BRAFi que no es basen en l'activació paradoxal, però que també inclouen l'augment de l'expressió de BRAF^{V600}: la mutació oncogènica descendent de MEK i l'activació alternativa de les MAPKs (COT) conduint en ambdós casos en l'activació de les MAPK a nivell de MEK (Sullivan et al. 2013; Wood and Luke 2017).

Introducció

Per tot això, la caracterització amb més profunditat dels mecanismes de resistència a Vemurafenib pot ser essencial per determinar estratègies terapèutiques de nova generació. Sembla doncs, que malgrat que el tractament en el melanoma avançat orientat en la via de senyalització de les MAPKs amb inhibidors específics demostrin un benefici clínic, la curta durada de la resposta i de la supervivència lliure de malaltia en pacients a causa de la resistència o la toxicitat general, indiquen que encara és necessària una combinació d'estratègies terapèutiques per millorar l'efecte d'aquests inhibidors (Najem et al. 2017).

2. AUTOFÀGIA

2.1 Homeòstasi cel·lular

Tots els organismes vius experimenten una renovació contínua dels components cel·lulars. Les cèl·lules eucariotes s'han d'adaptar contínuament a les condicions adverses, enfrontant-se tant a estímuls externs com interns. Per això, els components intracel·lulars són constantment remodelats i reciclats per components nous i de millor qualitat. No obstant, tal "renovació cel·lular" no només requereix la síntesi de nous components sinó també la degradació dels materials preexistents (Kroemer et al. 2010; Mizushima and Komatsu 2011). El balanç proporcionat entre la síntesi i la degradació dels components cel·lulars es coneix com homeòstasi cel·lular.

Les cèl·lules eucariotes tenen dos sistemes de degradació importants, a través del *proteasoma* i mitjançant el sistema *lisosomal*. La degradació proteasomal té alta selectivitat, doncs el proteasoma generalment només reconeix substrats ubiquitinitzats, que són principalment proteïnes de curta durada. Per contra, la degradació en el lisosoma no segueix un patró simple. El material extracel·lular i les proteïnes de la membrana plasmàtica es poden lliurar als lisosomes per a degradar-se a través de la via endocítica. Però a banda, els components citosòlics i els orgànuls també es poden lliurar al lisosoma mitjançant l'autofàgia per mantenir l'homeòstasi cel·lular en un ambient fisiològic (Galluzzi et al. 2015; Kroemer et al. 2010; Mizushima and Komatsu 2011).

2.2. Macroautofàgia

L'autofàgia és un procés catabòlic evolutivament conservat i altament regulat que es desencadena a l'interior de la cèl·lula gràcies a l'activació d'una àmplia gamma d'estímuls d'estrès, tant externs (incloent privació de nutrients) com interns (presència d'àcids proteics o orgànuls danyats). Durant el procés d'autofàgia diversos components citoplasmàtics són lliurats als lisosomes per a ser degradats i eliminats per la cèl·lula (Chen and Klionsky 2011; Kroemer et al. 2010; Mizushima and Komatsu 2011). Existeixen almenys tres tipus diferents d'autofàgia: *microautofàgia*, *l'autofàgia mediada per xaperones* (*Chaperone-mediated autophagy*, CMA) i la *macroautofàgia*. Les principals diferències entre ells es refereixen a la manera per la qual la vesícula endocítica es lliura als lisosomes (Chen and Klionsky 2011; Mizushima and Komatsu 2011).

Introducció

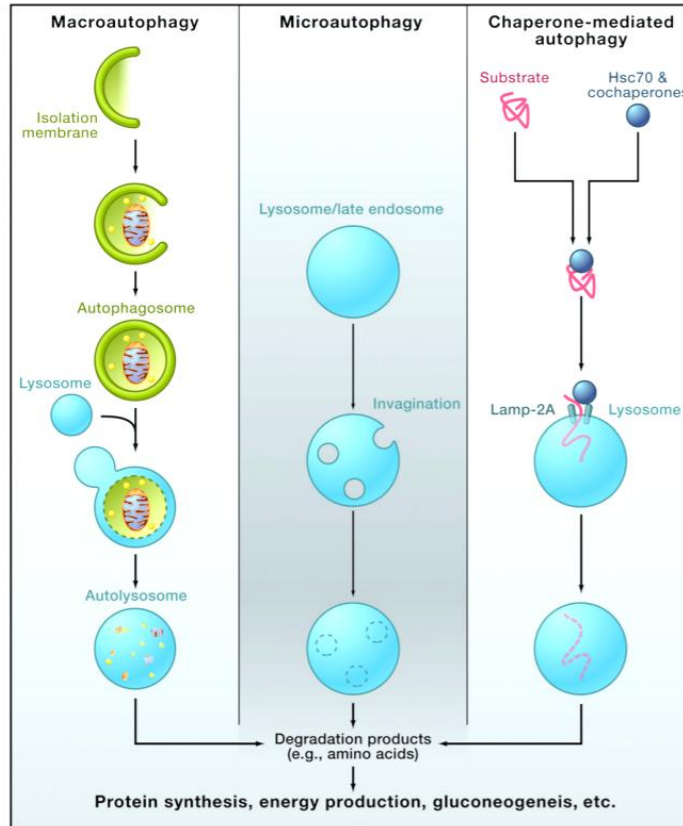


Figura 14. Esquema dels diferents tipus d'autofàgia. Extret de (Mizushima and Komatsu 2011).

La **microautofàgia** implica el lliurament directe a través de la invaginació i la fusió de la membrana lisosomal, però no hi ha gaires coneixements pel que fa a la maquinària molecular involucrada en el procés (Mijaljica et al. 2011). En l'**autofàgia mediada per xaperones** les proteïnes substrat contenen un pentapeptid tipus KFERQ el qual és reconegut per la xaperona Hsc70 citosòlica i després translocat a la llum lisosomal gràcies a la unió amb el receptor Lamp-2A del lisosoma. La **macroautofàgia** es considera el principal tipus d'autofàgia, i s'ha estudiat més àmpliament en comparació amb els altres dos tipus. Per tant, en aquesta tesi es refereix a la macroautofàgia simplement com a "autofàgia" (Mijaljica et al. 2011).

En conjunt, l'autofàgia és un procés que consta principalment de tres passos: el primer implica l'embolcall d'òrgànuls citosòlics amb les vesícules de la membrana lipídica, formant un autofagosoma. A continuació, l'autofagosoma es sotmet a una maduració progressiva fins que es fusiona amb vesícules lisosomals, formant l'anomenat autolisosoma. Finalment, es degrada el contingut dels orgànuls citosòlics (*cargo*) a través de les hidrolases àcides i proteases que conté el

lisosoma (Filippi-Chiela et al. 2016). En qualsevol cas, els tres tipus d'autofàgia resulten en la degradació de productes en el lisosoma que es poden utilitzar per a diferents propòsits, com la síntesi de *novo* de proteïnes, la producció d'energia o la glucogènesi, entre d'altres (Mizushima and Komatsu 2011). En general, l'autofàgia constitueix un important mecanisme protector que permet a les cèl·lules sobreviure en resposta a múltiples estressors i que ajuden a defensar els organismes contra la degeneració, les malalties inflamatòries i infeccioses, i durant el desenvolupament de neoplàsies (Kroemer et al. 2010).

La maquinària bàsica de l'autofàgia és un mecanisme altament conservat en l'escala evolutiva que es troba codificat pels gens ATG (*Autophagy Related Genes*): Genes relacionats amb l'autofàgia. Aquest procés es divideix en 3 fases mecànicament diferents: 1) *inducció o iniciació*; 2) *elongació, maduració i formació de l'autofagosoma*; 3) *fusió autofagosoma-lisosoma* i la *descomposició de la càrrega* seguida de l'alliberament dels productes de degradació al citosol (He and Klionsky 2009) (figura 15).

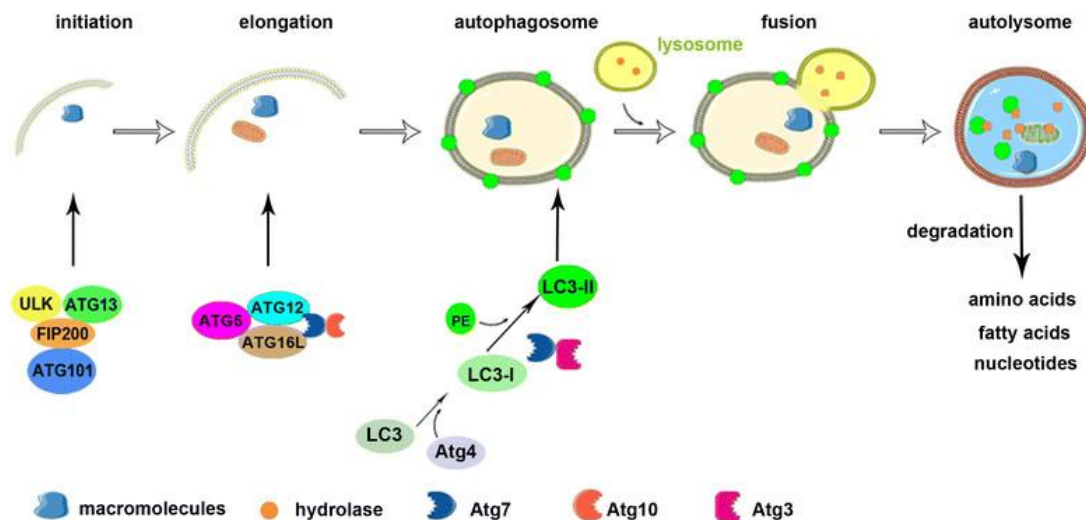


Figura 15. Representació esquemàtica de les fases de l'autofàgia. Extret de (Yang et al. 2015).

1) *Iniciació*:

L'autofàgia basal sol romandre molt baixa en condicions fisiològiques; per tant, un mecanisme eficaç per induir l'autofàgia és crucial per a que els organismes siguin capaços d'adaptar-se a l'estrès i als senyals extracel·lulars (He and Klionsky 2009). Entre els principals esdeveniments que una cèl·lula detecta per augmentar els nivells d'autofàgia es troben el mal plegament de proteïnes, l'aparició

Introducció

d'òrgans danyats que funcionen de manera anòmala o que augmenten el seu nombre de manera inadequada, i una manca de nutrients o condicions d'hipòxia (Hurley and Young 2017).

La fase *d'iniciació* està regulada pel complex **mTORC1** (**Mammalian Target of Rapamycin Complex-1**), un complex format per 5 proteïnes: **mTOR**, **Raptor** (**Regulatory-Associated Protein of mTOR**), **mLST8** (**Mammalian Lethal with SEC13 protein 8**), **PRAS 40** (*substrat de 40 kDa d'Akt ric en prolina*) i **DEPTOR**. La regulació del mateix depèn de la relació AMP/ATP, i a la vegada, està associada amb l'estat nutricional i metabòlic de les cèl·lules (Figura 16).

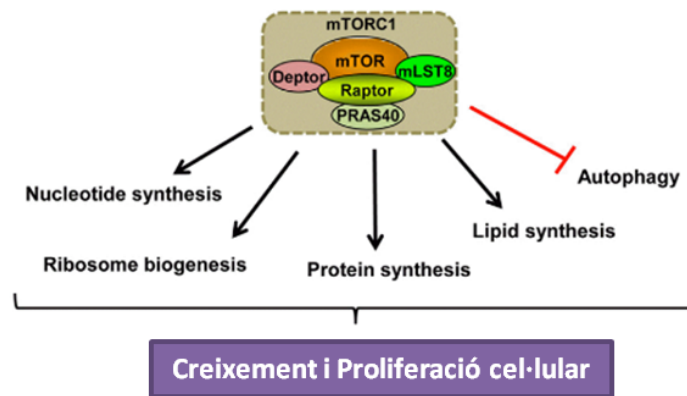


Figura 16. Complex mTORC1. Modificat (Kim et al. 2013).

Aquest complex i les proteïnes quinases *downstream* regulades per processos de fosforilació/desfosforilació, activen les proteïnes **ULK1/ULK2** (proteïnes quinasa tipus uridina 1 i 2, respectivament) i les proteïnes **ATG** que són les encarregades de la iniciació del flux autofàgic. Aquest complex **ULK1**, que consisteix en la serina/treonina quinasa **ULK1**, la proteïna **ATG13**, la proteïna interactiva de la família quinasa d'adhesió focal de 200 kDa (**FIP200**) i **ATG101**, controla la inducció o iniciació de l'autofàgia i està regulat negativament per mTOR (Galluzzi et al. 2017).

Aleshores, quan mTOR està en estat actiu és capaç d'inhibir l'autofàgia mitjançant la seva interacció amb el complex ULK.

Tot seguit, es porta a terme el procés de *nucleació*. La quinasa **ULK1** activa per fosforilació a la proteïna **Beclin1** (també coneguda com **ATG6**) que forma part del complex iniciador de la nucleació de la doble membrana de la vesícula. **Beclin1** s'allibera de **Bcl-2** i indueix la formació d'autofagosomes juntament amb **Vps34**, **Vps15** i **Atg14L**. Posteriorment, **Vps34** genera **PIP3** (3-fosfatidil inositol fosfat), essencial pel reclutament d'altres proteïnes **ATGs** sobre les dobles

membranes que provenen del reticle endoplasmàtic, el complex de Golgi i les mitocondries per iniciar la formació de l'autofagosoma (Hurley and Young 2017; Kroemer et al. 2010) (Figura 17).

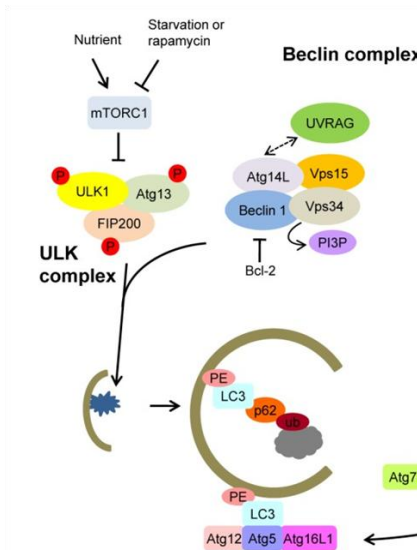


Figura 17. Passos d'inducció de l'autofàgia i formació d'autofagosomes. Extret de (Quan and Lee 2013).

En resum, en condicions basals, mTOR/Raptor interacciona amb ULK1 i el fosforila inhibint la seva activitat quinasa i per tant, la seva capacitat per fosforilar i activar la proteïna ATG13 i FIP200. En condicions d'estrès cel·lular, AMPK fosforila mTOR/Raptor inhibint-lo i conduint a l'activació d'ULK1 el qual s'autofosforila i fosforila ATG13 i FIP200 per continuar amb el procés d'elongació i formació dels autofagosomes.

2) Expansió i maduració de l'autofagosoma:

L'expansió de la doble membrana lipídica per a la posterior formació de l'autofagosoma es produeix per la interacció del fagofor (cisterna de doble membrana que reconeix les molècules o òrgans que han de ser destruïts) amb el complex proteic ATG5/Atg12. La conjugació d'aquest dímer requereix l'acció enzimàtica d'ATG7 i ATG10. Finalment, la unió d'ATG16 al complex ATG5/Atg12 produeix la seva multimerització i formació del complex que permet la inserció de la forma II de LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*, també coneguda com ATG8) a la membrana del fagofor (Galluzzi et al. 2017).

La proteïna LC3 es sintetitza com a pro-LC3, la qual és seccionada per ATG4, generant la forma activa LC3I en el citosol. Posteriorment, a l'LC3I s'incorporen lípids per l'acció de ATG7 i ATG3 que

Introducció

catalitzen la seva unió als residus de fosfatidiletanolamina presents a la membrana del fagofor. La unió de LC3II al fagofor es requereix per al tancament de la vesícula després de la captació dels substrats a processar i així donar origen a l'autofagosoma (Galluzzi et al. 2017).

Un cop format, el complex **ATG5/Atg12/ATG16** i **LC3II**, interaccionen entre sí per formar l'autofagosoma nu. Aquest procés permet l'associació de LC3II a la membrana autofagosomal i facilita el reclutament del *cargo* dins de l'autofagosoma (Galluzzi et al. 2017; Hurley and Young 2017) (Figura 18).

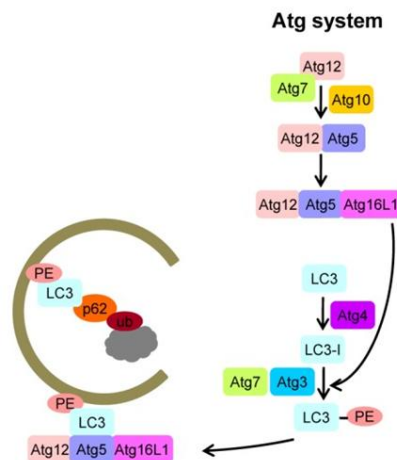


Figura 18. Passos de maduració i expansió d'autofagosomes. Extret de (Quan and Lee 2013).

3) Tancament de l'autofagosoma, fusió amb el lisosoma i degradació:

Quan l'autofagosoma es fusiona amb el lisosoma per acció de Rab7, Lamp1 i Lamp2, o també per les proteïnes SNARE (Liu et al. 2015; Salah et al. 2016) es forma l'autofagolisosoma on es produeix la proteòlisi dels continguts citoplasmàtics i/o orgànuls.

p62 (*sequestosome1*, SQSTM1) és una proteïna cel·lular que s'expressa de forma ubiqüa i està molt conservada en els animals. p62 interacciona directament amb LC3II a la membrana de l'autofagosoma (Mizushima and Komatsu 2011). Per tant, les proteïnes no desitjades es poden eliminar selectivament mitjançant la seva unió a p62 i conjugant-se posteriorment amb LC3II en la membrana dels autofagosomes. p62, és un substrat d'autofàgia específic que s'acumula quan l'autofàgia està inhibida, de manera que pot utilitzar-se com a índex de flux autofàgic (Hurley and Young 2017; Quan and Lee 2013).

Finalment, els substrats es degraden per l'acció dels enzims lisosomals (hidrolases àcides) i els productes de la reacció s'alliberen al citoplasma per a la seva futura reutilització (Hurley and Young 2017; Quan and Lee 2013). El contingut degradat torna al citosol mitjançant permeases. Així mateix, juntament amb el *cargo*, també són degradades les proteïnes adaptadores i la fracció de LC3II que es troba localitzada en la membrana interna de l'autofagosoma. Per contra, la fracció de LC3II de la part externa serà reciclada (Klionsky et al. 2012; Knævelsrud et al. 2013).

Selectivitat de l'autofàgia:

Aproximadament l'1%-1.5% de les proteïnes cel·lulars es catabolitzen mitjançant el procés d'autofàgia. L'autofàgia basal actua com a maquinària de control de qualitat per als components citoplasmàtics, i és fonamental per a l'homeòstasi de les cèl·lules. Tot i que aquest control de qualitat es pot assolir parcialment per l'autofàgia no selectiva, estudis recents indiquen que la membrana de l'autofagosoma pot reconèixer de forma específica proteïnes i orgànuls per degradar, tot i que la regulació de les proteïnes adaptadores de l'autofàgia encara és en part desconeguda (Kroemer et al. 2010). L'autofàgia selectiva es produeix de manera constitutiva i també pot induir-se en resposta a estressos cel·lulars (Mizushima and Komatsu 2011).

2.3 Regulació de l'autofàgia

En condicions fisiològiques l'activitat autofàgica es troba en estat basal. No obstant, l'autofàgia és induïda per una varietat d'estímuls d'estrès, incloent l'estrès nutricional i energètic, l'estrès de reticle endoplasmàtic (ER), els patrons moleculars associats a patògens (PAMPs) i els patrons moleculars associats a perill (DAMP), la hipòxia, l'estrès redox i el dany mitocondrial. La inducció de l'autofàgia a través d'aquests estímuls implica diversos senyals que tenen funcions superposades en el procés i en el control d'altres respostes d'estrès cel·lular (Mizushima and Komatsu 2011).

Via de senyalització mTOR

Els nutrients, els factors de creixement i els nivells d'energia cel·lular són determinants en el creixement cel·lular i la proliferació. mTOR, és una proteïna quinasa de serina/treonina de la família PI3K. És considerat el regulador principal del metabolisme cel·lular i promou el creixement cel·lular en resposta a indicacions ambientals. Per això, la desregulació de la senyalització de mTOR està implicada en moltes malalties humanes, incloent la diabetis, les malalties neurodegeneratives i el càncer (Kim and Guan 2015).

Introducció

mTOR forma dos complexos de senyalització diferents, mTORC1 (mTOR complex 1) i mTORC2 (mTOR complex 2), unint-se amb múltiples proteïnes acompanyants. Les proteïnes mLST8, DEPTOR i el complex Tti1/Tel2 existeixen tant en mTORC1 com mTORC2. No obstant, RAPTOR i PRAS40 són específics de mTORC1, mentre que RICTOR, mSin1 i PROCTOR1/2 són específics de mTORC2. Els dos complexos quinasa tenen preferències de substrat específiques i, per tant, produeixen diferents esdeveniments de senyalització *downstream* per modular la funció cel·lular (Kaur and Sharma 2017; Kim and Guan 2015). El complex mTOR 1 (mTORC1) doncs, és un dels principals reguladors de la macroautofàgia que suprimeix fortament la formació de l'autofagosoma mitjançant la catalització de la fosforilació inactiva d'ATG13 i ULK1 (Galluzzi et al. 2017).

Un dels fàrmacs àmpliament descrit com regulador negatiu de mTORC1 és la Rapamicina. La ***Rapamicina*** és un macròlid immunosupressor que inhibeix de forma específica la proteïna quinasa (mTOR) (Apelo and Lamming 2016; Lamming and Sabatini 2010). Per tant, la Rapamicina mitjançant la seva acció inhibidòria sobre mTOR és capaç de promoure la inducció de l'autofàgia (Li et al. 2012; Yang et al. 2010).

Via de senyalització PI3K/AKT

Un dels majors reguladors positius *upstream* de mTORC1 és la via de senyalització PI3K/AKT. Els factors de creixement com la insulina i l'IGF activen els seus receptors tirosina quinasa (RTKs) i, posteriorment, activen l'eix de senyalització PI3K/AKT conduint al reclutament de la PI3K a la membrana on fosforila els lípids fosfoinositòlics de l'anell inositol (PIP2) generant en última instància, PIP3 (Hers et al. 2011). Aquests lípids especialitzats que s'acumulen en la membrana cel·lular serveixen per reclutar proteïnes a la membrana plasmàtica amb domini PH (*pleckstrin homology*) tal com les serina/treonina quinases AKT o PDK1. L'AKT es manté normalment en un estat inactiu. No obstant, la interacció entre el domini PH i el PIP3 li indueix un canvi conformacional que permet el reclutament de PDK1, la quinasa que fosforila AKT (Hers et al. 2011; Thorpe et al. 2015). L'activació d'AKT dependent de fosforilació resulta en la seva dissociació de la membrana regulant així múltiples proteïnes senyalitzadores per fosforilació que promouen la supervivència i proliferació cel·lular, angiogènesi i metabolisme cel·lular (Engelman 2009; Hers et al. 2011; Thorpe et al. 2015).

Entre les dianes d'AKT s'hi troben proteïnes reguladores de l'apoptosi com FOXO, BAD, BCL-2, del metabolisme cel·lular, com GSK3, de la integritat i reparació del DNA, com MDM2, i del cicle cel·lular com p27 i p21. A més, AKT fosforilada, i per tant activa, promou la dissociació de TSC1/2 (una proteïna activadora de GTPasa) i per tant la seva inactivació a partir del lisosoma promovent l'activació de Rheb. Atès que Rheb unida a GTP és un potent activador de mTORC1, la inhibició de TSC1/2 per la fosforilació d'AKT resulta en l'activació mTORC1. Pel contrari, quan TSC2 no es troba fosforilat, forma un complex amb TSC1, inhibint a Rheb (Kim and Guan 2015; Malley and Pidgeon 2016).

Per altra banda, AKT fosforila de forma directa PRAS40 inhibint-lo. Aquest component del complex mTORC1 regula negativament l'activitat quinasa del complex conduint a l'activació de mTORC1. A més, l'activació del receptor tirosina quinasa també estimula l'eix de senyalització Ras/Erk/p90 S6 quinasa 1 (RSK1), que actua directament sobre TSC2 per inactivar la seva activitat GAP mitjançant fosforilació (Kim and Guan 2015; Malley and Pidgeon 2016). En canvi, els estressors cel·lulars, com els baixos nivells d'energia cel·lulars o la hipòxia, activen TSC1/2 per posteriorment inhibir l'activació mTORC1 i per tant conduir a la inducció d'autofàgia, ja que mTORC1 inactiu deixa de fosforilar ULK i s'activa el flux autofàgic (Kim and Guan 2015; Malley and Pidgeon 2016) (Figura 19).

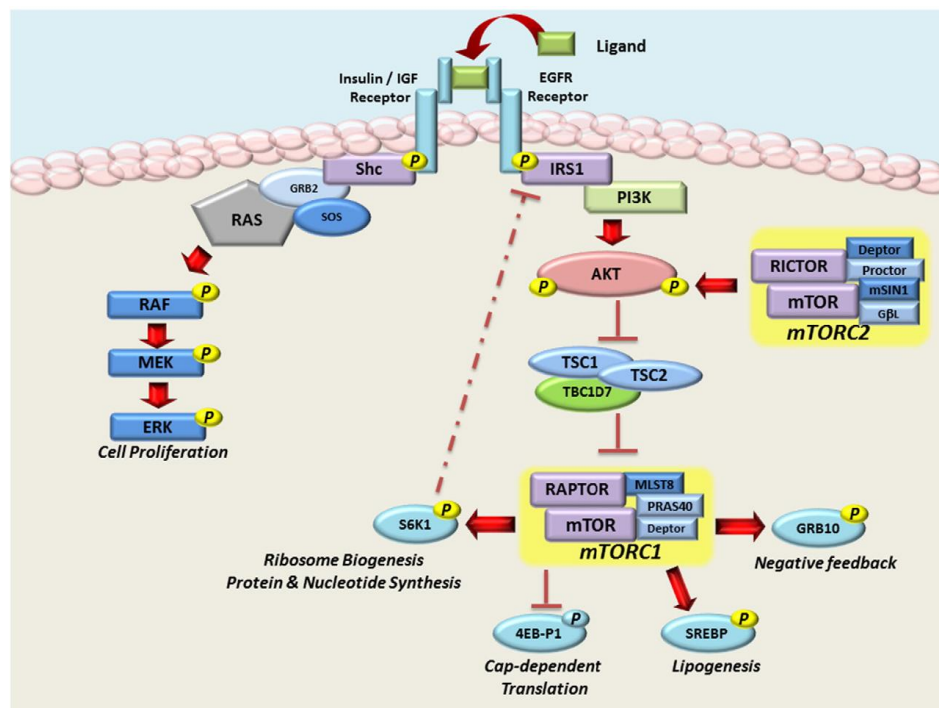


Figura 19. Representació esquemàtica de la via PI3K/AKT/mTOR. Extret de (Malley and Pidgeon 2016).

Introducció

2018). Químicament, la Cloroquina és un fàrmac membre de la classe de les 4-aminoquinolines. Va ser descoberta l'any 1934, per un químic de la companyia Bayer.

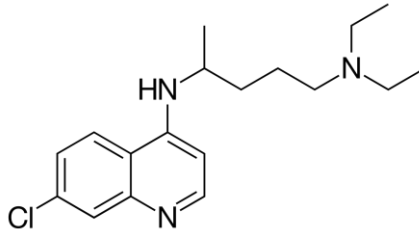


Figura 22. Estructura química de la Cloroquina.

En resum, l'autofàgia és un procés altament regulat que implica una gran quantitat de moduladors i la complexitat d'aquests esdeveniments es veu incrementada a mesura que es continuïn identificant components nous tant en vies independents com dependents de mTOR (Ávalos et al. 2014).

2.4 Autofàgia en càncer

L'autofàgia juga un paper important en l'inici i l'evolució del càncer, però encara és un tema controvertit ja que pot portar a terme una funció dual de pro-supervivència o pro-mort cel·lular (Bhutia et al. 2013; Fulda 2017; Levy et al. 2018). L'autofàgia doncs, té una funció protectora permetent que les cèl·lules sobrevisquin en unes condicions desfavorables com són la deprivació de nutrients o la hipòxia. Però, per altra banda, nombrosos estudis suggereixen que l'autofàgia pot tenir un paper anticancerós. Sembla que el rol de l'autofàgia en el context tumoral depèn de l'estadi tumoral (inici, progressió, metàstasi i/o resistència al tractament), de la naturalesa i tipus de tumor, així com del balanç i dels canvis genètics en pro-oncogens o gens supressors tumorals (Lozy and Karantza 2012).

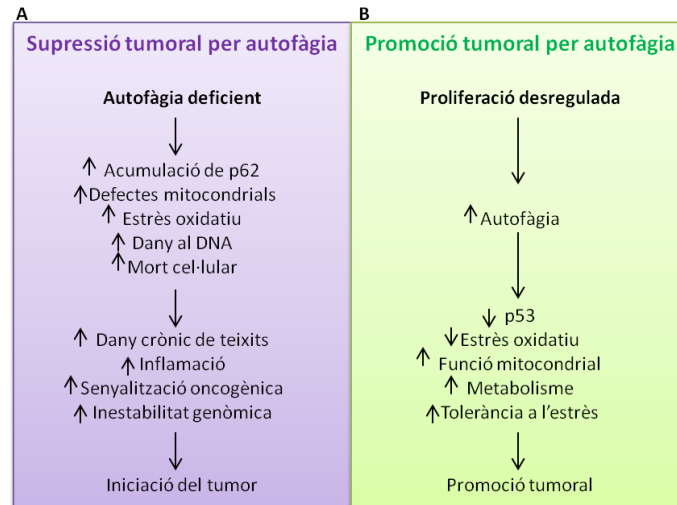


Figura 23. Proposta de supressió i promoció del rol tumoral per autofàgia. Modificat de (White 2015). (A) Mecanismes pels quals l'autofàgia pot suprimir la tumorigènesi. Els defectes de l'autofàgia perjudiquen la salut dels teixits, provocant danys crònics en els teixits que poden crear un ambient que afavoreixi el càncer. (B) Mecanismes pels quals l'autofàgia promou el càncer mitjançant la limitació de les respostes a l'estrès i el suport al metabolisme i la supervivència.

La majoria de les proteïnes que participen en els mecanismes de regulació de l'autofàgia són proteïnes supressores de tumors o oncògens que es superposen en gran mesura amb les vies de senyalització implicades en el control del càncer. Així, els gens supressors de tumors que regulen negativament mTOR, com PTEN, AMPK, LKB1 i TSC1/2, estimulen l'autofàgia, mentre que, per contra, els oncògens que activen mTOR, com la PI3K de classe I, Ras, RHEB i AKT, inhibeixen el procés autofàgic (Ávalos et al. 2014).

2.4.1 Autofàgia com a supressor tumoral

L'autofàgia funciona com a supressor tumoral eliminant orgànuls i proteïnes danyades que contribueixen a la inestabilitat genètica, així com limitant el creixement cel·lular. D'acord amb aquesta visió, Beclin-1 (BECN-1), que forma part del complex PI3K de classe III i promou l'autofàgia, funciona com a supressor tumoral en cèl·lules de mamífers. Conseqüentment, les mutacions monoal·lèliques en aquest gen s'observen freqüentment en els càncers de pròstata, ovari i de mama (Ávalos et al. 2014; Kondo et al. 2005). A més, diversos estudis amb ratolins han demostrat que els animals són més sensibles a l'evolució del tumor espontani quan Beclin-1 està afectada monoal·lèlicament, inhibint la seva funció. Addicionalment, la proteïna quinasa associada amb mort

Introducció

cel·lular, DAPK, és una proteïna que fosforila Beclin-1 provocant un desequilibri en el complex Beclin-1/BCL-2 que condueix a la vegada, en una estimulació de l'autofàgia. Doncs, DAPK és un altre inductor de l'autofàgia que generalment es silencia en diferents tipus de càncers humans per metilació (Huang et al. 2018).

Per altra banda, la mutació de p53 i PTEN, dos dels gens supressors de tumors més comunament mutats, indueixen també l'autofàgia (Arico et al. 2001; Feng et al. 2005). PTEN, un inhibidor de la via de senyalització PI3K/AKT, s'ha demostrat que promou l'autofàgia (Gozuacik and Kimchi 2004). Per tant, l'activitat fosfatasa de PTEN bloqueja la via de supervivència d'AKT a part de promoure l'autofàgia. D'acord amb això, una forma constitutivament activa d'AKT inhibeix l'activitat autofàgica en aquestes cèl·lules (Arico et al. 2001). Per contra, l'activació de la via AKT modula les vies de supervivència, que condueixen a la inhibició de l'apoptosi i activa la proteïna mTOR, que antagonitza l'autofàgia (Gozuacik and Kimchi 2004).

Curiosament, p53 s'ha descrit com a regulador positiu i negatiu de l'autofàgia, depenent del tipus de cèl·lula i dels estímuls estressors que repercuteixen en la viabilitat i estabilitat de les cèl·lules (Kung and Murphy 2016). p53 modula l'activació de AMPK i, per tant, la inhibició de mTOR i la conseqüent inducció de l'autofàgia. A més, l'activació de p53 per estrès genotòxic provoca la transactivació de dos dianes directes de p53: els gens Sestrin 1 i 2. Ambdós gens són reguladors negatius de l'activitat de mTOR. Un altre gen target de p53, DRAM (modulador d'autofàgia regulat per danys), és una proteïna de la membrana lisosomal que també és induïda per p53 per facilitar l'autofàgia davant l'estrès genotòxic (Kung and Murphy 2016).

Aquestes troballes suggereixen que l'autofàgia inhibeix la formació de tumors preservant la homeòstasi cel·lular en condicions desfavorables tals com en l'oncogènesi.

2.4.2 Autofàgia en la progressió tumoral

Mentre que nombrosos estudis fins el moment suggereixen que l'autofàgia pot inhibir la tumorigènesi, també hi ha dades que indiquen que el procés autofàgic pot promoure la transformació cel·lular i que poden ser necessaris certs nivells d'autofàgia per a la supervivència de les cèl·lules tumorals (Kung and Murphy 2016). La resposta autofàgica normalment ajuda al creixement i a la progressió tumoral una vegada les neoplàsies ja estan establertes. De fet, hi ha evidències que proposen un paper predominant de l'autofàgia en la progressió tumoral, reduint la

sensibilitat de les cèl·lules canceroses tant a estímuls intrínsecs com als de l'ambient, que en condicions fisiològiques portarien a la mort cel·lular. Nombroses investigacions demostren que en tumors ja establerts, defectes en l'autofàgia produeixen una disminució de proliferació, disseminació i capacitat metastàtica (Cui et al. 2013; Sharifi et al. 2016; Vera-Ramirez et al. 2018). A més, l'autofàgia podria estar estimulada durant les últimes etapes del desenvolupament del càncer, permetent la supervivència cel·lular en les àrees centrals del tumor, les quals estan generalment mal vascularitzades amb la conseqüent falta de nutrients i oxigen (Boya et al. 2005). De fet, sembla ser que les cèl·lules malignes són més dependents de l'autofàgia que les cèl·lules i els teixits normals. Això es deu probablement a les majors demandes metabòliques i biosintètiques imposades per la proliferació desregulada (White 2015). Per exemple, l'autofàgia basal està incrementada en regions tumorals hipòxiques, ambient essencial per a la supervivència de les cèl·lules tumorals. L'autofàgia també està regulada per les cèl·lules canceroses transformades per RAS i promou el seu creixement, supervivència, tumorigènesi, invasió i metastasi. Per altra banda, la deficiència d'ATG17/FIP200 té un paper en la inhibició del creixement dels càncers mamaris, el que suggereix un rol clau de l'autofàgia en la promoció de la tumorigènesi. No obstant, el context genètic que crea la dependència de l'autofàgia en el càncer encara no està ben comprès i queda encara per investigar (Chen et al. 2016; White 2015).

2.4.3 Autofàgia com un mecanisme de resistència a les teràpies establertes

S'ha descrit la inducció de l'autofàgia com a mecanisme important de mediació de la resistència de les cèl·lules cancerígenes a diverses estratègies terapèutiques en diferents models tumorals (Wei et al. 2014) com en cèl·lules de carcinoma (Apel et al. 2008), en glioblastoma (Dewaele et al. 2011) i en càncer de pulmó (Li et al. 2013). De fet, en càncer d'endometri s'ha demostrat que l'adquisició de resistència a Sorafenib podria implicar l'activació de mecanismes compensatoris (Blake et al. 2009) i que l'autofàgia podria ser una via molecular que sustenta aquesta resistència com a resposta de protecció front a l'estrès terapèutic (Eritja et al. 2017). En la mateixa línia, en un altre estudi s'ha descrit que l'autofàgia podria ser una de les principals causes de la resistència a la PDT (teràpia fotodinàmica) en els CSCs (*cancer stem-like cells*), ja que s'ha determinat un augment de l'expressió de proteïnes relacionades amb l'autofàgia (ATG) en els CSCs tractats i resistents a (Wei et al. 2014). A banda, s'ha demostrat que l'autofàgia està incrementada en els melanomes resistents als inhibidors de BRAF tant *in vitro* com *in vivo*. A més, hi ha diverses maneres en què els inhibidors de BRAF poden promoure l'autofàgia, com són l'estrès de l'ER, l'epigenètica, etc. (Liu et al. 2018).

Introducció

C-MER Proto-Oncogen Tirosina Quinasa (MERTK)

MERTK, és un receptor de tirosina quinasa, que exerceix funcions oncogèniques en nombroses neoplàsies. *Schlegel et al.* van trobar que l'expressió de MERTK era major en els melanomes metastàtics en comparació amb els melanomes i nevi primaris (Liu et al. 2018). A més, van descriure que l'activació de MERTK a les cèl·lules de melanoma induïa l'activació de vies de senyalització *downstream*, com ara MAPK/ERK, PI3K/AKT i JAK/STAT, que són importants en la resistència dels melanomes BRAF^{V600} als inhibidors de BRAF, tal com s'ha indicat anteriorment (Schlegel et al. 2013). De fet, el tractament amb un inhibidor de MERTK a les cèl·lules de melanoma podria inhibir l'activitat d'aquestes vies posteriors, induir apoptosi, reduir la proliferació cel·lular així com inhibir la invasió cel·lular en el melanoma (Liu et al. 2018a; Schlegel et al. 2013). En un altre estudi semblant, *Xue et al.* van mostrar que MERTK estava sobreexpressat en cèl·lules de melanoma i en biòpsies després de l'adquisició de resistència a Vemurafenib, i aquesta regulació de MERTK per Vemurafenib era específica de les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} (Xue et al. 2017). Els autors també van proposar que MERTK podria induir la supervivència cel·lular en el melanoma sota el tractament de l'inhibidor BRAF, contribuint així a la resistència (Liu et al. 2018a; Xue et al. 2017).

Via de senyalització RAF-MEK-ERK

Com s'ha indicat anteriorment, la via RAF-MEK-ERK juga un paper essencial en l'aparició i progressió de la resistència als inhibidors de BRAF. *Mulcahy et al.* van indicar a més, que tant la inhibició farmacològica com el silenciament gènic de l'autofàgia podrien revertir la resistència induïda per els inhibidors de BRAF mitjançant la inhibició de l'activitat de la senyalització clàssica RAF-MEK-ERK (Levy et al. 2017; Liu et al. 2018).

Via de senyalització MAPK/JNK

Basant-nos en la literatura, es coneix que una resposta a l'estrès de reticle endoplasmàtic (ER) podria precedir a la inducció de l'autofàgia (Das et al. 2013; Eritja et al. 2017). L'estrès d'ER s'ha relacionat amb la inducció de l'autofàgia en part a través de MAPK/JNK (Deegan et al. 2013; Urano et al. 2000). De la mateixa manera, l'augment de l'expressió MAPK8/JNK1, MAPK9/JNK2 i MAPK10/JNK3 es correlaciona amb un mal pronòstic, suggerint que MAPK/JNK pot tenir una funció clau que afavoreix la progressió/recrència tumoral (Eritja et al. 2017; Ma et al. 2014).

Altres

Algunes altres vies també poden contribuir a la resistència induïda per autofàgia; per exemple, *Xie et al.* van indicar que ATG7 és capaç de promoure el creixement de les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} mitjançant la limitació de l'estrès oxidatiu (*Xie et al.* 2015).

2.4.4 Autofàgia i microambient tumoral

Les cèl·lules canceroses estan envoltades d'un entorn complex. Aquest nínxol de cèl·lules canceroses s'anomena microambient tumoral i contribueix al desenvolupament i metàstasi dels tumors. El microambient tumoral és un nou concepte emergent en la investigació tumoral i s'ha convertit en un segell de recerca. El microambient tumoral no només contribueix a la supervivència cel·lular del càncer proporcionant nutrients, sinó que també està involucrat en la invasió i metàstasi de les cèl·lules tumorals (*Yang et al.* 2015). Les característiques fisiològiques del microambient tumoral són clarament diferents de les dels teixits normals i estan associades amb un ambient hipòxic, amb la deprivació de nutrients, la inflamació, l'adaptació en ambients amb pH baixos, etc (*Liu and Ryan* 2012; *Wojtkowiak et al.* 2012). Aquestes característiques poden induir l'autofàgia activant diverses vies de senyalització; per tant, l'autofàgia pot tenir un paper rellevant en el microambient tumoral. Així doncs, la interacció entre l'autofàgia i el microambient tumoral atreu cada vegada més atenció, ja que el microambient tumoral modelat per l'autofàgia pot jugar un paper crucial en la modulació del desenvolupament del tumor, la metàstasi i la resistència a la teràpia utilitzada (*Yang et al.* 2015).

2.4.5 Interacció entre l'Autofàgia i l'Apoptosi cel·lular

En els últims anys, a més de la funció citoprotectora que desenvolupa l'autofàgia, s'ha descrit una funció associada a mort cel·lular, ja que trets que caracteritzen el procés autofàgic s'han trobat en cèl·lules que s'estan morint (*Fuchs and Steller* 2015). Els estressos perllongats o l'autofàgia sostinguda poden induir una mort cel·lular quan el reciclatge de proteïnes o òrgans supera la capacitat de renovació de la cèl·lula (*Hansen et al.* 2018; *Yang et al.* 2011). Aquesta mort cel·lular originada per l'autofàgia es pot produir mitjançant la inducció de l'apoptosi o necrosi o bé, pot estar desencadenada d'una manera independentment (*Delou et al.* 2016; *Mariño et al.* 2014; *Tsujimoto and Shimizu* 2005).

Introducció

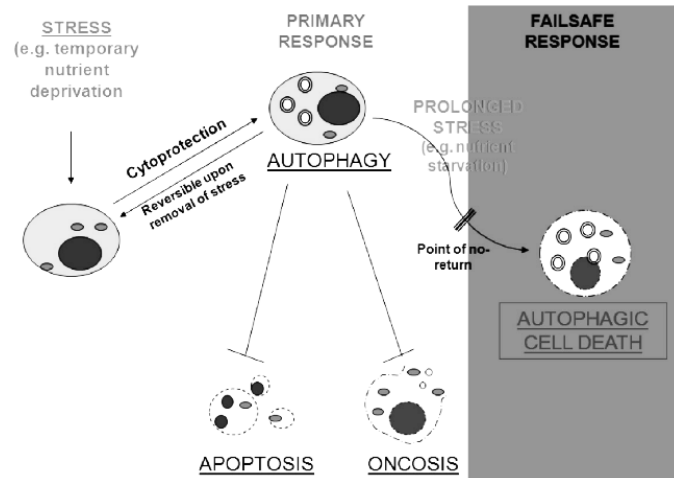


Figura 24. De l'autòfaga a la mort autòfaga de la cèl·lula. Extret de (Sadasivan et al. 2014).

L'apoptosi és un tipus de mort cel·lular programada, caracteritzada per un conjunt de canvis morfològics incloent condensació i fragmentació nuclear, així com la formació de bombolles en la membrana nuclear que condueixen a la formació de cossos apoptòtics. L'apoptosi ve acompanyada per canvis en les característiques bioquímiques de la cèl·lula, tals com la permeabilització de la membrana mitocondrial externa, l'activació de les caspases efectores (Casp3, Casp6 i Casp7) i l'activació d'hidrolases catabòliques les quals degraden la major part de les macromolècules cel·lulars, incloent el DNA (Delou et al. 2016).

Encara que l'autòfaga i l'apoptosi estan sota un estricte control de diverses vies de senyalització, aquests dos processos també es regulen creuadament l'un a l'altre, principalment d'una forma inhibidora, tot i que també hi ha exemples on l'autòfaga es capaç d'induir l'apoptosi (Delou et al. 2016; Mariño et al. 2014; Sadasivan et al. 2014). Tot i que la connexió entre l'autòfaga i l'apoptosi o altres formes de mort cel·lular encara es troba en exploració, la idea general és que l'estrès sovint estimula no només una resposta autòfagica, si el nivell d'estrès no és letal, sinó que també estimula la resposta apoptòtica quan l'estrès supera un llindar crític. En molts casos, l'autòfaga constitueix una estratègia per adaptar-se i sobreviure amb l'estrès. Tanmateix, si s'inicia la resposta apoptòtica, l'autòfaga es pot inhibir, en part degut a l'esclatxa mediada per la cascada de les proteïnes essencials en l'autòfaga (Mariño et al. 2014). Estudis recents sobre biologia molecular han donat llum sobre els reguladors comuns de l'apoptosi i l'autòfaga, cosa que ajuda a explicar la naturalesa d'aquesta relació (Delou et al. 2016).

S'han descrit múltiples interaccions directes i indirectes que suggereixen la superposició mecànica entre l'apoptosi i l'autofàgia. La majoria d'aquestes interaccions es donen quan l'apoptosi altera el procés de l'autofàgia. Per contra, es coneix menys el mecanisme sobre com l'autofàgia controla l'apoptosi. Diverses publicacions mostren que hi ha dues proteïnes que tenen múltiples connexions entre l'autofàgia i la mort cel·lular (Gump and Thorburn 2013; Sadasivan et al. 2014; Young et al. 2013).

Per una banda, p62 és una proteïna clau en la degradació selectiva de moltes proteïnes (i mitocondris) durant l'autofàgia, que interacciona amb diverses proteïnes implicades en les vies apoptòtiques o de supervivència. Entre aquestes proteïnes s'inclou la Casp8, TRAF6 (que modula la via de supervivència per la via NF- κ B) i ERK. La interacció entre p62 i Casp8 és especialment interessant perquè p62 és important per a l'activació de Casp8 (Young et al. 2013). A més a més, recentment s'ha descrit que la Casp8 és un dels substrats que es degrada per autofàgia (presumiblement via p62). Aquest fet crea un paradigma on autofàgia i apoptosi estan involucrades en un complicat balanç, on per una banda, l'autofàgia altera l'extensió i la velocitat de l'apoptosi, i per l'altra, l'apoptosi altera la degradació autofàgica de p62 i dels seus "cargos" selectius (Gump and Thorburn 2013; Young et al. 2013).

D'altra banda, Beclin1 interacciona directament amb la proteïna anti-apoptòtica Bcl-2. Quan Bcl-2 i Beclin1 estan unides, Beclin1 és incapaç d'activar l'autofàgia. L'autofàgia és induïda quan aquesta interacció es desfà per l'efecte de les proteïnes pro-apoptòtiques amb dominis BH3 (Kang et al. 2011). Un altre mecanisme que depèn de Beclin1, mitjançant el qual l'apoptosi pot inhibir l'autofàgia és el trencament que produeix la Casp3 sobre Beclin1, produint un fragment truncat i impedit que Beclin1 sigui capaç d'induir l'autofàgia. Així, la regulació de Beclin1 per diferents components apoptòtics pot tant promoure com inhibir l'autofàgia, depenent de les activitats de les proteïnes BH3 i de les Caspases (Gump and Thorburn 2013).

2.5 Autofàgia en el melanoma primari, metastàtic i de recurrència

La presència de nivells basals d'autofàgia en les cèl·lules de melanoma s'ha reconegut durant molts anys, ja que moltes cèl·lules de melanoma contenen autofagosomes amb melanosomes que són fàcilment visibles sota el microscopi òptic (Lazova et al. 2010). De fet, *Lazova et al.* van observar que tant els melanomes *in situ* com els melanomes invasius, presentaven autofagosomes els quals van

Introducció

ser detectats mitjançant la tinció de LC3II per immunohistoquímica (IHC), on es va observar a més, que els melanòcits normals i els queratinòcits de la epidermis no presentaven tinció, suggerint una associació entre l'autofàgia i la progressió del melanoma maligne (Lazova et al. 2012).

En conjunt, la presència generalitzada de l'autofàgia basal en diferents cèl·lules de melanoma suggereix que un flux autofàgic elevat pot ser important per a la supervivència de les cèl·lules de melanoma, a més de ser més susceptibles a les teràpies anti-autofàgiques. No obstant, la dualitat de l'autofàgia també es present durant la migració i la metastasi (Galluzzi et al. 2015). L'autofàgia té un paper fonamental tant en les etapes de latència tumoral com en la disseminació (Sosa et al. 2014), intervenint en les poblacions de cèl·lules que inicien processos d'invasió i també en la resistència a tractaments (Wolf et al. 2013). De fet, s'han relacionat diversos substrats d'autofàgia amb la regulació directa dels processos d'EMT (**E**pithelial to **M**esenchymal **T**ransition), migració i invasió tumoral, que poden desencadenar la formació de metastasis (Kenific et al. 2016) (Kenific et al. 2016; Lock et al. 2014; Qiang et al. 2014; Sharifi et al. 2016). Atès que l'EMT promou la metastasi tumoral i l'autofàgia recolza la viabilitat cel·lular durant la disseminació metastàtica, no és sorprenent que l'EMT pugui induir l'autofàgia en cèl·lules canceroses. *Akabay* et al. van demostrar que l'adquisició del fenotip mesenquimal en cèl·lules de càncer de mama estava associada amb un augment de l'autofàgia i de la resistència cap a les cèl·lules immunes, com a mecanisme per a evadir la vigilància immunitària (Gugnoni et al. 2016). En la mateixa línia, Snail1 és considerat el factor de transcripció més important que indueix la transició epitelial-mesenquimal (EMT) i s'ha demostrat que és crucial durant la progressió i la invasió del tumor (Cano et al. 2000; Thiery 2002). En les cèl·lules de melanoma, Snail1 està sobreexpressat (Kuphal et al.) i promou la motilitat i la invasivitat cel·lular (Olmeda et al. 2007). En conseqüència, el silenciament gènic o la disminució de l'expressió de Snail1 en cèl·lules de melanoma redueix el creixement tumoral, la metastasi i la immunosupressió (Pearlman et al. 2017).

En un altre estudi es va trobar que els pacients amb melanoma que tenien un major nombre de vacuoles autofàgiques, eren menys sensibles a respondre al tractament amb Temozolomida i Sorafenib, i tenien una esperança de vida més curta en comparació amb aquells amb un índex d'autofàgia més baixa (Ma et al. 2011). D'altra banda, la inhibició de l'autofàgia basal a través del silenciament del gen ATG5 o farmacològicament va augmentar significativament la mort cel·lular quan es combinava amb Temozolomida (Rosenfeld et al. 2014).

Per una altra part, recentment s'ha descrit l'autofàgia com a probable mecanisme de resistència als inhibidors de BRAF, com el Vemurafenib, en les cèl·lules del melanoma. Diversos estudis, han mostrat que la inhibició de l'autofàgia en cèl·lules de melanoma resistents a Vemurafenib sensibilitza a aquestes cèl·lules a una major mort cel·lular. No obstant això, més enllà de la modulació de la mort cel·lular, de quina manera l'autofàgia intervé en el fenotip d'aquestes cèl·lules, encara no roman clar (Li et al. 2016; Ma et al. 2014; Martin et al. 2017b). Per contra, altres estudis suggereixen que l'activació de l'autofàgia promou la inducció de supervivència cel·lular com a mecanisme de resistència. De fet, *Ndoye A et al.* mostren que en estadis avançats del melanoma, l'autofàgia pot promoure la resistència al tractament i la supervivència de cèl·lules tumorals agressives (Ndoye and Weeraratna 2016). Altres estudis indiquen que un augment de l'autofàgia (mitjançant l'increment dels nivells de LC3) en cèl·lules de melanoma resistents a Vemurafenib incrementen els mecanismes de reciclatge cel·lular com a explicació de la resistència al tractament (Geserick et al. 2014). *Berger A et al.* proposen a més, que la sensibilització de l'apoptosi per TRAIL mitjançant l'activació de vies mitocondrials proapoptòtiques a través de Bim i Bax, així com la inducció de l'autofàgia, són característiques de la resposta de la cèl·lula del melanoma a la inhibició de RAF (Berger et al. 2014).

En els últims anys, s'ha demostrat que la teràpia que indueix el secretoma en cèl·lules de melanoma tractat amb l'inhibidor de BRAF, Vemurafenib, estimula la disseminació i capacitat de metàstasi de les cèl·lules canceroses sensibles al fàrmac (Obenauf et al. 2015). A més, s'ha descrit que l'autofàgia no solament està relacionada amb la degradació de proteïnes intracel·lulars, sinó que té un paper important en la secreció de proteïnes. S'ha descrit que el patró de secreció relacionat amb el procés autofàgic en el melanoma afecta el microambient tumoral i que la detecció de proteïnes secretades associades a l'autofàgia en biòpsia líquida o en tumors poden servir com a marcadors del flux autofàgic intracel·lular en cèl·lules tumorals (Kraya et al. 2015a; Yang et al. 2015).

En resum, totes aquestes troballes suggereixen que l'increment de l'autofàgia es relaciona amb la progressió tumoral del melanoma i per tant amb la malignització, a més de correlacionar-se amb un pitjor pronòstic així com amb l'aparició de recurrències.

2.6 Inhibició de l'autofàgia com a estratègia terapèutica

La presència d'un nombre elevat de vacuoles autofàgiques no sempre indica un flux elevat d'autofàgia, ja que també s'observen quan es bloqueja el flux autofàgic en l'últim pas abans de la formació dels autofagosomes, donant lloc a un procés autofàgic defectiu. Múltiples estudis han demostrat que la inhibició farmacològica de l'autofàgia pot millorar efectivament la mort de cèl·lules tumorals en models preclínic (Chude and Amaravadi 2017; Delou et al. 2016; Thorburn and Morgan 2013). Per exemple, *Sasaki et al.* van demostrar que la combinació de CQ i 5-FU (primera línia de fàrmacs per càncer colorectal) causa un bloqueig de l'autofàgia amb la consegüent disminució significativa del creixement cel·lular tant *in vitro* com *in vivo* en cèl·lules de càncer de còlon (Sasaki et al.). A més, la CQ redueix el creixement del tumor, la invasió i la metàstasi cel·lular del melanoma (Maes and Agostinis 2014). En la mateixa línia, *Sharifi et al.* van trobar que la inhibició de l'autofàgia redueix la migració i la invasió cel·lular (en el càncer de mama i el melanoma) i atenua la inducció de metàstasi pertorbant la renovació d'adhesions focals (Sharifi et al. 2016).

Aquestes dades mostren en conjunt que la capacitat d'inhibició de l'autofàgia pot millorar la quimiosensibilitat i regressió tumoral. A més, diversos són els assajos en fase I/II que s'han realitzat per tal d'avaluar l'eficàcia d'una combinació de HCQ amb altres fàrmacs citotòxics en diversos tipus de tumors (Rosenfeld et al. 2014). En cèl·lules de colon implantades a ratolins, es va investigar l'efecte d'una teràpia combinada amb l'inhibidor del proteasoma (Bortezomib) i la CQ, i es va observar una supressió significativa del creixement del tumor (Ding et al. 2009). En un estudi semblant, el bloqueig de l'autofàgia disminuïa la proliferació de cèl·lules tumorals pancreàtiques (Yang et al. 2015). En algunes línies de cèl·lules tumorals, quan la fusió dels autofagosomes i lisosomes es bloqueja per l'addició d'inhibidors lisosomals (com ara CQ o bafilomicina A1), les vacuoles autofàgiques s'acumulen i les cèl·lules manifesten un canvi en la seva morfologia abans que comencin a morir-se (Gonzalez-Polo et al. 2005). Aquestes troballes suggereixen que la inhibició de l'autofàgia, ja sigui en etapes primerenques o tardanes del procés, pot conduir a l'apoptosi com a resultat de la manca d'adaptació al estrès farmacològic. Per tant, la modulació de l'autofàgia podria ser una estratègia terapèutica emergent en el melanoma.

3. CANALS DE CALCI TIPUS T (TTCCS)

3.1 Senyalització per Ca^{2+} en el melanoma

El calci ionitzat (Ca^{2+}) és un segon missatger que intervé en diverses funcions fisiològiques, com la proliferació cel·lular, la supervivència, l'apoptosi, la migració i l'expressió gènica. Els transportadors específics de Ca^{2+} així com les proteïnes d'unió a Ca^{2+} s'utilitzen per extreure Ca^{2+} a través de la membrana plasmàtica, per transportar-lo cap a l'interior dels reservoris cel·lulars o com a tampó citosòlic. A més, hi ha una diversitat de canals de Ca^{2+} en la membrana plasmàtica que permeten l'entrada del mateix al citosol. L'afluència de Ca^{2+} pot interaccionar amb els canals de calci presents en el reticle endoplasmàtic (ER), resultant en elevacions de calci ionitzat que es produeixen com a conseqüència d'una varietat d'efectors independents de Ca^{2+} (Das et al. 2012; Macià et al. 2015). Es coneix que el Ca^{2+} extracel·lular és necessari per induir la proliferació cel·lular i la progressió del cicle cel·lular en cèl·lules de mamífer (Capiod 2013). Alguns estudis indiquen un increment del flux de Ca^{2+} per induir una fase G1/S durant el procés del cicle cel·lular (Macià et al. 2015). A més a més, en les cèl·lules canceroses, aquest requisit es modula pel grau de transformació cel·lular, de manera que les cèl·lules neoplàsiques o transformades continuen proliferant en medis deficientes de Ca^{2+} (Macià et al. 2015; Shapovalov et al. 2011).

El flux de Ca^{2+} també juga un paper important en la tumorigènesi. Les cèl·lules tumorals presenten alteracions dels fluxos de Ca^{2+} a través de la membrana plasmàtica que repercuteixen en l'expressió, localització subcel·lular i/o funció dels diferents tipus de canals de Ca^{2+} (Das et al. 2012; Monteith et al. 2012).

Els aspectes fisiològics cel·lulars diferents de la proliferació com són la migració cel·lular, també depenen en gran mesura del flux de Ca^{2+} . A través de la migració cel·lular, la senyalització per Ca^{2+} està involucrada en la detecció direccional de les cèl·lules, en la redistribució i força de tracció del citoesquelet, i en la reposició de noves adhesions focals (Prevarskaya et al. 2011). De fet, la migració és un procés previ necessari pel desenvolupament d'una a metàstasi tumoral amb el conseqüent impacte en el pronòstic del pacient (Das et al. 2012; Macià et al. 2015; Prevarskaya et al. 2011).

Introducció

3.2. VGCCs: Estructura, tipus i propietats

Els canals de calci modulats per voltatge (VGCCs) són proteïnes heteromèriques formades per una subunitat principal α_1 i tres subunitats auxiliars o reguladores α_2 - δ , β i γ (Gurkoff et al. 2013). La subunitat α_1 és la més gran (190-250 kDa) i serveix com a porus i sensor del canvi de potencial, a més de ser el lloc principal de la regulació del canal per part dels segons missatgers, drogues i toxines. La subunitat α_1 està formada per quatre dominis homòlegs compostos per sis segments transmembrana helicoïdals (S1-S6) que determinen les característiques clau del canal (Catterall 2000; Dolphin 2016).

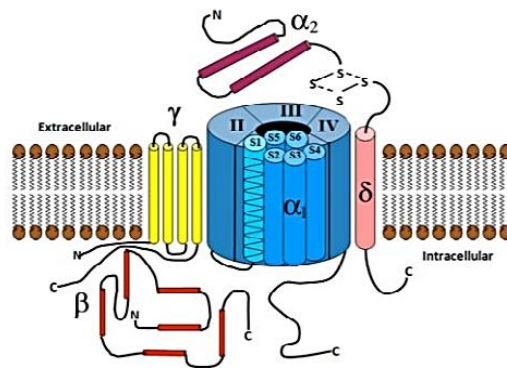


Figura 25. Estructura dels VGCCs. La α_1 és la subunitat formadora de porus que conté la maquinària de detecció de voltatge i els llocs d'unió dels inhibidors dels canals. Les subunitats $\alpha_2\delta$ i β milloren l'expressió i modulen la dependència de voltatge i cinètica de VGCCs. **Extret de (Gurkoff et al. 2013).**

Les subunitats auxiliars (β , $\alpha_2\delta$ i γ) que estan associades a la subunitat α_1 i formen aquest complex multimèric, modifiquen les propietats biofísiques del VGCC i el transport intracel·lular (Gurkoff et al. 2013).

S'han descrit sis tipus funcionals de canals de Ca^{2+} denominats: T, L, N, P, Q i R. Aquests canals es poden classificar atenent a les seves propietats biofísiques i farmacològiques, però, la classificació més utilitzada es basa en el rang de voltatge necessari per a la seva activació, classificant-los en dues categories: canals de Ca^{2+} de baix i d'alt voltatge. El canal de tipus T és l'únic canal de Ca^{2+} de baix voltatge descrit fins a l'actualitat, mentre que els canals de tipus L, N, P, Q i R han estat caracteritzats com a canals de Ca^{2+} d'alt voltatge, pel fet que es requereixen grans despolaritzacions per a la seva activació i funció (Catterall 2000; Huc et al. 2009).

Al genoma dels mamífers hi ha deu gens que codifiquen per les subunitats formadores de porus ($\alpha 1$) i es classifiquen en tres famílies per criteri d'homologia de seqüència: Cav1 (originalment anomenada tipus L), Cav2 (tipus N, P/Q i R), Cav3 (tipus T). La família Cav3 és la més diversa i compren tres isoformes, Cav3.1, Cav3.2 i Cav3.3 que es diferencien per les seves propietats electrofisiològiques i farmacològiques (Perez-Reyes 2003).

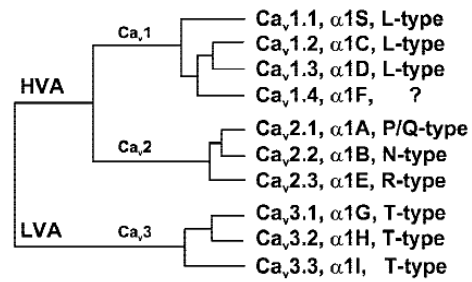


Figura 26. Arbre evolutiu dels Canals de Calci. Extret de (Perez-Reyes 2003).

3.3 Canals de Calci de tipus T (TTCCs) i Melanoma

Els Canals de Calci Tipus T (TTCCs), es troben en una gran varietat de cèl·lules excitable i no excitable (neurones, múscul cardíac, múscul llis, múscul esquelètic durant el desenvolupament, fibroblasts, osteoblasts, astròcits, glàndula pituïtària, etc.) i es troben absents en cèl·lules cromafines i en neurones simpàtiques. La seva funció està relacionada principalment amb l'activitat rítmica (marcapassos) i amb l'entrada de Ca^{2+} a potencials negatius. S'activen de forma voltatge dependent a potencials negatius (-70 mV), observant-se l'amplitud màxima del corrent al voltant de -20 mV de potencial de membrana (Catterall 2000; Perez-Reyes 2003).

La senyalització per Ca^{2+} està freqüentment alterada en les cèl·lules tumorals i, els VGCCs juguen un paper important en la homeòstasi del calci (Macià et al. 2015).

Els TTCCs semblen ser especialment adequats per promoure la progressió del cicle cel·lular en virtut de la seva ràpida activació després d'una despolarització feble. Aquesta característica permet increments transitoris de Ca^{2+} citosòlics en cèl·lules no excitable que sembla que afavoreixen la progressió mitòtica mitjançant la unió directa del Ca^{2+} a efectors intracel·lulars com la calmodulina (CaM). Per altra banda, els VGCCs també participen en la progressió del càncer generant ones de Ca^{2+} oscil·ladores que afavoreixen la progressió del cicle cel·lular (Macià et al. 2015). La isoforma

Introducció

Cav3.1 dels TTCCs s'ha observat que es sobreexpressa en cèl·lules de glioma (Latour et al. 2004; Zhang et al. 2017) i en melanoma (Das et al. 2012; Maiques et al. 2018; Maiques et al. 2016), mentre que la isoforma Cav3.2 es troba augmentada en diversos tumors tals com en càncer de mama, còlon, pròstata, ovari, esòfag, colon i melanoma, on promouen la proliferació cel·lular (Latour et al. 2004). Conseqüentment, una disminució de la funció o una activitat aberrant dels TTCCs pot afectar al desenvolupament i progressió del càncer a través del seu paper en la regulació de la progressió cel·lular (Chen et al. 1988). A més, la hipermetilació del gen CACNA1G (Cav3.1) en diversos tumors humans (colorectal, pancreàtic i gàstric), així com en leucèmies mieloides agudes, resulta en el silenciament de Cav3.1, indicant que pot tenir un paper com a supressor tumoral (Ueki et al. 2000).

El 2012, el nostre grup de recerca va observar que tant els melanòcits normals com les cèl·lules de melanoma transformades expressen VGCCs funcionals, incloent membres de la família Cav1 (tipus L), Cav2 (N, P / Q o R-tipus), i Cav3 (tipus T) (Das et al. 2012). A més, es va descriure que l'expressió d'algunes isoformes de les diferents famílies depenia de la línia cel·lular. Concretament, es va demostrar que els melanòcits no transformats expressaven nivells molt baixos de les tres isoformes dels TTCCs (Cav3.1, Cav3.2 i Cav3.3) en comparació amb les línies cel·lulars i biòpsies de melanoma. Els resultats obtinguts en els experiments de silenciament de Cav3.1 i Cav3.2 van indicar que els TTCCs promouien la progressió de les cèl·lules de melanoma; i a més que l'expressió de Cav3.1 estava associada amb una progressió més lenta del cicle cel·lular mentre que Cav3.2 s'induía en condicions d'hipòxia (Das et al. 2012).

Posteriorment, gràcies a estudis amb biòpsies humanes de melanoma, el nostre grup va poder estudiar l'expressió dels TTCCs en les diferents mostres de teixit i correlacionar-la amb l'evolució i la progressió tumoral d'aquesta neoplàsia. Gràcies a tècniques d'immunohistoquímica (IHC), vam descriure un augment gradual de l'expressió dels TTCCs des de la pell normal a nevus comuns, nevus displàsics i mostres de melanoma primari i metastàtic, però amb diferències en la distribució d'ambdues isoformes (Maiques et al. 2016). Particularment, l'expressió de Cav3.2 va ser significativament més alta en el melanoma metastàtic que en el melanoma primari mentre que l'expressió de Cav3.1 es va veure incrementada en totes les mostres de melanoma (tant primari com metastàtic). Per altra banda, també vam poder correlacionar positivament el Breslow, un paràmetre de pronòstic determinant en l'evolució de la neoplàsia, i l'expressió dels TTCCs (Cav3.1 i Cav3.2). Finalment, gràcies a la immunodetecció de diferents proteïnes implicades en la progressió i el

desenvolupament del melanoma, vam descriure una correlació estadística que mostra una interacció lineal entre BRAF^{V600E}/Cav3.1/LC3/Ki67/Cyclin D1/Cav3.2/Glut1. Aquesta correlació ens indica que l'expressió de Cav3.1 està significativament associada amb la presència de la mutació BRAF^{V600E} i la proteïna LC3, important pel procés autofàgic. A més, ens descriu que la isoforma Cav3.2 està correlacionada amb Glut1, un marcador d'hipòxia i Ciclina D1, a la vegada que amb Ki-67, marcadors de progressió del cicle cel·lular i proliferació i per tant, de l'evolució tumoral. La supervivència lliure de malaltia (PFS) i la supervivència global (OS) es van correlacionar inversament amb l'augment d'expressió de Cav3.2. La PFS també es va correlacionar inversament amb la sobreexpressió de Cav3.1, indicant que l'expressió d'aquestes dues isoformes marca la progressió tumoral del melanoma i que la seva sobreexpressió en el tumor primari pot ser un indicador de mal pronòstic (Maiques et al. 2016).

3.4. Inhibidors farmacològics dels TTCCs: Implicacions terapèutiques

Els inhibidors dels TTCCs, són fàrmacs antagonistes dels canals que alteren el flux del Ca²⁺ de les cèl·lules provocant una desregulació dels processos fisiològics. Hi ha una varietat d'agents que poden afectar als TTCCs amb diferents graus d'especificitat.

El **Mibefradil**, és un inhibidor dels TTCCs aprovat per la FDA i comercialitzat prèviament per Roche com a Posicor® per al tractament de la hipertensió (Chen et al. 1988). El Mibefradil es va introduir el 1997 a la clínica com un agent per l'angina de pit i antihipertensiu, però va ser retirat del mercat en menys d'un any després del seu llançament a causa d'interaccions adverses amb beta-bloquejants i agents hipolipemians (Mullins et al. 1998). No obstant, el Mibefradil en els últims anys s'ha aprovat de nou per la FDA, amb la condició de "medicament orfe" per al tractament de càncers de pàncrees, glioblastoma multiforme i càncer d'ovari (clinicaltrials.gov).

A nivell químic, el Mibefradil és una tetralina benzimidazoílica substituïda que s'uneix selectivament i inhibeix els TTCCs. El seu mecanisme d'acció es caracteritza pel bloqueig selectiu dels canals de calci transitoris activats per baix voltatge (tipus T), tot i que també s'uneix als canals de calci de llarga durada activats per alt voltatge (tipus L).

Introducció

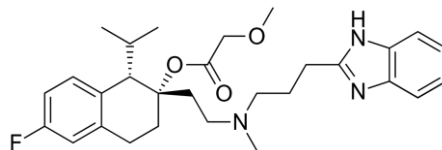


Figura 27. Estructura química del Mibefradil.

El Mibefradil, es distingeix d'altres antagonistes dels canals de calci, ja que té major afinitat (10 a 20 vegades superior) pels LVA (tipus T) (Rodrigues et al. 2018).

El Mibefradil ha estat reconegut com un inhibidor de la proliferació en molts tipus de línies cel·lulars diferents, incloent cèl·lules mononuclears de la sang (Lijnen et al. 1999), en leucèmia (Schmitt et al. 1992), glioblastoma (Chemin et al. 2001), retinoblastoma (Hirooka et al. 2002), cèl·lules tumorals de la glàndula pituïtària (Rodrigues et al. 2018). A part de les seves propietats anti-proliferatives, el Mibefradil s'ha demostrat que pot afectar a la motilitat cel·lular i les propietats invasives del fibrosarcoma (Huang et al. 2004). *Taylor et al.* van observar que la injecció local de Mibefradil a les cèl·lules humanes de carcinoma de mama implantades en el teixit adipós subcutani de ratolí té un efecte antitumoral ja que indueix la mort *in vivo* (Taylor et al. 2008).

El **Pimozide**, que es comercialitza sota el nom d'Orap® és un fàrmac antipsicòtic de la classe difenilbutilpiperidina. Va ser descobert per Janssen Pharmaceutica el 1963.

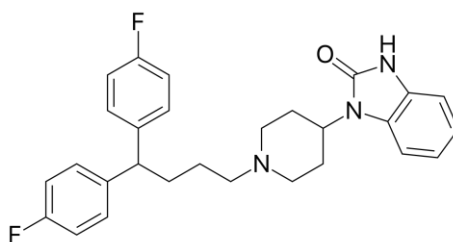


Figura 28. Estructura química del Pimozide.

El fàrmac antipsicòtic Pimozide també és un potent inhibidor dels TTCCs i dels canals de tipus L, però amb menys selectivitat que el Mibefradil (Galizzi et al. 1986). El Pimozide també s'ha observat que inhibeix la proliferació de cèl·lules tumorals i redueix la migració cel·lular en el carcinoma hepatocel·lular (Chen et al. 2017), en el càncer de pròstata (Zhou et al. 2016), en el càncer de mama (Johnston et al. 2018) i en el melanoma (Jia et al. 2018).

En un estudi posterior a la caracterització de l'expressió dels TTCCs en línies de melanoma, el nostre grup va descriure que els inhibidors farmacològics dels TTCCs indueixen una parada del cicle cel·lular en fase G1/S i que desencadena una mort per apoptosi en les cèl·lules de melanoma, la qual és parcialment depenent de l'activació de les caspases mitocondrials (Das et al. 2013). Un anàlisi en profunditat del procés va revelar que la inducció de l'apoptosi és precedida per una activació d'estrès de reticle (ER) i la posterior inhibició del flux autofàgic, activat de forma constitutiva en les cèl·lules de melanoma. Quan les cèl·lules de melanoma es tractaven amb Mibefradil o Pimozide, augmentaven els nivells de GRP78, GADD153, XBP-1s indicant un augment del ER, a més d'incrementar els nivells proteics de P62 i LC3II, respecte condicions basals, suggerint una inhibició del flux autofàgic. Per altra banda, les cèl·lules de melanoma tractades amb els bloquejants dels TTCCs, augmentava la seva expressió d'Annexina V i la presència de Caspasa 3, indicant la inducció de mort per apoptosi depenent de caspases. Aquests mateixos efectes es van observar amb els silenciaments gènics de Cav3.1 i Cav3.2, permetent així la identificació dels TTCCs com a noves dianes terapèutiques per desregular o inhibir l'autofàgia basal i per induir l'apoptosi en cèl·lules de melanoma (Das et al. 2013; Macià et al. 2015).

4. SECRETOMA I MICROAMBIENT TUMORAL EN EL MELANOMA

4.1. Microambient del melanoma

Les cèl·lules canceroses estan envoltades d'un nínxol complex que s'anomena *microambient tumoral*. El microambient tumoral és un concepte emergent en la investigació tumoral i s'ha convertit en un tret distintiu en la recerca. El microambient tumoral ha rebut una atenció cada vegada major en la última dècada per part dels investigadors en càncer. No obstant, la comprensió del paper del mateix en la tumorigènesi segueix evolucionant i continua sent un ítem important per descobrir en l'evolució i progressió del càncer (Yang et al. 2015).

El microambient del melanoma està format no només per les pròpies cèl·lules malignes, sinó també per interaccions complexes amb altres tipus cel·lulars com queratinòcits, fibroblasts associats al càncer (CAF), cèl·lules immunes, cèl·lules endotelials de vasos limfàtics o sanguinis, així com de components secretats per les pròpies cèl·lules tumorals, de manera que en conjunt participen en la formació, la proliferació tumoral i l'activació del mecanisme de migració/invasió de les cèl·lules de melanoma (Dvořánková et al. 2017; Herraiz et al. 2018).

Els productes extracel·lulars secretats per les cèl·lules tumorals són enzims (ex. Proteases remodeladores de matriu (MMP)); factors secretats (citoquines, quimioquines, factors de creixement, factors angiogènics, etc.) i vesícules extracel·lulars (com els exosomes). Tots aquests productes secretats són fonamentals per poder crear el microambient tumoral, que no només contribueix a la supervivència cel·lular del càncer proporcionant nutrients sinó que també participa en la formació i el control de la progressió tumoral, a més d'afavorir el microambient en nínxols distants per promoure les metàstasis (Herraiz et al. 2018; Peinado et al. 2017). D'aquesta manera, la detecció de la composició i la funció del microambient tumoral és important per entendre els mecanismes de tumorigènesi i metàstasi tumoral per tal de millorar les estratègies terapèutiques actuals (Yang et al. 2015).

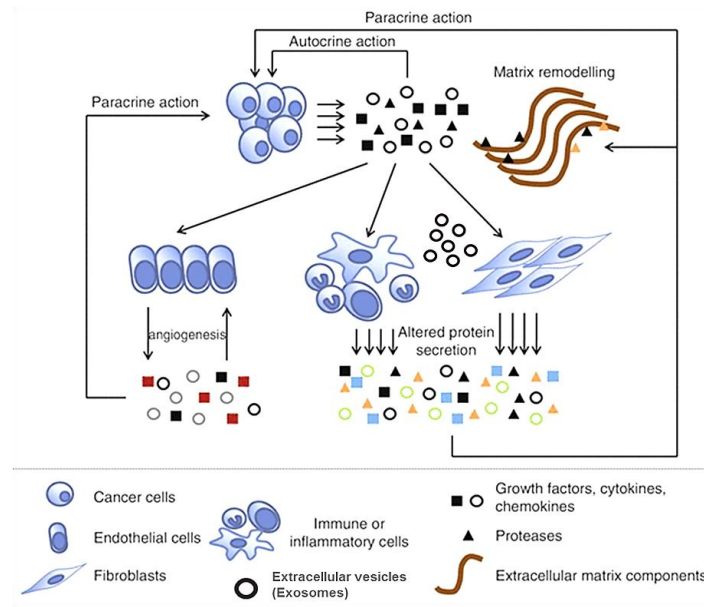


Figura 29. Representació esquemàtica del microambient tumoral. Els components secretats per les cèl·lules tumorals poden actuar sobre elles mateixes, és a dir, sobre les pròpies cèl·lules tumorals de forma autocrina, i/o interaccionar amb el microambient mitjançant una acció paracrina. **Extret de (Karagiannis et al. 2010).**

El microambient tumoral s'ha mostrat cada vegada més que condiona la funció del teixit afectat i juga un paper crític durant l'evolució de diverses neoplàsies avançades i també durant l'aparició de resistències. En aquest context, el metabolisme basal estable és fonamental. Diversos estudis avalen que el microambient en estat de metabolisme favorable pot ajudar a protegir contra la tumorigènesi i la invasió. Per contra, desregulacions en el metabolisme, es poden convertir en còmplices de la patologia i ajudar en la seva evolució i malignització (Wang et al. 2017). De fet, durant la progressió tumoral, els melanomes activen diferents factors de creixement que regulen les propietats adhesives cel·lulars les quals afavoreixen la supervivència en condicions ambientals desfavorables. Durant les etapes inicials de metastatització, les cèl·lules de melanoma necessiten activar mecanismes que les permeti migrar, envair i sobreviure fora del seu nínxol original sota noves condicions microambientals i establir amb èxit la residència en una nova ubicació (Villanueva and Herlyn 2008). Per tant, comprendre la contribució de cada component del microambient tumoral en la melanomagènesi pot obrir noves vies per a la intervenció terapèutica (Swartz et al. 2012; Villanueva and Herlyn 2008; Wang et al. 2017).

La manipulació terapèutica del microambient tumoral sembla ser un enfocament molt prometedori en la teràpia contra el càncer (Kupcova Skalnikova et al. 2017; Liberato et al. 2018). Per això, l'estudi

Introducció

del secretoma ens pot permetre identificar biomarcadors i/o dianes terapèutiques amb aplicació clínica.

4.2. Interaccions intercel·lulars en el microambient del melanoma

Les característiques fisiològiques del microambient tumoral són clarament diferents de les dels teixits normals. S'han descrit que els trets més importants implicats en la formació del microambient del tumor són la hipòxia, la deprivació de nutrients, la limitació d'energia, i també la inflamació (Yang et al. 2015).

Durant anys, els investigadors han centrat els seus esforços en estudiar les cèl·lules transformades dels tumors sòlids per tal d'explicar completament la formació del tumor. Però, actualment, hi ha evidències significatives que descriuen que elements hostes no neoplàsics, com les cèl·lules derivades del mesènquima i els components cel·lulars dels sistemes vascular i immunològic, contribueixen substancialment en la carcinogènesi, la progressió tumoral i les metàstasis de les cèl·lules tumorals transformades (Kerker and Restifo 2012).

Queratinòcits

La relació entre queratinòcits i melanòcits és una exemple clau d'interacció que existeix en una pell sana. Després de la irradiació amb UV, els queratinòcits produeixen l'hormona estimulant de melanòcits (α MSH) que estimula els melanòcits per produir la melanina. Així, les vesícules que contenen melanina (melanosomes) són transferides als queratinòcits, on el pigment de melanina protegeix els nuclis dels queratinòcits de sofrir danys en l'ADN provocat pels rajos UV. Un recent estudi transcriptòmic ha identificat que el factor bàsic de creixement del fibroblast (bFGF), l'oncogen GRO1 (GRO α , CXCL1), la IL-8 i el factor de creixement endotelial vascular A (VEGF-A) tenen un efecte juntament amb les cèl·lules de melanoma sobre els queratinòcits de la pell (Kupcova Skalnikova et al. 2017).

Fibroblasts associats al càncer (CAF)

Els fibroblasts són cèl·lules importants presents en el teixit conjuntiu de la dermis i són els principals productors de components de la matriu extracel·lular. En la pell sana, els fibroblasts també produeixen factors que regulen la proliferació, la diferenciació i la supervivència dels melanòcits (ex. Factor de cèl·lules mare (SCF), bFGF, factor de creixement de l'hepatòcit (HGF), factor de creixement transformador β (TGF β)). Els fibroblasts normals també són capaços d'estimular la secreció de IL-6,

IL-8 i $\text{GRO}\alpha$. No obstant, la secreció de IL-6 i IL-8 augmenta significativament a les cèl·lules canceroses i estan involucrades en la progressió tumoral. De fet, els fibroblasts associats al càncer (CAF) són cèl·lules freqüents en l'estroma tumoral que promouen la migració i la invasió de les cèl·lules de melanoma (Kupcova Skalnikova et al. 2017; Wang et al. 2017). Experiments de co-cultiu *in vitro* mostren que la migració de les cèl·lules tumorals depèn en gran mesura de la secreció de IL-6 i IL-8 per part dels fibroblasts, ja que l'aplicació d'anticossos neutralitzants d'aquestes citoquines inhibeixen totalment la migració de les cèl·lules de melanoma. Els CAF del melanoma també influeixen sobre els queratinòcits induint, entre d'altres, l'expressió de queratina tipus 14 (marcador de proliferació de queratinòcits basals) i vimentina (marcador d'EMT) en queratinòcits (Kupcova Skalnikova et al. 2017).

Cèl·lules del Sistema Immunològic

En el microambient tumoral es poden incloure cèl·lules immunitàries que normalment es troben en òrgans limfoides secundaris. Diferents estudis mostren la presència de limfòcits infiltrats, cèl·lules NK (**N**atural **K**iller), macròfags, cèl·lules dendrítiques (DC), eosinòfils, mastòcits i cèl·lules mieloides immadures, o cèl·lules supressores derivades de mieloides (MDSC) tant en tumors murins com humans (Kerkar and Restifo 2012). De fet s'ha descrit que les cèl·lules immunes que resideixen dins dels tumors es troben desregulades i funcionalment afectades. Tot i el gran esforç que s'està duent a terme en la investigació sobre aquestes xarxes reguladores estretament coordinades dins dels tumors, encara es necessita un estudi amb més profunditat (Kerkar and Restifo 2012; Wang et al. 2017).

Entre les cèl·lules immune que infiltren el tumor, els limfòcits T tenen un paper central en la immunitat contra el càncer. El grau d'infiltració i el fenotip de cèl·lules T en el tumor són factors predictors de resposta a la immunoteràpia del càncer. En el melanoma, molts estudis es centren en la recerca de cèl·lules T citotòxiques específiques del melanoma que podrien ser utilitzades com a teràpia. D'altra banda, la infiltració tumoral per cèl·lules immunosupressores, com les cèl·lules T reguladores (Tregs) o els macròfags immunosupressors associats a tumors (TAM), que segreguen citoquines antiinflamatòries, com TGF i IL-10 i factors pro-angiogènics, es relaciona amb un pronòstic desfavorable en la majoria de tipus tumorals (Kerkar and Restifo 2012; Kupcova Skalnikova et al. 2017).

Introducció

La reacció immune estromal és evident en molts tumors i mostra una interacció multifacètica entre el sistema immunitari i el tumor. La infiltració del melanoma maligne per leucòcits és un fenomen freqüent amb interpretació complicada. Curiosament, el pronòstic d'un pacient depèn del tipus predominant de leucòcits. Per exemple, la gran incidència peritumoral de limfòcits T i B i cèl·lules dendrítiques representa un bon marcador pronòstic. D'altra banda, el predomini dels granulòcits suggereix un mal pronòstic de supervivència (Ladányi 2015). Les cèl·lules supressores derivades de cèl·lules mieloides presents en el melanoma tenen un efecte immunosupressor i influeixen negativament en la supervivència dels pacients amb melanoma.

No obstant, tot i que les immunoteràpies (com els anticossos anti-CTLA-4 i anti-PD1) demostren un augment de l'activitat anti-melanoma, aquests agents immunoterapèutics es restringeixen principalment a la inhibició del control de cèl·lules T, als agonistes de co-estimulació de cèl·lules T i a la teràpia cel·lular adaptativa. En canvi, no s'han explorat àmpliament els mètodes per modular macròfags intratumorals i cèl·lules mieloides per superar la resistència a la inhibició de BRAF (Foong et al. 2016). De fet, hi ha evidències que suggereixen que les cèl·lules mieloides immadures posseeixen la capacitat de diferenciar-se en macròfags, cèl·lules dendrítiques (DC) i cèl·lules endotelials en resposta a estímuls proangiogènics per part de les cèl·lules tumorals. Així, per escapar de la resposta immune, les cèl·lules tumorals manipulen el microambient del tumor circumdant produint citoquines que suprimeixen les cèl·lules T citotòxiques i recluten cèl·lules immunosupressores (Mok et al. 2014).

Per altra banda, els macròfags (MO) són un tipus de cèl·lula molt plàstica que s'adapta a l'ambient estromal dels tumors malignes, caracteritzat per necrosi tissular, baixa pressió d'oxigen i altes concentracions de lactat i piruvat (Cannarile et al. 2017). Sembla que els macròfags representen un component crucial en la progressió tumoral (Ribatti 2013; Santoni et al. 2013). S'han descrit incomptables fenotips funcionals de macròfags procedents de diversos microambients tumorals, és per això, que per facilitar l'estudi d'aquestes cèl·lules s'ha proposat l'existència de dos fenotips principals de polarització, que representen els extrems d'aquest ampli espectre de fenotips: els *macròfags M1 o clàssicament activats* i els *macròfags M2 o alternativament activats* (Foong et al. 2016; Murray et al. 2014). Durant el càncer metastàtic, el fenotip dominant del macròfag associat a tumor (TAM) es considera del tipus M2 o antiinflamatori i, immune-regulador i, per tant, promotor del creixement del tumor, de l'angiogènesi, la invasió i la metàstasi, així com de la resistència a la teràpia farmacològica. Per contra, els macròfags tipus M1 són considerats proinflamatoris i

tumorícides, i per tant supressors tumorals i inhibidors del creixement tumoral (Cannarile et al. 2017; Son et al. 2017). Aquest fenotip TAM/M2 és conseqüència de la presència contínua de citoquines com CSF-1 o M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*), les interleuquines IL-4, IL-13 i IL-10 així com limfòcits T helper (Th2). En canvi, els macròfags M1 són atribuïts a funcions tumorícides i es generen en presència del factor estimulant de granulòcits i macròfags (GM-CSF o CSF-2) i estímuls proinflamatoris com IFN γ , LPS o TNF α (Cannarile et al. 2017; Mok et al. 2014).

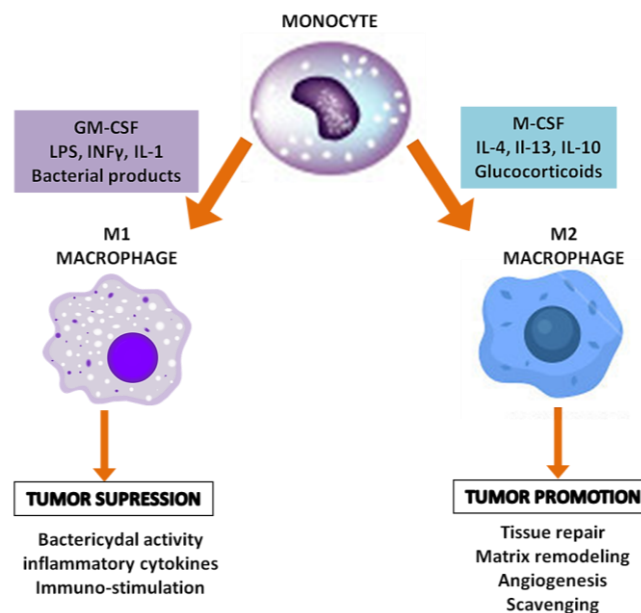


Figura 30. Regulació directa i indirecta de la supressió o estimulació immunitària per subtipus de macròfags associats a tumors. Modificat de (Cannarile et al. 2017).

Els TAM/M2 a més de la capacitat de promoure la proliferació i progressió del tumor, suprimeixen de forma eficaç les funcions immunes efectores que poden contribuir a l'eliminació de cèl·lules tumorals. Aquest silenciament de les cèl·lules efectores immunitàries s'aconsegueix mitjançant la producció de citoquines i enzims que poden suprimir directament aquestes cèl·lules efectores o indirectament a través d'altres tipus de cèl·lules immunes com ara les cèl·lules dendrítiques intratumorals (DC), les cèl·lules reguladores T (cèl·lules Treg) i les cèl·lules T helper tipus 2. Les dades publicades suggereixen que els macròfags M2 promotors de la progressió tumoral i immune-supressius són dependents de senyals mediatas per CSF1-R fent que aquest receptor sigui un objectiu atractiu per eliminar o repolaritzar aquestes cèl·lules (Cannarile et al. 2017; Foong et al. 2016).

Introducció

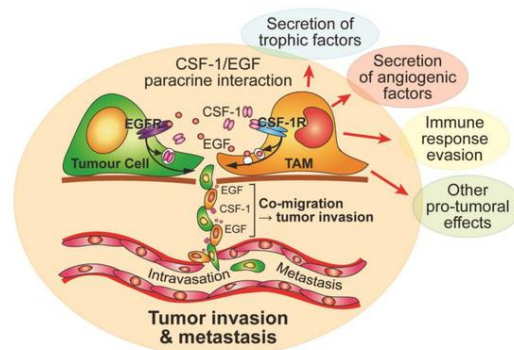


Figura 31. Contribució dels macròfags associats a tumors (TAM) en la progressió tumoral, la invasió tumoral i la metastasi. Extret de (Dwyer et al. 2017).

Altres cèl·lules immunes presents en l'estroma tumoral, com ara les cèl·lules NK (Natural Killer), les cèl·lules dendrítiques plasmocitoides, els limfòcits B o altres, estan menys investigades (Mok et al. 2014). En qualsevol cas, les cèl·lules del sistema immunitari presents en el microambient del melanoma maligne podrien aportar nous biomarcadors predictors per a la resposta a la immunoteràpia i indicar nous tractaments immunoterapèutics (Kupcova Skalnikova et al. 2017).

4.3. Secreció de citocines i microambient tumoral del melanoma

Les citocines són proteïnes que participen en moltes funcions cel·lulars i immunològiques com la senyalització cel·lular i la comunicació intercel·lular. Exerceixen a més, diverses funcions a partir de la regulació de la resposta inflamatòria, mitjançant la regulació del creixement cel·lular, la diferenciació, la quimiotaxis i l'angiogènesi, entre d'altres (Kupcova Skalnikova et al. 2017).

En el càncer, les citocines representen els reguladors clau que promouen la migració, la invasió i la metastasi de les cèl·lules tumorals, tot i que la seva expressió i activitat es troba desregulada en molts tipus de càncer. Tant és així, que les cèl·lules transformades produeixen citocines proinflamatòries, quimioquines i factors de creixement que suporten la supervivència i proliferació cel·lular i promouen la inflamació i l'angiogènesi. Això dona lloc al reclutament de cèl·lules immunes i estromals en l'interior del tumor. A més, els mediadors segregats pel tumor en el creixement, incloent citocines, contribueixen com ja s'ha comentat a la proliferació cel·lular, l'angiogènesi i la inflamació, però també a una remodelació de la matriu, a l'expressió de molècules adhesives i a una

major permeabilitat vascular, donant lloc al desenvolupament d'un nou microambient metastàtic (Kupcova Skalnikova et al. 2017).

IL-8

La IL-8 és un factor de quimiotaxis de neutròfils, però, té funcions addicionals en l'activació de l'angiogènesi i la matriu-metaloproteïnasa. L'angiogènesi i les metàstasis del melanoma poden acompanyar-se de la secreció d'IL-8 en l'estroma tumoral juntament amb la seva senyalització a través del receptor CXCR2. Els nivells sèrics d'IL-8 es correlacionen amb la fase tumoral i l'IL-8 s'ha suggerit com a biomarcador circulant del melanoma (Jenkins et al. 2015; Peng et al. 2007).

HGF (Hepatocyte-Growth Factor)

Similar a l'IL-8, la producció de HGF per cèl·lules estromals i l'activació del receptor c-Met per part d'HGF, influeix en la invasivitat del melanoma. Els nivells elevats de HGF a la sang i la presència d'exosomes que contenen Met s'associen amb la metàstasi del melanoma i la resistència a la teràpia (Hügel et al. 2016).

IL-6

La IL-6 va ser originalment identificada com un factor de diferenciació de cèl·lules B capaces de produir anticossos. Més tard es va descobrir que l'IL-6 és una citoquina immunomoduladora pleiotròpica produïda per diversos tipus de cèl·lules, com monòcits, macròfags, limfòcits, fibroblasts, queratinòcits, cèl·lules endotelials i cèl·lules tumorals que té un paper important en la patogènia i en el desenvolupament de tumors malignes, com el melanoma. Promou el creixement del tumor per inhibició de l'apoptosi i indueix l'angiogènesi tumoral (Hoejberg et al. 2012; Wang et al. 2017).

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

VEGF promou la proliferació de cèl·lules endotelials, la supervivència, la migració, la vasodilatació i la vasculogènesi mitjançant el reclutament de cèl·lules progenitores hematopoètiques derivades de la medul·la òssia. EL factor VEGF s'uneix al seu receptor TRK, VEGFR, un receptor transmembrana present en alguns melanomes. Estudis murins *in vivo* han demostrat que les línies cel·lulars de melanoma més agressives expressen majors nivells de VEGF en comparació amb línies cel·lulars no agressives. Les línies cel·lulars no agressives com Mel-2 transfectades amb el vector de sobreexpressió de VEGF, van demostrar la seva conversió a un fenotip agressiu que era capaç de

Introducció

desenvolupar en models de ratolins tumors grans no necròtics i molt vascularitzats (Dewing et al. 2012; Ni et al. 2012).

EGF (Epidermal Growth Factor)

EGF és un factor de creixement associat a una major proliferació, migració i supervivència de cèl·lules tumorals en molts càncers, com càncer de pulmó de cèl·lules no petites o el càncer de mama (Maurer et al. 2011). A més, l'EGF s'ha associat amb l'expressió de metaloproteïnes de matriu (Zuo et al. 2011), molècules d'adhesió (Lafky et al. 2008) o l'inici de la transició d'epiteli a mesènquima de les cèl·lules tumorals (Hardy et al. 2010). El factor EGF s'uneix al seu receptor TRK EGFR, un receptor transmembrana present en alguns melanomes. Estudis demostren que el *Knockdown* d'EGF en una línia cel·lular de melanoma que expressa alts nivells d'EGF (M24met) condueix a una disminució de la migració de cèl·lules tumorals *in vitro*, redueix les metàstasis ganglionars i disminueix la limfangiogènesi tumoral primària *in vivo* (Bracher et al. 2013).

CSFs (Colony stimulating factors)

Els CSFs són glicoproteïnes que actuen sobre cèl·lules hematopoètiques unint-se a receptors de superfície cel·lular específics i que s'encarreguen d'estimular la proliferació, la diferenciació i l'activació funcional de la cèl·lula sanguínia terminal (Disis 2005).

CSF-1 o M-CSF (Colony stimulating factor 1 or Macrophage colony stimulating factor)

És una citoquina que promou la diferenciació de les cèl·lules mare hematopoètiques en macròfags o altres tipus de cèl·lules relacionades. Però més recentment, s'ha demostrat que és una citoquina freqüentment produïda per diversos càncers, com el en càncer de mama, ovari, endometri, pròstata, hepatocel·lular, càncer colorectal i melanoma (Grobewska and Mroczko 2007; Mroczko et al. 2007; Sapi and Kacinski 1999; Sica and Mantovani 2012; Smith et al. 1995; Zhu et al. 2009). M-CSF es segrega per diversos tipus de cèl·lules com monòcits, fibroblasts, osteoblasts, cèl·lules estromals, cèl·lules endotelials i cèl·lules tumorals (Chockalingam and Ghosh 2014), i està involucrada no només en la supressió de la citotoxicitat, sinó també en promoure l'esgotament de les cèl·lules T antitumorals entre altres efectes pro-tumorals com la promoció del creixement cel·lular i la progressió tumoral, la promoció de l'angiogènesi associada a tumors, i de la invasió i la migració, així com la supressió de respostes immunitàries antitumorals (Dwyer et al. 2017).

G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor) i GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

El factor estimulant de la colònia granulòcita (G-CSF), produït per monòcits, fibroblasts i cèl·lules endotelials, és una citoquina que regula la producció de neutròfils dins de la medul·la òssia i afecta la proliferació de progenitors de neutròfils en resposta a la infecció. En canvi, el factor estimulant de la colònia de granulòcits-macròfags (GM-CSF) regula l'expansió i maduració dels progenitors primitius hematopoètics en les seves etapes inicials (Disis 2005).

GM-CSF afecta principalment a la proliferació, la diferenciació i l'activació de granulòcits i macròfags mitjançant la inducció de cèl·lules progenitores parcialment compromeses per dividir-les i diferenciar-se en les vies de granulòcits-macròfags. GM-CSF també juga un paper fonamental en l'hematopoesi, potenciant nombroses activitats funcionals de cèl·lules efectores madures (per exemple, neutròfils, monòcits, macròfags, cèl·lules dendrítiques) que participen en la presentació d'antígens i la immunitat cel·lular (Disis 2005). A banda, GM-CSF es produeix i segrega per una gran varietat de tipus de cèl·lules no immunitàries, incloent fibroblasts, queratinòcits i cèl·lules endotelials en resposta als estímuls apropiats. S'ha vist que GM-CSF promou el creixement i la migració de cèl·lules tumorals en el càncer colorectal, el càncer de cap i coll, el de pulmó, el glioblastoma i el melanoma (Hong 2016).

Altres citoquines

Les quimioquines CCL17 i CCL22 produïdes per macròfags infiltrats de tumors poden ajudar a reclutar limfòcits T reguladors (Tregs) al tumor i mantenir un microambient tumoral immunosupressor en el melanoma. Un altre estudi va analitzar el perfil de citoquines del líquid cefaloraquídi en metàstasis cerebrals de melanoma observant nivells elevats d'IL-8, proteïnes inflamatores de macròfag-1 (MIP-1), proteïna induïda per Interferó gamma 10 (IP-10) i TARC, totes elles biomarcadors predictius de metàstasis potencials (Kupcova Skalnikova et al. 2017).

4.4. Modulació del secretoma en la resistència terapèutica

El nombre de citoquines identificades en el secretoma de les cèl·lules tumorals es segueix expandint, però les citoquines que s'han fet servir fins ara clínicament per al tractament de pacients amb càncer inclouen IL-2, interferons (INF- α , INF- β , INF- γ), GM-CSF, i TNF, totes elles citoquines proninflamatòries per suprimir el creixement tumoral. Les úniques citoquines que han demostrat eficàcia terapèutica en el tractament del melanoma han estat el interferó alfa (INF- α) i la interleuquina 2 (IL-2). L'interferó-alfa2b (INF- α 2b) i la IL-2 han estat aprovats als Estats Units per al tractament adjuvant i pel tractament del melanoma metastàtic, respectivament, atès que produeixen un reproducible benefici clínic (Molina et al. 2012). No obstant, l'estudi del potencial diagnòstic i la significança com a factor pronòstic de les citoquines en la teràpia contra el càncer estan sent objectius de desenvolupament en projectes de recerca (Kupcova Skalnikova et al. 2017).

Per altra banda, diferents tipus cel·lulars i productes solubles s'han associat amb la resistència al tractament del melanoma. La immunitat i la desregulació del sistema immune juga un paper crucial en l'adquisició de resistència a les teràpies actuals. Per tant, combatre la resistència provocada pel tractament amb Vemurafenib o Dabrafenib en el melanoma BRA^{V600E} segueix sent un aspecte d'estudi cadent. Com hem comentat, el Vemurafenib és un potent agent terapèutic per al tractament dels melanomes portadors de la mutació BRAF^{V600E}, però aquesta teràpia s'ha d'aturar freqüentment a causa de la resistència adquirida al fàrmac amb la consegüent progressió de la malaltia (Dvořánková et al. 2017). Diferents estudis revelen que la citoquina proinflamària TNF (Tumor Necrosis Factor) produïda especialment pels macròfags, no només té un paper rellevant en la proliferació del melanoma i la invasió, sinó que contribueix a la tolerància després de la inhibició farmacològica de la via de senyalització de les MAPKs (Young et al. 2017). Altres estudis suggereixen que la resistència terapèutica podria ser impulsada per una hiperactivitat dels CAFs (fibroblasts associats a càncer), que generen un nou microambient tumoral essencial per la progressió tumoral (Dvořánková et al. 2017; Whipple and Brinckerhoff 2014). Per tant, la supressió terapèutica de l'activitat dels CAF podria ajudar a retardar o eliminar completament la resistència adquirida a la teràpia inhibidora de BRAF. Per altra banda, l'estimulació amb el factor de macròfags-granulòcits (GM-CSF) en pacients amb melanoma també sembla tenir un efecte terapèutic prometedor en alguns pacients, però els resultats són bastant heterogenis (Dvořánková et al. 2017; Hoeller et al. 2016).

Per tot això, el desenvolupament actual de les teràpies específiques en oncologia per a combatre les resistències farmacològiques es refereix principalment a dos tipus d'agents: els **inhibidors de la tirosina quinasa (TKI) o inhibidors dels receptors tirosina quinasa (RTKI)** i els **anticossos monoclonals (mAbs)**. Actualment hi ha 28 TKI aprovats per al tractament del càncer a la clínica, dels quals la meitat s'han aprovat en els últims 3 anys, i més de 100 inhibidors de quinasa es troben en diferents etapes del desenvolupament clínic. La majoria d'aquests inhibidors competeixen amb l'ATP per al lloc d'unió a ATP (Achkova and Maher 2016). A continuació es comenten alguns exemples:

Inhibidors de RTKs

Històricament, membres de la família de receptors tirosina quinasa (RTKs) han estat objecte d'una intensa investigació a causa del seu paper fonamental en la transducció de senyals i la comunicació cel·lular. Diversos RTKs són actors centrals en la determinació de la proliferació, diferenciació, migració o mort de les cèl·lules tumorals, a més del seu paper en la iniciació i progressió de cèl·lules normals a neoplàsies concretes (Achkova and Maher 2016). Recentment s'ha suggerit un paper important dels RTKs, incloent TCR, FLT-3, c-Kit, c-Fms, PDGFR en trastorns autoimmunitaris, especialment artritis reumatoide i esclerosi múltiple, però també en càncer (Dervisis and Klahn 2016; Mirshafiey et al. 2014).

Els RTKs de tipus III es componen d'un segment d'unió de lligands glicosilats extracel·lulars amb cinc dominis de la immunoglobulina (Ig), un domini transmembrana i una inserció de quinasa, que divideixen el domini de quinasa intracel·lular en dos lòbuls. Dintre del domini de quinasa citoplasmàtica, s'han descrit vuit llocs de fosforilació de tirosina. Aquest tipus de RTK inclou CSF1-R, c-kit, PDGFR α i PDGFR β (Achkova and Maher 2016).

Concretament, el receptor de CSF-1 (CSF-1R) pertany a la família de receptors de tirosina quinasa de tipus III, i la unió de CSF-1 o el lligand més recentment identificat, IL-34, indueix la homodimerització del receptor i la posterior activació de la via de senyalització del receptor que juga un paper essencial en la regulació de la supervivència i la proliferació (Cannarile et al. 2017).

Introducció

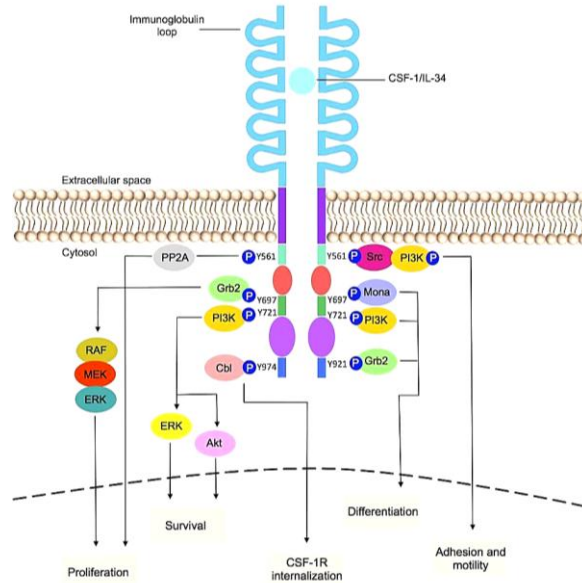


Figura 32. Via de senyalització de CSF1-R. Extret de (Achkova and Maher 2016).

Així, el CSF-1 secretat s'uneix al seu receptor (CSF-1R) promovent la proliferació i diferenciació de cèl·lules mieloides en macròfags de tipus M2 i MDSC, i la seva recaptació en tumors. Els macròfags polimeritzats amb M2 i MDSC usen diversos mecanismes per induir un medi tumoral immunosupressor conduint a la inhibició dels limfòcits T i a la progressió tumoral (Mok et al. 2014).

El ***PLX3397***, comercialitzat sota el nom de Pexidartinib, és una petita molècula que actua com inhibidor efectiu del CSF1-R. Es troba en assajos clínics de fase III i s'està provant actualment com agent únic o en teràpia combinada per a pacients amb glioblastoma, càncer de mama, melanoma i altres càncers. No obstant, a més d'inhibir a CSF1-R també inhibeix a dos receptors: c-KIT i FLT3, però amb una afinitat més baixa (Foong et al. 2016; Hume and Macdonald 2018).

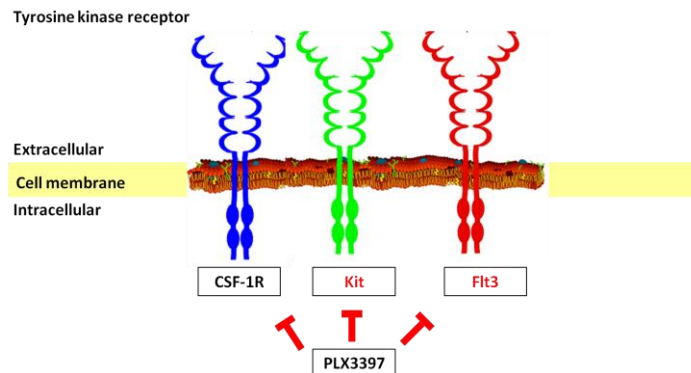


Figura 33. Acció inhibidora de PLX3397 sobre RTKs:CSF1-R/Kit/Flt3.

Tot i així, *Ngiow SF et al.* van demostrar una millora en les respostes anti-melanoma després d'una combinació de PLX4720 (inhibidor BRAF, un anàleg de PLX4032 (Vemurafenib)) amb PLX3397, en un model de ratolí de melanoma amb mutació BRAF^{V600E}. Sembla que l'administració d'inhibidors de CSF1-R per inhibir els macròfags M2 i MDSC resulta ser efectiu no només com a monoteràpia per al càncer, sinó també com a teràpia adjuvant per a superar la resistència terapèutica a la vacunació, la quimioteràpia, la teràpia cel·lular adoptiva, la radioteràpia i el bloqueig de cèl·lules T (Foong et al. 2016).

El ***Sorafenib***, comercialitzat amb el nom de Nexavar, és un inhibidor multiquinasa oral aprovat per la FDA per al tractament de pacients amb carcinoma de cèl·lules renals avançades (RCC) i carcinoma hepatocel·lular (HCC) irrecables o en els quals la teràpia basada en IFN- α o IL-2 ha fracassat (Wilhelm et al. 2008). També va ser assajat fa uns anys pel tractament del melanoma metastàtic, però amb resultats molt pobres (Mangana et al. 2012).

Concretament, el Sorafenib és un potent inhibidor de diverses isoformes de Raf quinasa, incloent RAF1, BRAF WT i BRAF^{V600E} (Mangana et al. 2012; Wan et al. 2004). A més, es dirigeix a l'angiogènesi tumoral inhibint el receptor del factor de creixement endotelial vascular VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 i el receptor del factor de creixement derivat de plaquetes (PDGFR-b) (S.M. et al. 2004) i impedeix la progressió del tumor inhibint FLT3 i C-Kit (Carlomagno et al. 2006; Wan et al. 2004).

El ***Sunitinib***, comercialitzat amb el nom de Sutent, és també un inhibidor tirosina quinasa dirigit a bloquejar diversos receptors, incloent els VEGFR-1, -2 i -3, i els receptors del factor de creixement derivats de plaquetes α i β (PDGFR- α i PDGFR- β) (Roskoski 2007). Sunitinib ha demostrat que perllonga la supervivència als pacients amb tumor estromal gastrointestinal refractari per Imatinib; carcinoma metastàtic de cèl·lules renals; i un tumor neuroendocrí pancreàtic progressiu i ben diferenciat, i ha estat aprovat per la FDA per aquestes indicacions (Delbaldo et al. 2011; Motzer et al. 2009). Però també s'ha demostrat que el Sunitinib redueix l'angiogènesi tumoral i la hipòxia induïda en el melanoma, fet que es va associar amb l'expressió i la taxa de secreció de VEGF-A (Profiles et al. 2017).

Introducció

Anticossos monoclonals (mAbs)

La immunoteràpia passiva de tumors malignes amb anticossos monoclonals terapèutics (mAbs) està modificant profundament el tractament de pacients afectats per malalties hematològiques o tumors sòlids amb recidives. Els anticossos poden exercir les seves funcions antitumorals directament mitjançant el reconeixement específic de cèl·lules diana que expressen antígens en la superfície cel·lular i bloquejar, per exemple, la via de senyalització implicada en la proliferació, induint per tant, l'apoptosi. Un altre exemple és el bloqueig d'interaccions entre els receptors de citoquines i les cèl·lules tumorals que indueixen senyals de creixement vitals o la prevenció de les interaccions entre cèl·lules tumorals i la matriu extracel·lular per tal de restringir la migració i la metastasi (Malas et al. 2014). Els anticossos també poden utilitzar-se com a immunògens, per promoure la presentació d'antígens i iniciar respostes immunitàries adaptatives contra cèl·lules tumorals, o dirigir-se a elements clau de les vies moduladores immunes per superar l'efecte de l'anèrgia cel·lular (inactivació de limfòcits). Una altra funció pot ser desorganitzar el microambient tumoral, per inhibir l'angiogènesi, restringint el subministrament de nutrients vitals a les cèl·lules tumorals i/o reduint el nombre de cèl·lules capaces de migrar a la circulació i generar metastasis (Malas et al. 2014).

Alguns estudis exposen que tot i que alguns pacients poden beneficiar-se de mAbs administrats com a tractament de primera línia d'un sol agent i/o com a teràpia de consolidació (per eliminar qualsevol cèl·lula tumoral que hagi persistit després del tractament terapèutic inicial), la majoria dels pacients que puguin rebre mAbs terapèutics ho faran amb combinació amb altres compostos de teràpia dirigida o immunoteràpia. No obstant, fins a la data, tot i que està clar que els mAbs han contribuït significativament a millorar el resultat de pacients afectats per diferents tipus tumorals com càncer de colon (Jeong et al. 2014), melanoma (Foong et al. 2016) o càncer de pulmó (Hong 2016), no hi ha cap prova confirmatòria de que els mAbs modifiquin la cura d'aquells tipus de càncer que no es podrien curar amb tractaments convencionals (Reslan et al. 2009). En aquest context, s'ha demostrat que l'anticòs monoclonal IgG1 (Cetuximab, Panitumumab) que inhibeix la funció d'EGFR suprimeix la formació de metastasis en ratolins SCID prèviament injectats amb cèl·lules de melanoma a més de reduir la capacitat invasiva (Boone et al. 2011). En un altre estudi van utilitzar Bevacizumab (mAb neutralitzant de VEGF) com a potent teràpia angiogènica, però no antitumoral en el melanoma (Loops et al. 2012). No obstant, anti-VEGF sembla inhibir la fosforilació de VEGFR2 en càncer de mama (Wedam et al. 2006) i càncer de pulmó (Inoue et al. 2007).

Actualment, en un assaig de fase I/II en curs s'estudia la millor dosi i els efectes secundaris de l'anticòs monoclonal anti-M-CSF (MCS110) i el seu funcionament quan s'administra en combinació amb Dabrafenib i Trametinib en el tractament de pacients amb melanoma BRAF^{V600E/V600K} (Aris et al. 2017; <https://www.cancer.gov>). L'ús d'un mAb de M-CSF, per al bloqueig de M-CSFR i la inhibició de TAM, redueix el creixement primari del tumor en diferents models de tumors de ratolí (Hume and Macdonald 2018; Kubota et al. 2009). Per això, s'estan investigant diverses estratègies terapèutiques per superar la resistència als fàrmacs convencionals mitjançant mAbs, que sembla ser que poden tenir un rol prometedor en la immunoteràpia contra el càncer (Jeong et al. 2014).

5. RESULTATS PREVIS

Estudi de l'autofàgia i els TTCCs sobre la mort cel·lular, la migració i la invasió en el melanoma metastàtic segons el perfil genètic i mutacional.

A continuació s'exposen resultats previs els quals han estat parcialment publicats en la revista *Pigment Cell and Melanoma Research* (ANNEX) (Maiques et al. 2018) i prèviament presentats en una tesi anterior del grup (<http://hdl.handle.net/10803/405513>). Tot i ser co-primera autora de l'article publicat, des d'un punt de vista de frau legal i segons petició de la comissió acadèmica, aquests resultats no es poden incloure en l'apartat de Resultats de la present tesi, i per això es presenten com una secció de resultats preliminars. No obstant, aquests resultats seran degudament discutits en l'apartat de Discussió.

En el nostre grup hem demostrat en diverses publicacions una sobrerregulació de l'expressió dels canals de calci tipus T (TTCCs) en múltiples línies cel·lulars de melanoma i en biòpsies de pacients, comparant-los amb melanòcits normals (Das et al. 2013; Das et al. 2012). En aquestes dues publicacions, també es va demostrar que aquests canals són funcionals i que el seu bloqueig o inhibició repercuteix en la viabilitat cel·lular, la progressió del cicle cel·lular, ja que indueix una parada del cicle cel·lular en fase G1 i promou la mort per apoptosi. A més, també hem descrit que el tractament de les línies de melanoma amb inhibidors dels TTCCs (Mibefradil i Pimozide), indueix un estrès de reticle endoplasmàtic i la posterior inhibició de l'autofàgia constitutiva en el melanoma. Per altra part, en un article més recent del grup, es va descriure per primera vegada la immunoexpressió dels TTCCs en pell normal, en nevus melanocítics comuns i displàsics i en melanoma primari i metastàtic, i es van establir els TTCCs com a potencials marcadors de progressió tumoral i mal pronòstic del melanoma cutani (Maiques et al. 2016). En conjunt, aquests resultats obren la possibilitat d'utilitzar els TTCCs com a dianes terapèutiques per al tractament del melanoma disseminat.

Expressió dels TTCCs en cèl·lules de melanoma amb perfil genètic diferent.

El calci té un paper molt rellevant en la senyalització cel·lular, controlant processos vitals com la proliferació, la diferenciació, el creixement i l'apoptosi (Santoni et al. 2012). Per la importància del calci com a segon missatger i regulador de múltiples vies de senyalització capaces de definir el destí cel·lular, hem estudiat per primer cop l'expressió dels TTCCs per RT-qPCR en una àmplia gamma de línies cel·lulars de melanoma humà amb diferents característiques moleculars: 5 línies cel·lulars

BRAF^{V600E} (M3, M238, M249, A375M, M36) i 5 línies cel·lulars amb mutació NRAS^{Q61H} (TPR, WM-1366, Skmel-147, Skmel-173, UACC257). Com s'observa en la figura 34, totes les línies cel·lulars de melanoma expressaven a nivell transcripcional les isoformes de Cav3.1 (Figura 34a), Cav3.2 (Figura 34c) i Cav3.3 (Figura 34e) i els seus nivells són, en general, superiors als melanòcits no transformats (HEMn-LP). A més, vam observar que l'expressió de l'mRNA de Cav3.1 i Cav3.3 es trobava incrementada en les línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E} en comparació amb les NRAS^{Q61H/K/L/R} (Figura 34b,f), mentre que no s'observaven diferències significatives respecte als nivells de mRNA de Cav3.2 (Figura 34d).

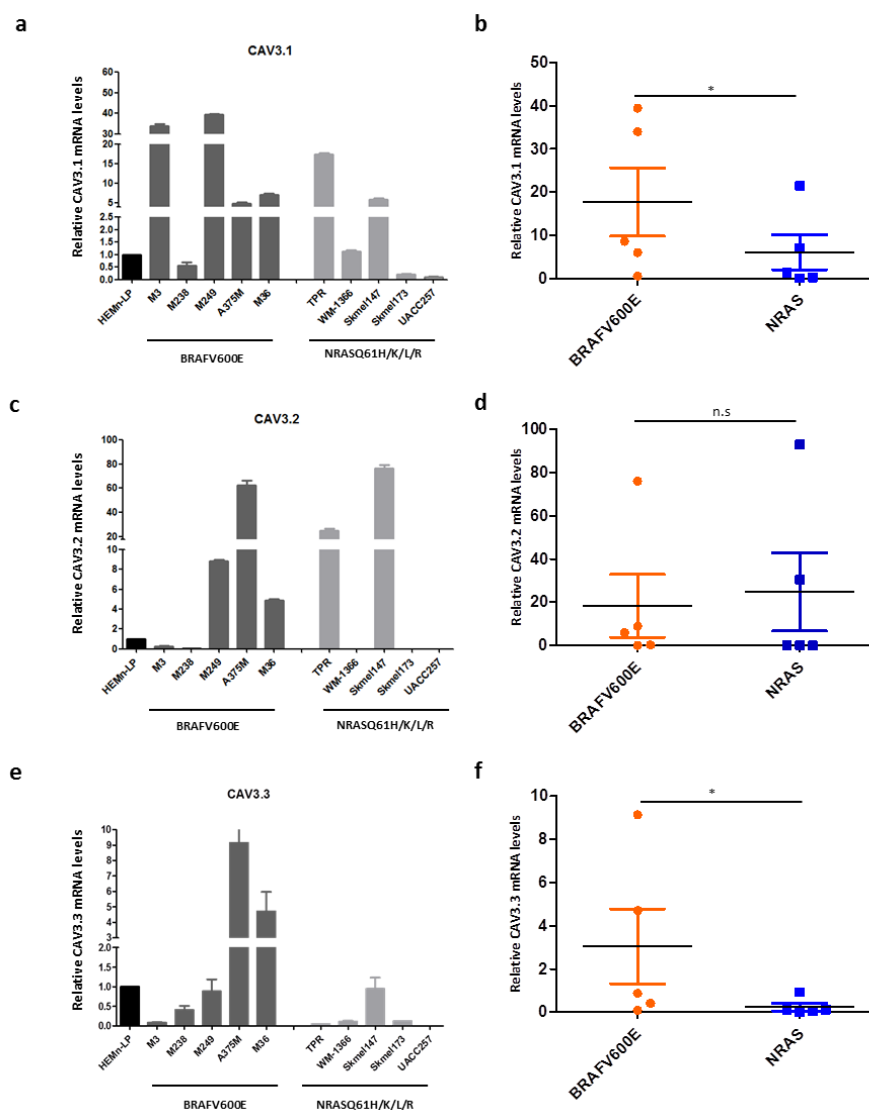


Figura 34. Els TTCCs s'expressen en línies cel·lulars de melanoma. RT-qPCR de (a) Cav3.1, (c) Cav3.2 i (e) Cav3.3 en diferents línies cel·lulars de melanoma amb mutacions en BRAF^{V600E} o NRAS^{Q6E} normalitzada respecte

Introducció

els nivells d'expressió de GAPDH. Els nivells d'mRNA de melanòcits (HEMn-LP) es mostren per comparar. Comparació dels nivells d'mRNA de (b) Cav3.1, (d) Cav3.2 i (f) Cav3.3 de les línies cel·lulars segons l'estat mutacional. L'anàlisi estadístic utilitzat va ser la prova de Mann Whitney (* $p < 0,05$; n.s, no significatiu).

Els inhibidors dels TTCCs bloquegen l'autofàgia basal en totes les línies cel·lulars de melanoma.

L'autofàgia a les cèl·lules de melanoma es troba constitutivament activa (Das et al. 2013; Maes and Agostinis 2014). Per estudiar el procés autofàgic en aquestes cèl·lules tumorals, vam mesurar per Western blot (WB) la proteïna LC3, concretament la forma lipidada d'aquest marcador autofàgic, LC3II, la qual es troba en ambdues superfícies de l'autofagosoma (externa i interna) on es degrada amb el seu *cargo* quan l'autofagosoma es fusiona amb el lisosoma (Sahani et al. 2014). Els resultats van revelar que les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} expressen de forma general nivells més alts d'aquesta proteïna autofàgica (Figura 35a).

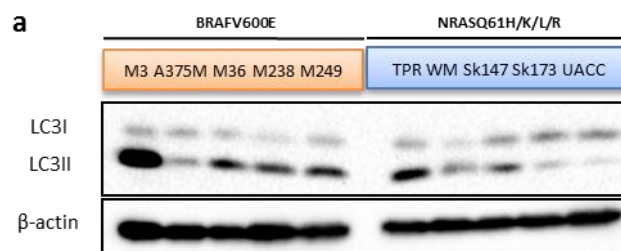


Figura 35. Anàlisi de LC3I/II per WB a partir de lisats de proteïna totals de les línies de melanoma estudiades.

Tal com hem comentat, segons els nostres resultats previs, els inhibidors farmacològics (Mibefradil i Pimozide) dels TTCCs provoquen la mort cel·lular en el melanoma per una prèvia inducció d'estrès del reticle endoplasmàtic i inhibició de l'autofàgia basal constitutiva (Das et al. 2013). En aquest treball, però, no vam diferenciar entre línies amb mutació de BRAF o de NRAS. Per determinar si la inducció de la mort cel·lular després dels tractaments amb inhibidors dels TTCCs era deguda a un bloqueig del flux autofàgic tant a les línies cel·lulars BRAF com NRAS, vam tractar les cèl·lules amb els inhibidors farmacològics dels TTCCs (Mibefradil (Mib) 10 μ M i Pimozide (Pim) 10 μ M).

Els resultats van determinar nivells més elevats de LC3II i p62 (ambdós marcadors autofàgics més utilitzats) en les línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E} (Figura 36a,c) i NRAS (Figura 36b,d) en comparació amb l'estat basal (sense tractament). Aquestes dades suggereixen un bloqueig de l'autofàgia en un punt posterior a la biogènesi de l'autofagosoma, per això podem observar increment d'ambdós marcadors autofàgics.

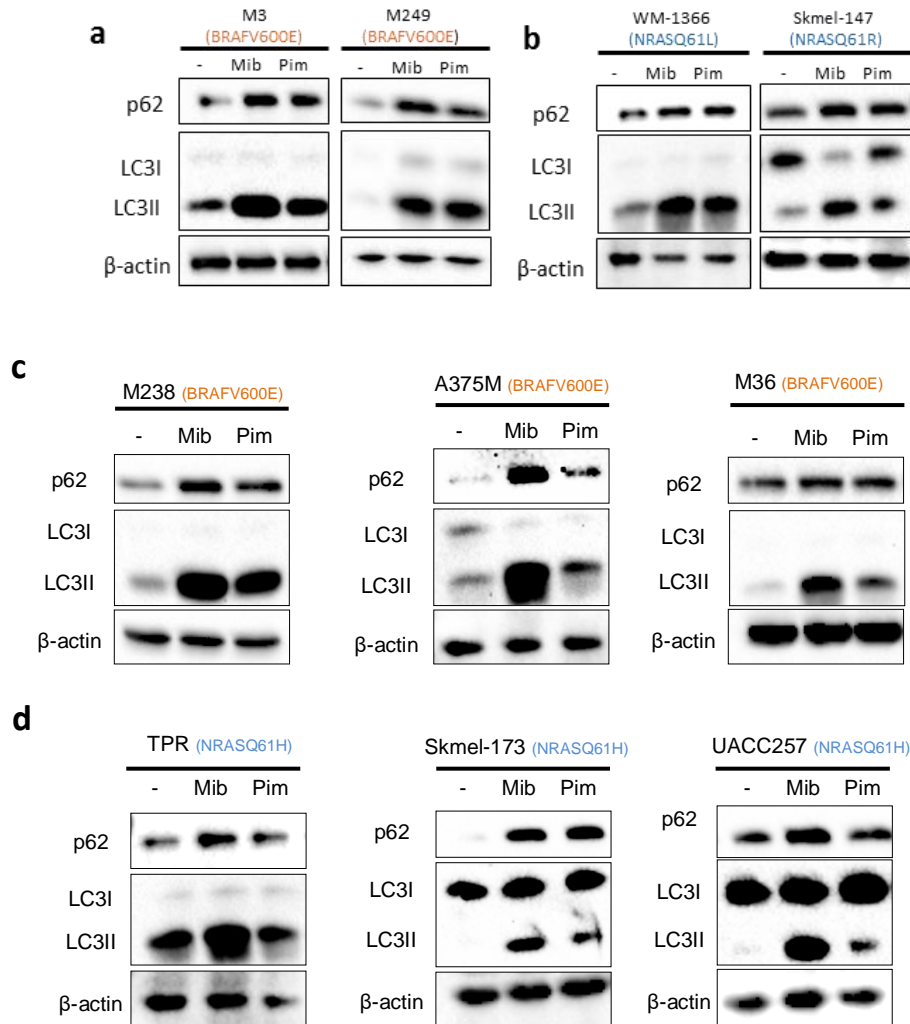


Figura 36. Els inhibidors dels TTCCs bloquegen l'autofàgia basal en totes les línies cel·lulars de melanoma. Anàlisi per WB dels nivells de proteïna p62 i LC3I/II en línies cel·lulars de melanoma amb mutació a,c) BRAF^{V600E} i b,d) mutants de NRAS exposades a Mibefradil (Mib, 10μM) i Pimozide (Pim, 10μM) durant 24 hores. La β-actina es va utilitzar com a control de càrrega.

Paral·lelament, vam tractar les línies cel·lulars de melanoma amb Cloroquina (CQ), un inhibidor per excel·lència de la fusió d'autofagosomes amb lisosomes (Boya et al. 2005) i per tant, un dels majors inhibidors del flux autofàgic (Mauthe et al. 2018; Singh et al. 2014). Aquest tractament amb CQ, va conduir a augments similars de les proteïnes p62 i LC3II en totes les línies cel·lulars, tant les portadores de mutació de BRAF com de NRAS (Figura 37).

Introducció

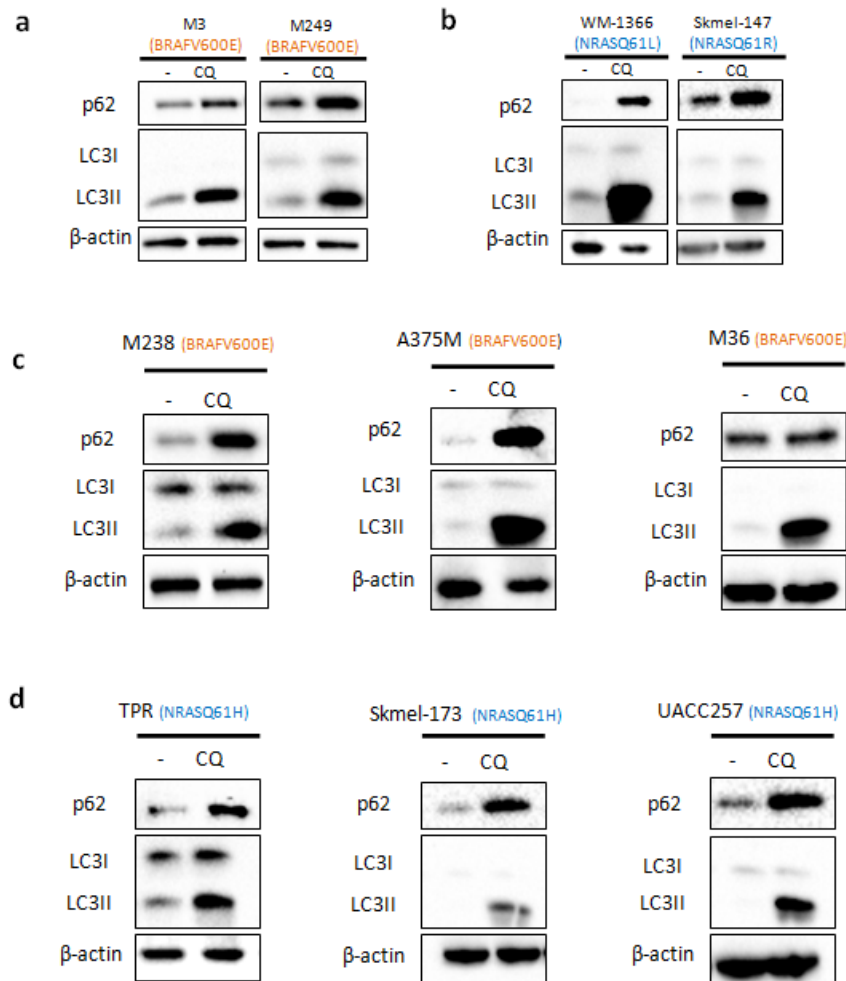


Figura 37. La Cloroquina (CQ) inhibeix l'autofàgia en totes les línies cel·lulars de melanoma metastàtic. Anàlisi per WB dels nivells de proteïna p62 i LC3I/II en línies cel·lulars de melanoma amb mutació a,c) BRAF^{V600E} i b,d) mutants de NRAS tractades amb CQ (25 μ M) durant 24 hores. La β -actina es va utilitzar com a control de càrrega.

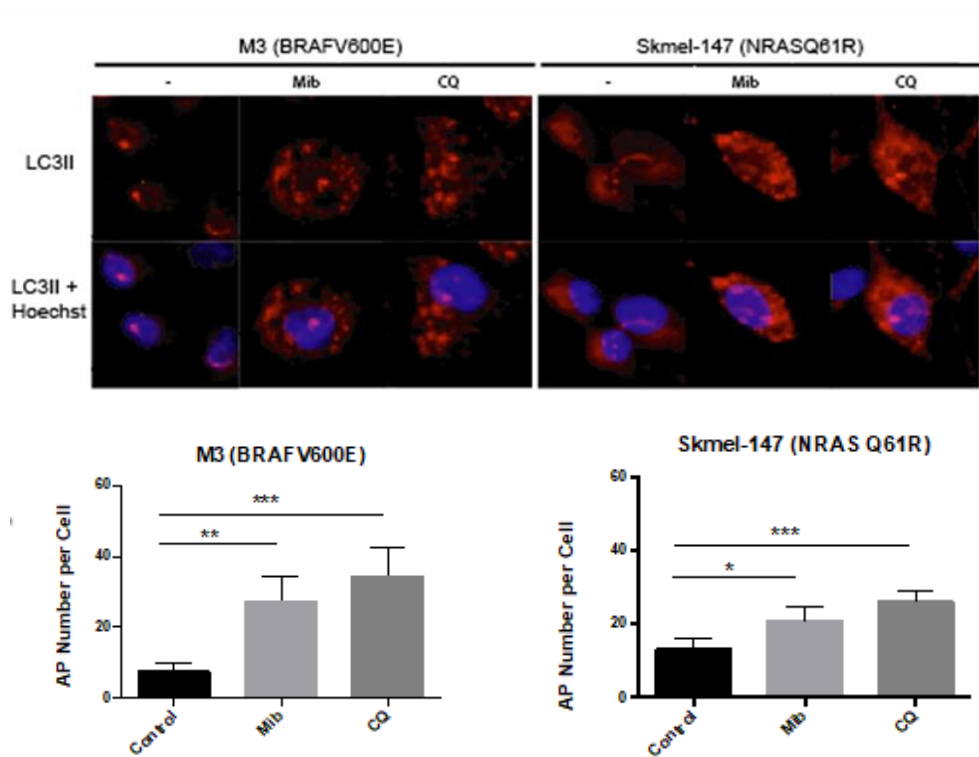
Per acabar de confirmar aquests canvis en l'autofàgia observada per Western blot, vam realitzar la immunofluorescència (IF) de LC3B com a marcador d'autofagosomes (Mizushima et al. 2010) i la transfecció amb el plasmidi tàndem (ptLC3/MRFP-GFP) per tal de monitoritzar el flux autofàgic (Kimura et al. 2009). Pel que fa a la immunofluorescència, es va observar un augment significatiu de punts (autofagosomes) en les línies cel·lulars M3 (BRAF^{V600E}) i Skmel-147 (NRASQ61R) quan aquestes van ser sotmeses a tractaments de Mib o CQ (Figura 38a). Per altra banda, el plasmidi tàndem (ptLC3/mRFP-GFP) és una construcció que permet la sobreexpressió de la proteïna autofàgica LC3 associada a les proteïnes fluorescents mRFP i GFP. La proteïna GFP perd la fluorescència a pH àcid, per tant, una vegada es fusionen l'autofagosoma i el lisosoma aquesta proteïna perd emissió verda

fluorescent, quedant només la fluorescència vermella. Aquest assaig ens permet distingir els autofagosomes, on la fluorescència serà groga a causa de la colocalització verda i vermella, dels autofagolisosomes que mostraran fluorescència vermella per la pèrdua de la fluorescència verda dins dels lisosomes (Yoshii and Mizushima 2017).

Per aquest tipus d'assaig és imprescindible la presència de controls positius i negatius del flux autofàgic. Com a control d'inducció d'autofàgia vam utilitzar la Rapamicina, coneguda per ser un inhibidor de mTOR i activador de l'autofàgia. Així, en aquesta condició s'observa un increment del marcatge en punts vermells (autofagolisosomes) respecte del control. Com a control de bloqueig de l'autofàgia vam utilitzar la Cloroquina, fàrmac antipalúdic que s'ha demostrat que inhibeix l'autofàgia produint un patró de punts grocs (autofagosomes). Finalment, el tractament amb Mibefradil presentava un marcatge amb puntejat groc, molt semblant al tractament amb CQ, indicant que és un inhibidor de l'autofàgia (figura 38b).

Introducció

a



b

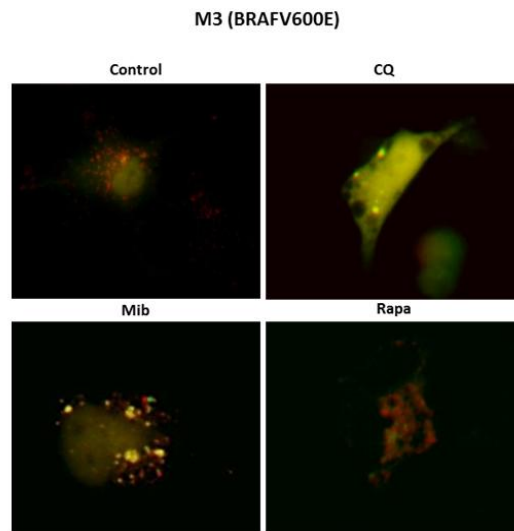


Figura 38. El Mibefradil i la Cloroquina bloquegen l'autofàgia en totes les línies cel·lulars de melanoma. a) Imatges i gràfics de la immunofluorescència de LC3B en línies cel·lulars M3 (BRAF^{V600E}) i Skmel-147 (NRASQ61R) sotmeses al tractament amb Mib o CQ. AP: Autofagosomes. b) Assaig del plasmidi mRFP-GFP-LC3 en la línia cel·lular M3 BRAF^{V600E}. Les cèl·lules control mostren els nivells basals d'autofàgia. Després dels tractaments amb Chloroquine (CQ) 25µM i Mibefradil (Mib) 10µM, hi ha punts grossos que indiquen un bloqueig del flux autofàgic. El tractament amb Rapamicina (Rapa) 500nm s'ha utilitzat com a control positiu de la inducció de

l'autofàgia. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant la prova one-way ANOVA, seguida del test post hoc de Bonferroni (p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; n.s, no significatiu).*

Per acabar de validar que efectivament el Mibefradil produeix un bloqueig de l'autofàgia, es va fer un co-tractament amb Mibefradil durant 24 hores i en les últimes 3 hores s'hi va afegir Cloroquina. L'addició de Cloroquina al tractament amb Mibefradil no va augmentar encara més els nivells proteics de p62 i LC3II (Figura 39). En conjunt, aquests resultats indiquen que els inhibidors farmacològics dels TTCCs bloquegen l'autofàgia, independentment de la mutació específica present en les línies cel·lulars del melanoma.

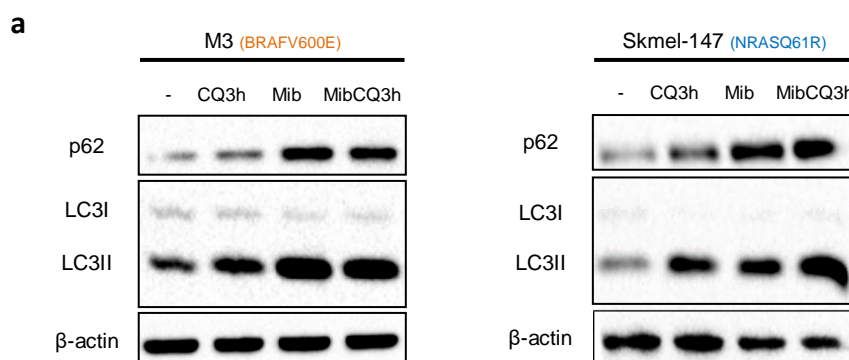


Figura 39. El co-tractament de Mibefradil i Cloroquina no incrementa encara més els nivells de p62 i LC3II. Anàlisi per WB dels nivells de proteïna p62 i LC3I/II en les línies cel·lulars de melanoma M3 BRAF^{V600E} i Skmel-147 NRAS mutata tractades amb Mib (10µM) durant 24 hores i amb CQ (25µM) en les últimes 3 hores. La β-actina es va utilitzar com a control de càrrega.

El bloqueig de l'autofàgia inhibeix la migració col·lectiva de les línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E}.

La migració cel·lular és un procés clau durant la metastasi del melanoma. Per això, es va avaluar l'efecte dels inhibidors dels TTCCs sobre la migració del melanoma mitjançant un assaig de cicatrització de ferides (*wound healing*) que mesura la migració grupal de les cèl·lules. Ambdós inhibidors farmacològics dels TTCCs (Mib i Pim) van reduir el percentatge de cèl·lules migratòries de totes les línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E} (Figura 40). De forma coherent, el tractament de les línies cel·lulars BRAF^{V600E} amb CQ també va reduir el percentatge de migració (Figura 40).

Introducció

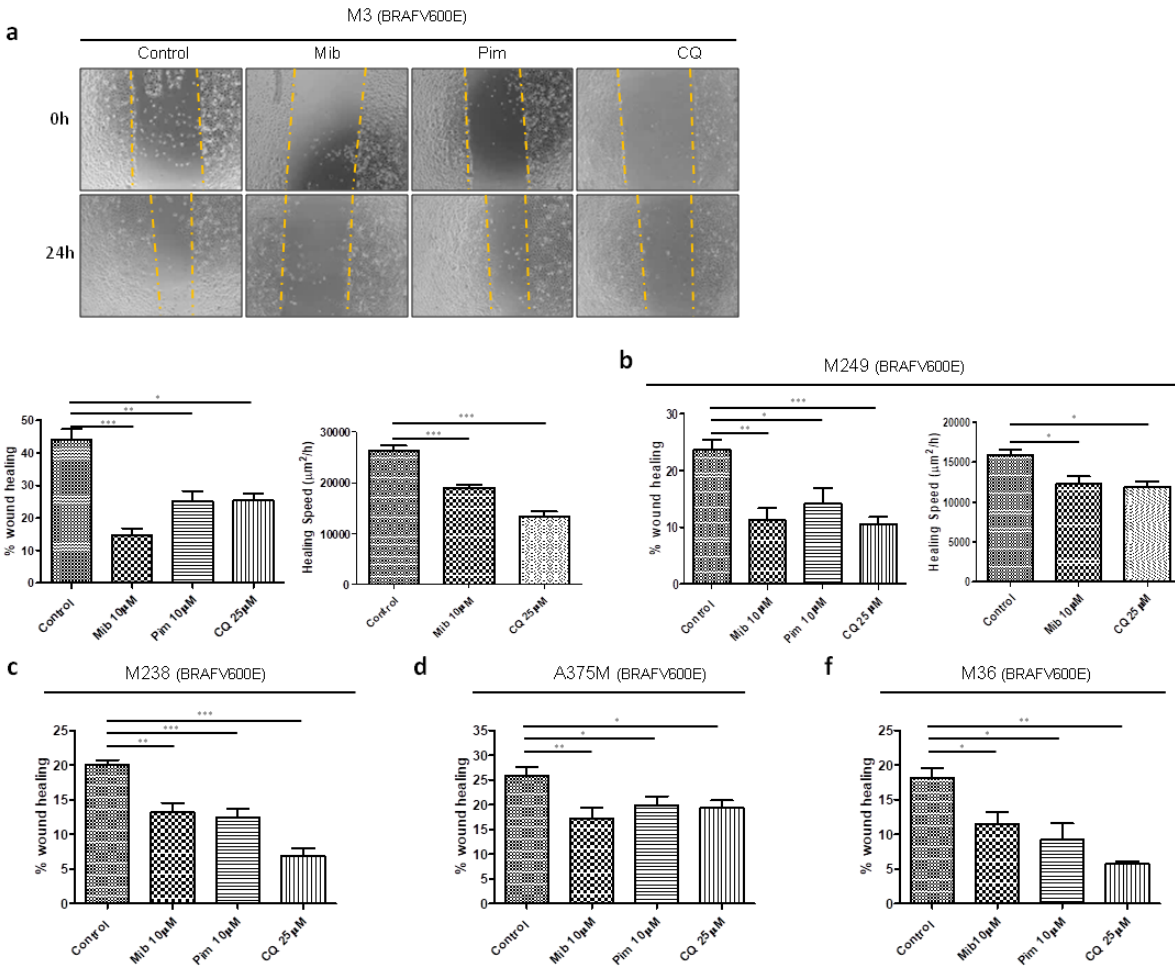


Figura 40. El bloqueig de l'autòfagia inhibeix la migració de cèl·lules de melanoma $BRAF^{V600E}$. Imatges i gràfics representatius de l'assaig de wound healing en línies cel·lulars $BRAF^{V600E}$ tractades amb Mibefradil (10µM, Mib), Pimozide (10µM, Pim) i CQ (25µM) durant 24h. Els panells de l'esquerra de la línia M3 i M249 representen el percentatge de tancament de la ferida com a resultat de com a mínim tres experiments independents. Els panells de la dreta representen la velocitat de tancament ($\mu\text{m}^2/\text{h}$) de les cèl·lules després del tractament en comparació amb el control. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant la prova one-way ANOVA, seguida del test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu).

No obstant, i curiosament, la migració no es va veure afectada en les cèl·lules de melanoma amb mutació de NRAS tractades amb els inhibidors dels TTCCs o fins i tot quan l'autòfagia estava bloquejada per l'efecte de la CQ (Figura 41).

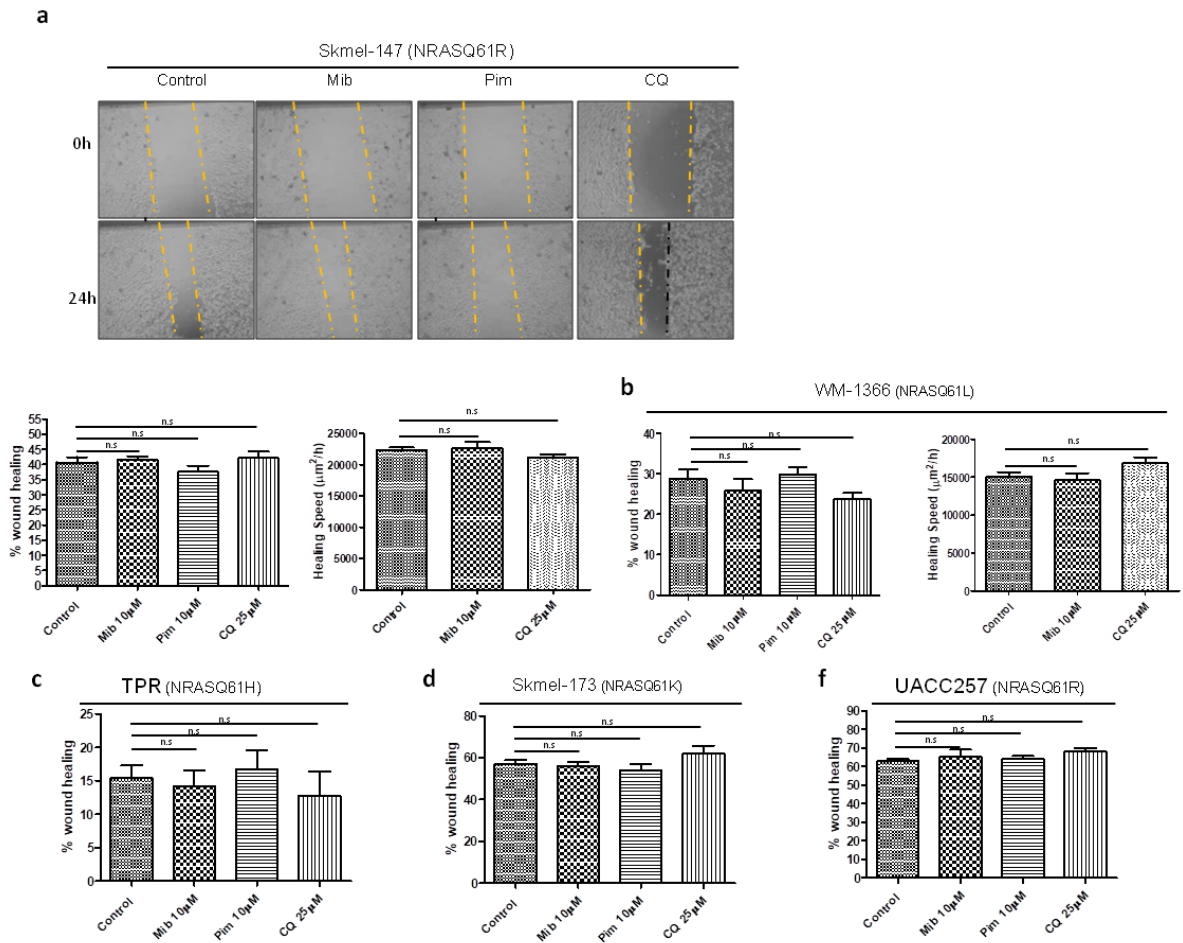


Figura 41. El bloqueig de l'autofàgia no inhibeix (de forma significativa) la migració de cèl·lules de melanoma NRAS. Imatges i gràfics representatius de l'assaig de wound healing en línies cel·lulars NRAS tractades amb Mibefradil (10µM, Mib), Pimozide (10µM, Pim) i CQ (25µM) durant 24h. Els panells de l'esquerra de la línia SKmel147 i WM1366 representen el percentatge de tancament de la ferida com a resultat de com a mínim tres experiments independents. Els panells de la dreta representen la velocitat de tancament (µm²/h) de les cèl·lules després del tractament en comparació amb el control. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant la prova one-way ANOVA, seguida del test post hoc de Bonferroni (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; n.s, no significatiu).

A més, mitjançant la microscòpia *time-laps*, es va mesurar també la migració en les nostres línies cel·lulars tumorals i els resultats van revelar una migració més lenta de les cèl·lules BRAF^{V600E} (M3 i M249) una vegada eren tractades amb Mibefradil o CQ respecte la condició control, fins i tot després d'un tractament curt de 8h (Figura 42a,b). En canvi, els tractaments amb Mibefradil o CQ no

Introducció

van afectar ni el percentatge de cicatrització de la ferida ni la velocitat de tancament de les cèl·lules amb mutació de NRAS (Figura 48c,d).

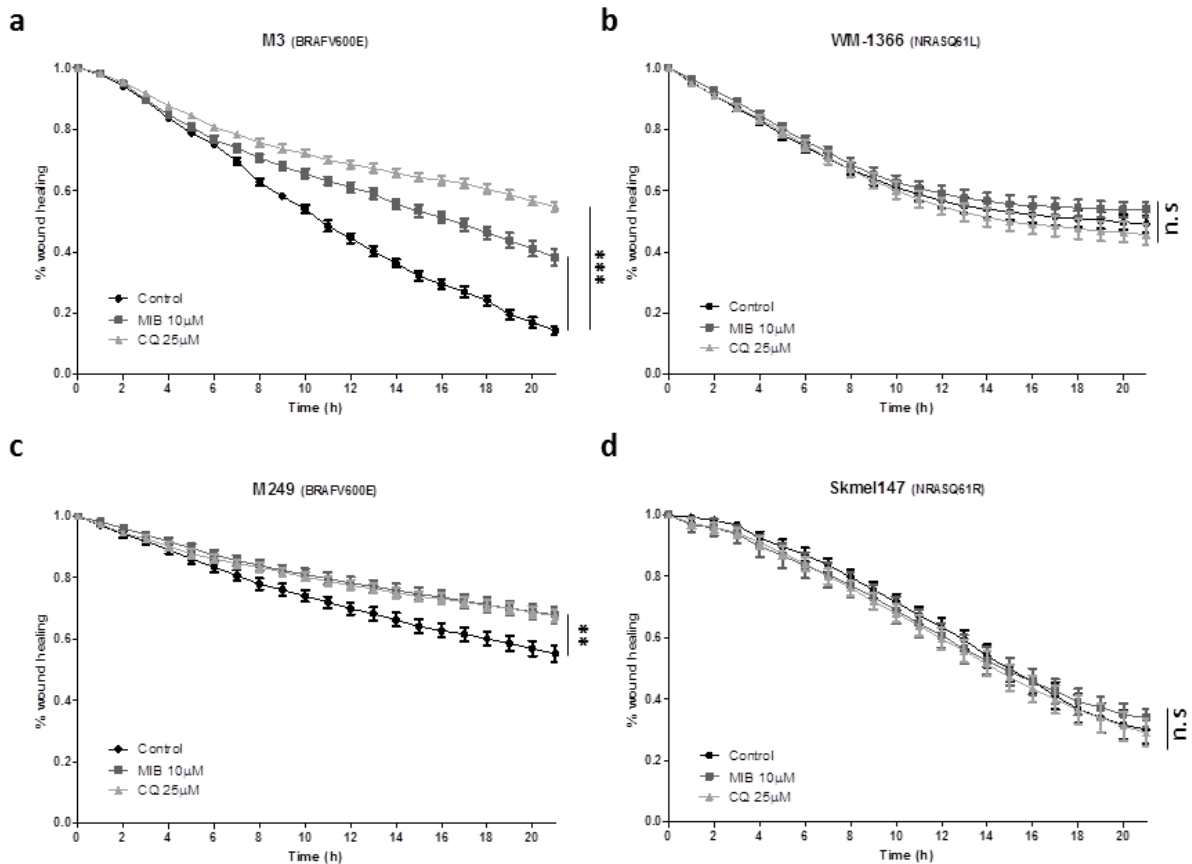


Figura 42. El front de migració cel·lular BRAF^{V600E} és més lent quan es tracta amb Mibefradil i Cloroquina. Totes les línies cel·lulars es van plantar en monocapes 100% confluents usant inserts de cultiu. El percentatge (%) de la cicatrització de la ferida es va analitzar gràcies a una macro creada al programa ImageJ, durant 21 hores tant en línies cel·lulars (a,b) BRAF^{V600E} com (c,d) NRAS després del tractament amb Mib (10µM) o CQ (25µM). L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant la two-way ANOVA, seguida del test post hoc de Bonferroni (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; n.s, no significatiu).

Per estudiar amb més profunditat com la inhibició de l'autofàgia afectava la migració cel·lular del melanoma, vam silenciar ATG5 mitjançant shRNA, una proteïna relacionada amb l'autofàgia i indispensable per a la formació dels autofagosomes (Pyo et al. 2005). El silenciament d'ATG5 va induir una disminució de LC3II tant en les línies cel·lulars BRAF^{V600E} com NRAS (Figura 43a). Tal i com esperàvem, també va disminuir la migració de cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} (M3) (Figura 43b), però no la de les cèl·lules amb mutació de NRAS (WM-1366) (Figura 43c).

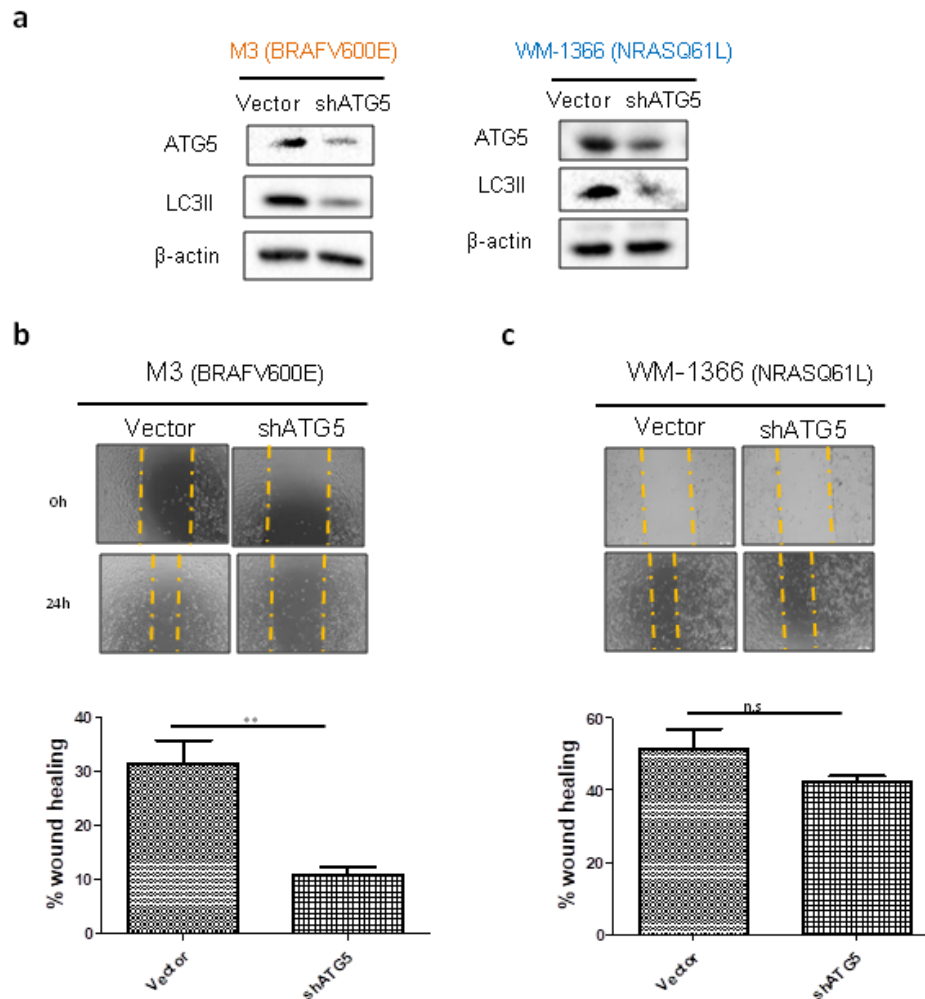


Figura 43. El silenciament gènic d'ATG5 inhibeix la migració de cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E}. a) L'anàlisi per WB mostra la regulació a la baixa dels nivells ATG5 i LC3II tant en cèl·lules BRAF^{V600E} com NRAS. La β-actina es va utilitzar com a control de càrrega. b) Percentatge de tancament de la ferida en (b) M3 i (c) WM-1366 entre cèl·lules control (vector) i cèl·lules silenciades amb shRNA d'ATG5. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant T-test (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; n.s., no significatiu).

En conjunt, aquests resultats mostren que les línies cel·lulars BRAF^{V600E} són menys migratòries després del tractament amb Mibefradil, Pimozide, Cloroquina o silenciant l'expressió d'ATG5, el que suggereix que els inhibidors dels TTCCs impedeixen la migració de les cèl·lules BRAF^{V600E} bloquejant el procés autofàgic.

Introducció

El Mibefradil i la Cloroquina inhibeixen la migració de cèl·lules individuals en línies de melanoma

BRAF^{V600E}.

Per analitzar l'efecte dels inhibidors dels TTCCs en la migració cel·lular independentment de les unions cel·lulars, vam estudiar la migració aleatòria de cèl·lules individuals mitjançant microscòpia per *time-lapse*. Per a aquests experiments de *Single Cell Random Assay*, les cèl·lules malignes de melanoma es van plantar amb menor densitat en comparació amb els mètodes anteriors i les concentracions de Mibefradil i CQ es van reduir a la meitat (5 μ M i 12.5 μ M, respectivament) per maximitzar la supervivència cel·lular. Els resultats van indicar que tot i la reducció de la concentració dels dos fàrmacs (Mib i CQ), ambdós provocaven de forma efectiva la disminució de l'autofàgia basal (Figura 44) en les cèl·lules individualitzades de melanoma, tant BRAF^{V600E} com NRAS.

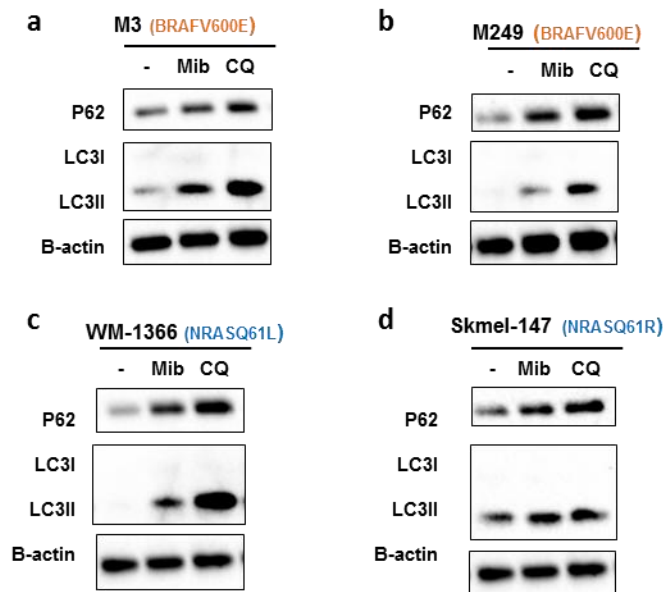


Figura 44. Les concentracions a la meitat de Mibefradil i CQ inhibeixen l'autofàgia de les cèl·lules individuals de melanoma. (a,c) BRAF^{V600E} i (b-d) les línies cel·lulars de NRAS es van tractar amb Mibefradil (5 μ M) i Cloroquina (12.5 μ M) durant 24 hores. Els nivells de proteïna de p62 i LC3I/II van ser analitzats per WB. La β -actina es va utilitzar com a control de càrrega.

Per altra banda, l'anàlisi de les cèl·lules seguides individualment (durant 24 hores, generant imatges cada 20 minuts) van demostrar que tant la distància acumulada (*Accumulated distance*) com la velocitat de migració individualitzada (*Migration Speed*) de les cèl·lules BRAF^{V600E} es reduïa de forma significativa sota el tractament amb ambdós fàrmacs (Figura 45a-b).

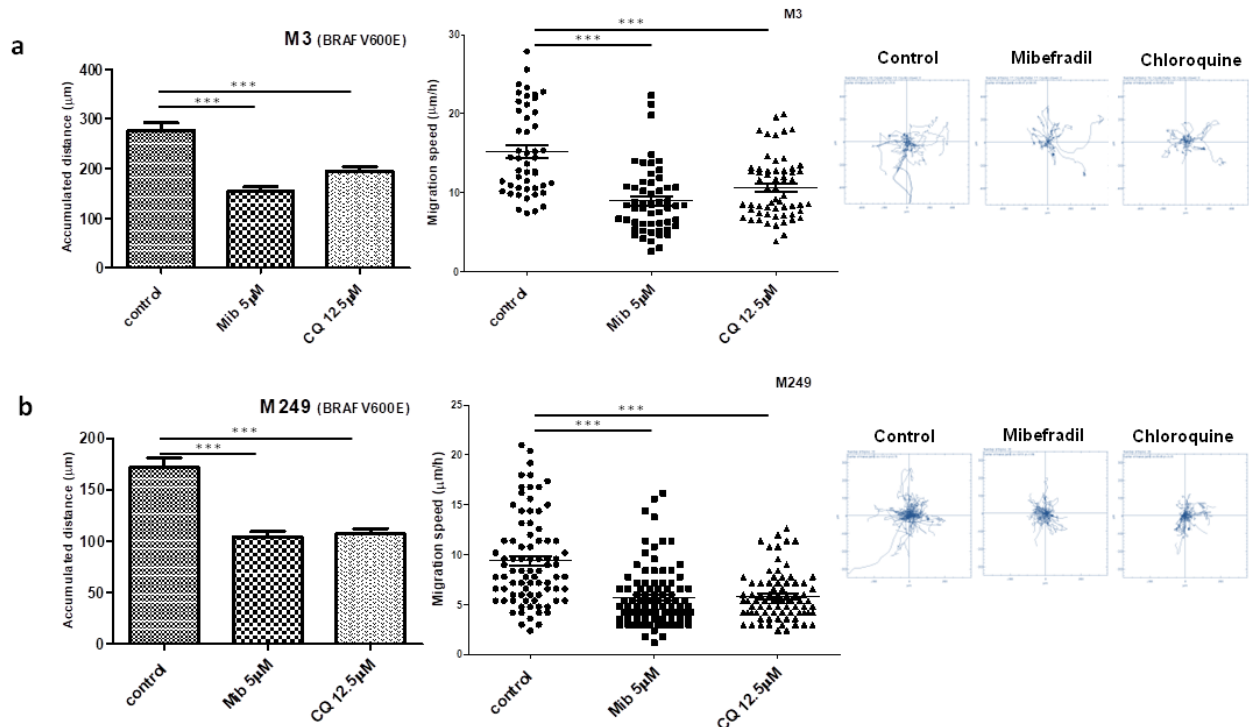


Figura 45. El Mibefradil i la CQ redueixen la migració de cèl·lules individuals en el melanoma $BRAF^{V600E}$. Anàlisi de la longitud acumulada total migrada (μm) i la velocitat de migració ($\mu\text{m}/\text{h}$) de les cèl·lules tractades en (a) M3 i (b) M249 $BRAF^{V600E}$ en comparació amb les no tractades. Els gràfics de la dreta representa la trajectòria de moviment. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant la prova one-way ANOVA, seguida del test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu).

En línia amb els nostres resultats, ni la distància ni la velocitat de les cèl·lules es van veure significativament afectades pel tractament en les cèl·lules amb mutació de NRAS (Figura 46a-b).

Aquests resultats mostren que el Mibefradil i la CQ disminueixen també la migració de les cèl·lules individuals en les línies de melanoma amb la mutació $BRAF^{V600E}$ mitjançant la inhibició del procés autofàgic, però no afecten a la migració individual de les cèl·lules que presenten una mutació en NRAS.

Introducció

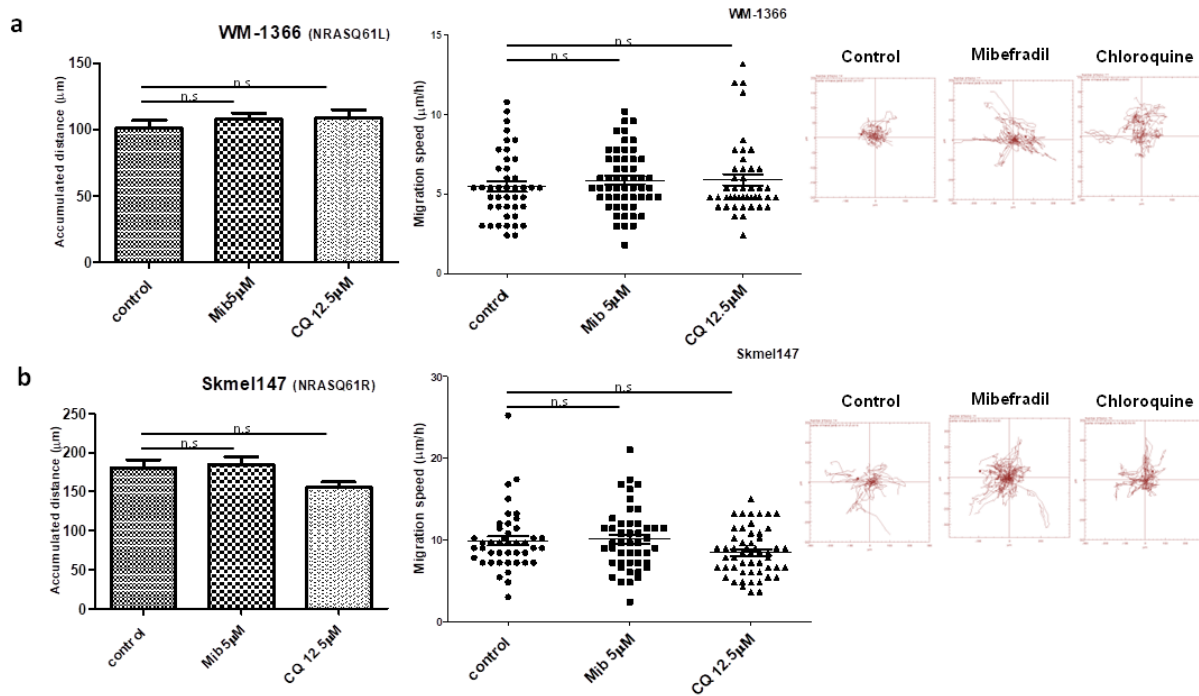


Figura 46. El Mibefradil i la CQ no afecten en la migració de cèl·lules individuals NRAS. Anàlisi de la longitud acumulada total migrada (μm) i la velocitat de migració ($\mu\text{m/h}$) de les cèl·lules tractades amb Mib o CQ en (a) WM-1366 i (b) Skmel147 NRAS en comparació amb les no tractades. Els gràfics de la dreta representa la trajectòria de moviment. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant la prova one-way ANOVA, seguida del test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu).

El bloqueig de l'autofàgia inhibeix la invasió de línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E}.

A continuació, es va investigar l'efecte dels inhibidors dels TTCCs sobre la capacitat invasiva de les cèl·lules de melanoma. Així, es va realitzar un assaig d'invasió *Transwell* en diferents línies cel·lulars i es va mesurar l'efecte dels fàrmacs en aquest procés. El tractament amb Mibefradil o CQ durant 24 hores va inhibir la capacitat invasiva de les cèl·lules del melanoma BRAF^{V600E} (Figura 47a,b). A més, vam observar resultats similars amb el tractament durant 24h amb Pimozide sobre les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} (Figura 47c,d). Tot i així, contràriament, ni els inhibidors farmacològics dels TTCCs ni la CQ van afectar la capacitat d'invasió de les línies cel·lulars amb mutació de NRAS (Figura 47a-b).

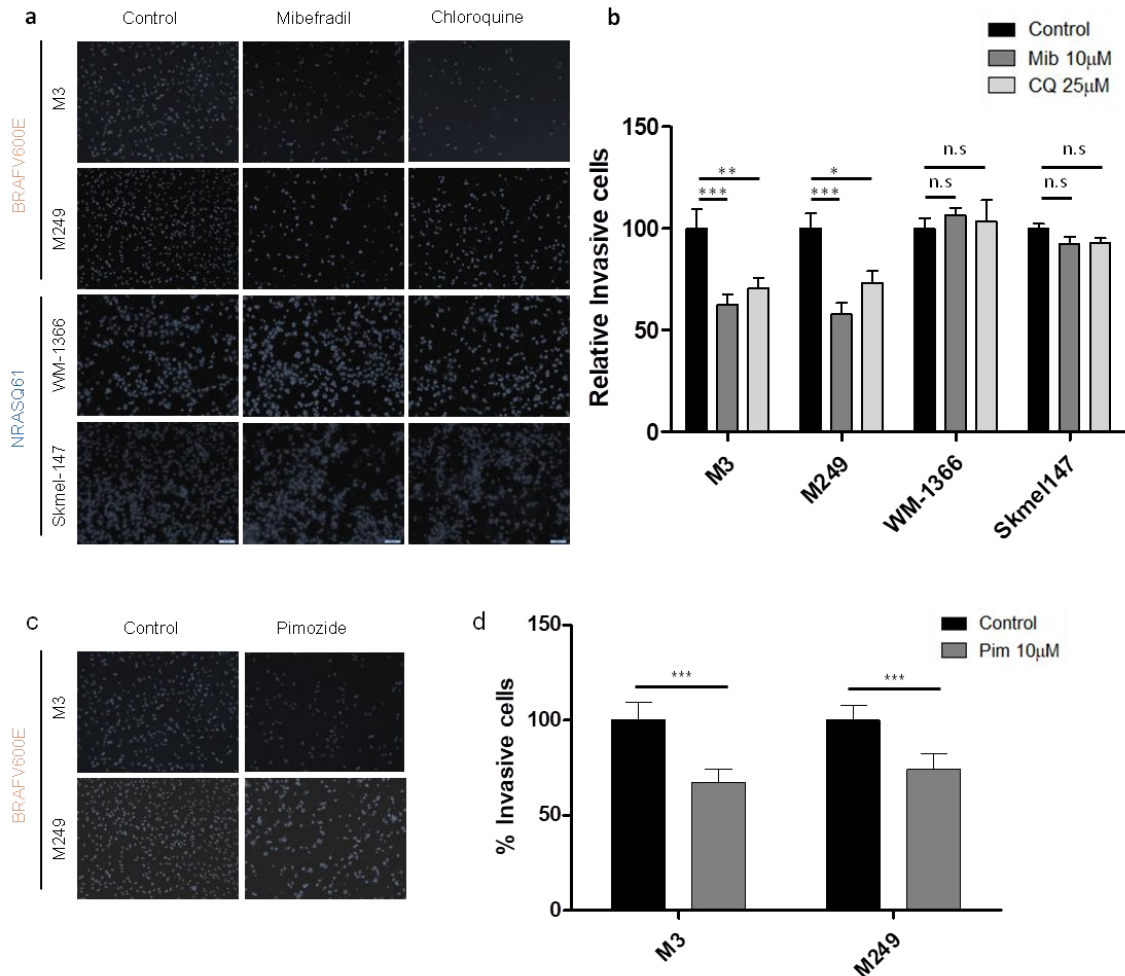


Figura 47. El bloqueig farmacològic de l'autofàgia redueix la invasió cel·lular del melanoma BRAF^{V600E}. a) Imatges representatives de tinció nuclear de Hoechst a les 24h (camp microscòpic x10). b) Percentatge (%) de les cèl·lules que van envair el matrigel després del tractament amb Mib i CQ en comparació amb el control. c) Imatges representatives de la tinció nuclear de Hoechst en les línies cel·lulars M3 i M249 tractades amb Pimozide 10µM després de 24 hores (camp microscòpic x10). d) Es van comptar les cèl·lules M3 i M249 que van envair la capa de matrigel i es presenten el percentatge (%) de les cèl·lules envaïdes després del tractament amb Pimozide en comparació amb el control. Es van utilitzar per a l'anàlisi estadística la prova two-way ANOVA, seguida del test post hoc de Bonferroni (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; n.s, no significatiu).

Per altra banda, el silenciament gènic de l'expressió d'ATG5 (Figura 48a,b) també va conduir a una reducció de la capacitat invasiva de les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} (M3). De nou, les diferències no van ser significatives en les línies cel·lulars NRAS (WM-1366) (Figura 48a,b). Aquests resultats indiquen que la inhibició o el bloqueig de l'autofàgia es pot utilitzar per controlar el potencial invasiu de les cèl·lules del melanoma BRAF^{V600E}.

Introducció

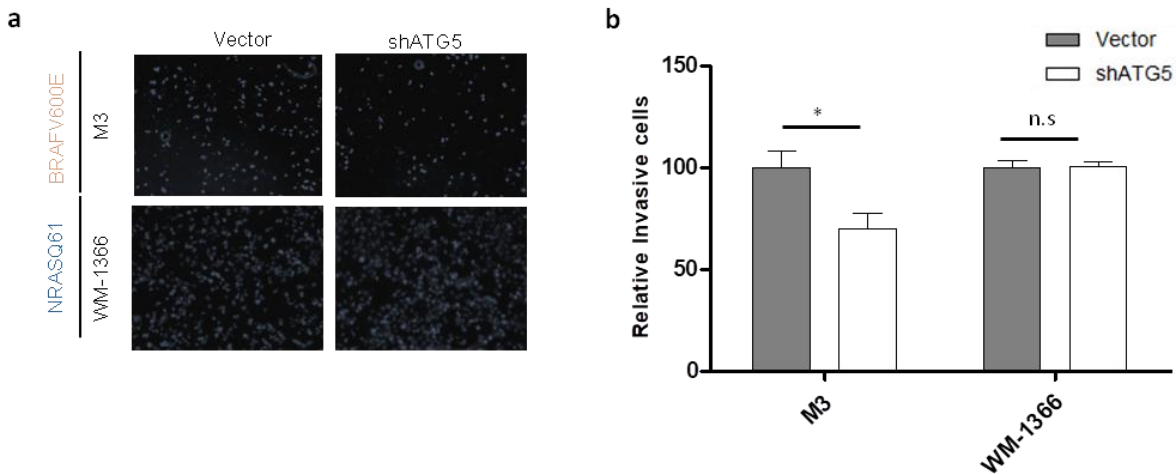


Figura 48. El silenciament gènic d'ATG5 redueix la invasió cel·lular en les línies cel·lulars de melanoma $BRAF^{V600E}$. Les cèl·lules M3 i WM-1366 van ser infectades amb lentivirus control (vector, control) o lentivirus que expressen un shRNA d'ATG5. a) Representació de la tinció nuclear de Hoechst de cèl·lules que van envair el matrigel i (d) un gràfic que representa el percentatge (%) de les cèl·lules invasores. Es van utilitzar per a l'anàlisi estadística Two-way ANOVA, seguida del test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s., no significatiu).

El silenciament gènic dels TTCCs redueix la capacitat d'invasió de les línies cel·lulars del melanoma $BRAF^{V600E}$.

Anteriorment vam demostrar que el silenciament dels TTCCs comporta un bloqueig de l'autofàgia que imita l'efecte dels inhibidors farmacològics dels TTCCs (Das et al. 2013). Per investigar la possible implicació dels TTCCs en la capacitat d'invasió de les cèl·lules de melanoma $BRAF^{V600E}$, vam silenciar els TTCCs en les cèl·lules M3 utilitzant construccions lentivirals que porten seqüències de shRNA específiques de Cav3.1 i Cav3.2.

Primer, per validar els shRNAs en la capacitat de silenciar l'expressió dels TTCCs vam determinar els nivells de mRNA per RT-qPCR (Figura 49a,b) i els nivells proteics per IHC després de la infecció lentiviral (Figura 49c). Així, es va obtenir un silenciament gènic d'aproximadament un 90% tant per la isoforma Cav3.1 com Cav3.2 a nivell de mRNA, i una disminució de la immunodetecció dels TTCCs en talls de parafina. Després del silenciament, es va avaluar l'expressió dels marcadors autofàgics observant un augment dels nivells de proteïna p62 i LC3II (Figura 49d), imitant així els efectes del Mibefradil o Pimozide.

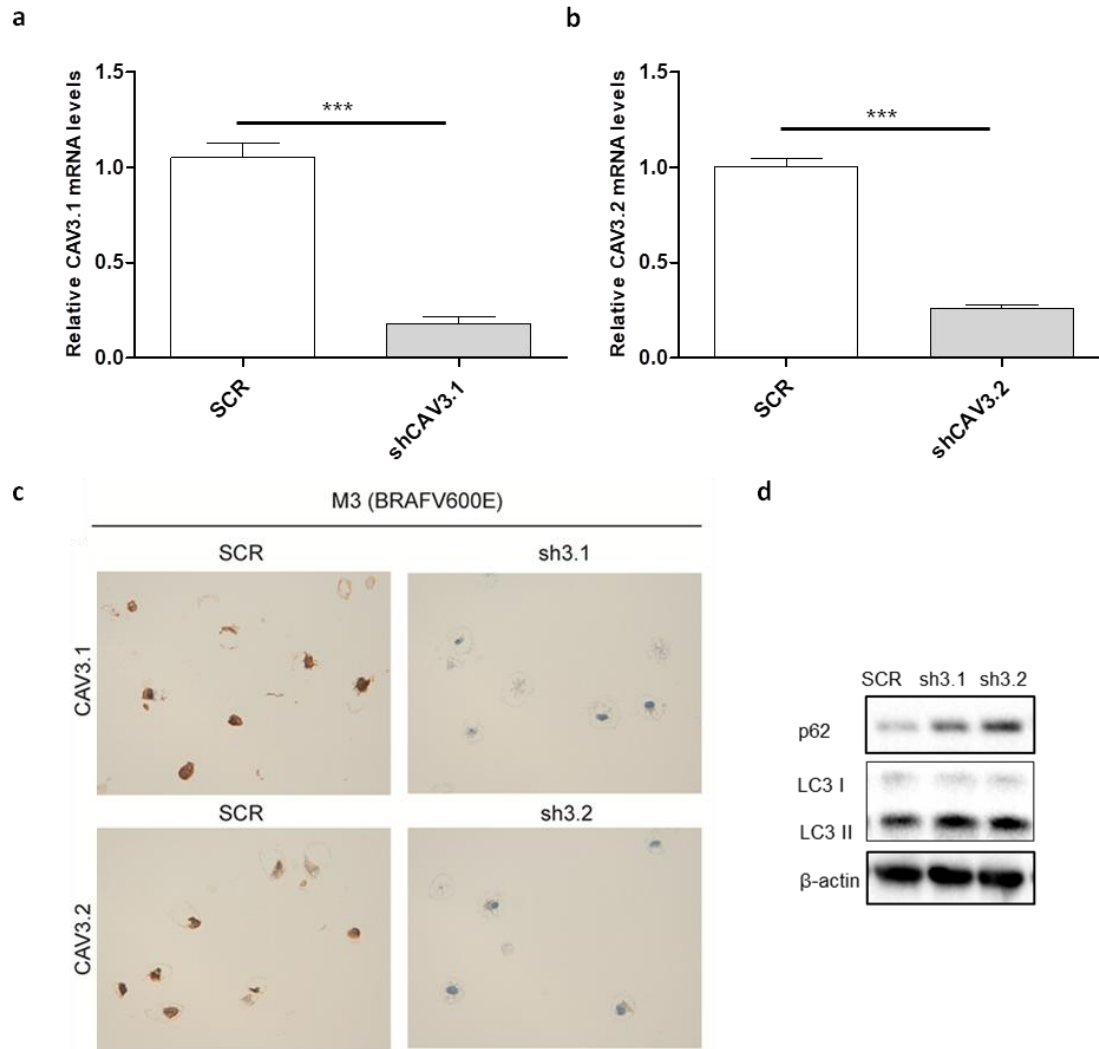


Figura 49. RT-qPCR i IHC de les isoformes Cav3.1 i Cav3.2 dels TTCCs. Nivells de mRNA relatius de (a) Cav3.1 i (b) Cav3.2 de les cèl·lules M3 4 dies després de la infecció amb lentivirus que porten els respectius shRNAs. Es va utilitzar una prova Mann Whitney per a l'anàlisi estadístic (***) $p < 0,001$). c) Imatge representativa d'immunohistoquímica per a la tinció de CAV3.1 i CAV3.2 en la línia cel·lular M3 després de silenciar els TTCCs. d) Els nivells de proteïna P62 i LC3I/II van ser analitzats per WB a partir de lisats totals de cèl·lules M3 4 dies després de silenciar l'expressió CAV3.1 i CAV3.2.

Una vegada obtinguda l'eficiència i eficàcia del silenciament de Cav3.1 i Cav3.2 vam estudiar la seva capacitat invasiva mitjançant assaigs de *Transwell*. Tal com indiquen els resultats, s'observa una disminució de la invasió d'aquestes cèl·lules BRAF^{V600E} quan els TTCCs es trobaven silenciats (Figura 50a,b). En conjunt, aquests resultats indiquen que els TTCCs condueixen a induir la invasió en les línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E}.

Introducció

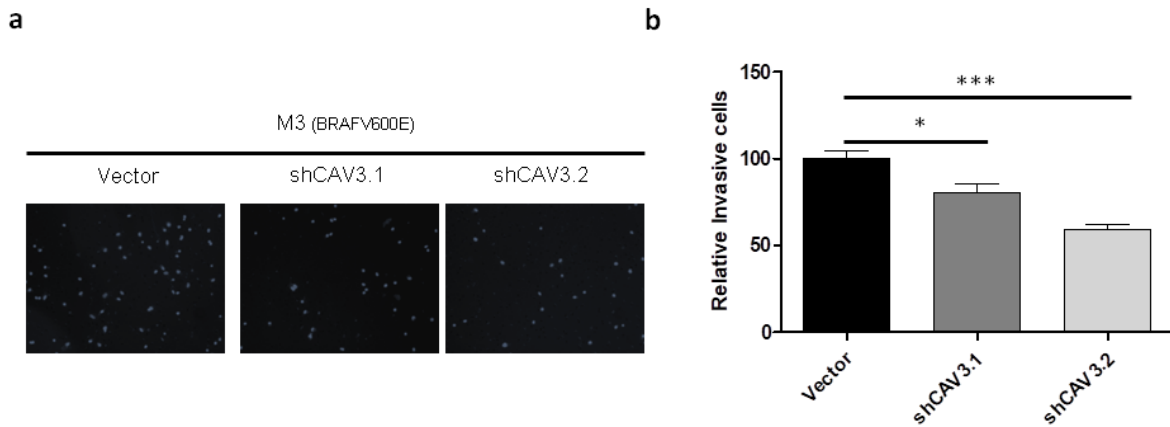


Figura 50. El silenciament gènic dels TTCCs redueix la invasió de les línies cel·lulars de melanoma $BRAF^{V600E}$. a) Imatges representatives de la tinció nuclear de Hoechst de la línia cel·lular M3 infectada amb shRNA de CAV3.1 i CAV3.2 en comparació amb el control (Vector) i b) Percentatge (%) de les cèl·lules que han envaït la capa de matrigel. Augment de les fotos 10x. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant la prova one-way ANOVA, seguida del test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu).

Les biòpsies humanes de melanoma amb la mutació de BRAF presenten un increment de la immunoexpressió de Cav3.1 i LC3.

Per aplicar les nostres observacions *in vitro* a la clínica, vam utilitzar una cohort de 33 biòpsies de melanomes primaris i 28 metastàtics. Aquesta cohort es va dividir en dos grups principals segons si presentaven la mutació més freqüent en BRAF o no (mutant $BRAF^{V600E/K}$ vs BRAF WT) analitzada prèviament per seqüenciació. Amb aquestes biòpsies guardades amb blocs de parafina, es va generar un array matricial (TMA), per tal de realitzar tots els estudis d'immunohistoquímica. Els nivells d'expressió (*Histoscore*, HS) dels TTCCs (Cav3.1 i Cav3.2) i LC3 van ser determinats mitjançant IHC (Figura 51a-d). Així, la puntuació histològica es va obtenir per a cada mostra amb valors que van des de 0 (sense immunoreacció) fins a 300 (immunoreactivitat màxima).

Pel que fa als resultats, totes les mostres de melanoma amb mutació $BRAF^{V600E/K}$ mostraven una major immunoexpressió de Cav3.1 en comparació amb la cohort BRAF WT (Figura 51a-b). En canvi, la immunoexpressió de Cav3.2 no va mostrar diferències significatives entre els dos grups (Figura 51c-d). També vam comprovar si el tipus de mutació genera un impacte en la autofàgia quantificant l'expressió de LC3 en aquestes mateixes mostres. La immunoexpressió de LC3 es trobava incrementada en les biòpsies $BRAF^{V600E/K}$ en comparació amb el grup BRAF WT, indicant una

autofàgia basal més elevada en les mostres de pacients BRAF^{V600E/K} (Figura 51e-f). En general, aquests resultats validen els obtinguts amb les línies cel·lulars *in vitro*.

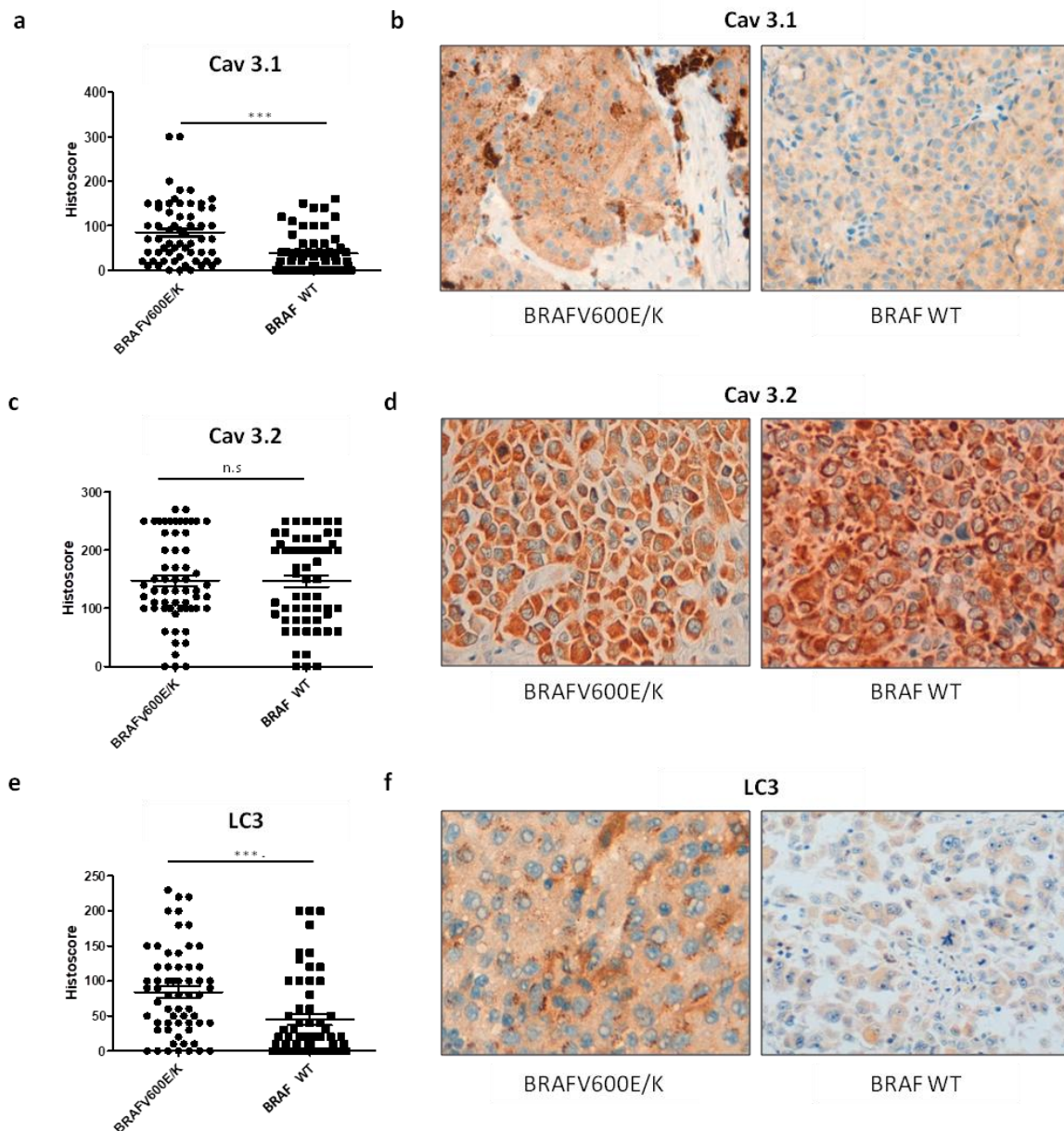


Figura 51. Expressió diferencial de Cav3.1, Cav3.2 i LC3 en biòpsies de melanoma depenent de l'estat mutacional de BRAF. Immunoexpressió diferencial (Histoscore, mitjana \pm SD) i imatges representatives de la immunotinció de (a,b) Cav3.1 (mitjana HS BRAF^{V600E/K} vs WT: 85 vs 37.5), (c,d) Cav3.2 (mitjana HS BRAF^{V600E/K} vs WT: 147.5 i 146.6) i (e,f) LC3 (mitjana HS BRAF^{V600E/K} vs WT: 84 vs 44.6) entre biòpsies de melanoma amb mutació de BRAF en comparació amb mostres de melanoma wild-type per BRAF. Augment de les fotos 20x. L'anàlisi estadístic utilitzat va ser la prova de Mann Whitney (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s., no significativa).

Introducció

La sobreexpressió de NRAS^{Q61K} rescata els efectes inhibidors del Mibefradil i la CQ sobre la migració cel·lular en les cèl·lules del melanoma BRAF^{V600E}.

Encara que es tracta d'un model que no es dona en pacients reals, ja que les mutacions de BRAF i de NRAS són excloents en el melanoma, per tal de demostrar una associació entre l'absència de la mutació de NRAS i la sensibilitat a la inhibició de l'autofàgia respecte a la migració i invasió cel·lular, vam sobreexpressar l'oncogen NRAS^{Q61K} en cèl·lules M3 (BRAF^{V600E}) a través d'un sistema lentiviral (Figura 52a). Els nivells proteics de p62 i LC3II van mostrar un bloqueig del flux autofàgic en les cèl·lules que sobreexpressaven NRAS^{Q61K} quan aquestes es tractaven amb Mibefradil i CQ (Figura 52e), tal com succeeix en les línies cel·lulars NRAS. A més, la comparació dels nivells de p62 i LC3II anteriors i posteriors al tractament amb CQ durant 3 hores mostrava un menor augment dels dos marcadors autofàgics quan NRAS^{Q61K} estava sobreexpressat (Figura 52f). Aquest resultat va suggerir que l'autofàgia basal era menys intensa en les cèl·lules amb sobreexpressió de NRAS^{Q61K} en comparació amb les cèl·lules M3 basals (únicament BRAF^{V600E}).

Per altra banda, es van realitzar assajos de migració i invasió per comprovar si amb l'expressió de NRAS^{Q61K} els inhibidors dels TTCCs i de l'autofàgia no tenien efecte en aquests processos cel·lulars. L'assaig de cicatrització de la ferida (*wound healing*) va revelar que l'expressió de NRAS^{Q61K} evitava completament l'efecte del Mibefradil, i parcialment l'efecte de la CQ sobre la migració cel·lular (Figura 52b). Es van obtenir resultats similars a partir de l'anàlisi de la migració independentment de la interacció cel·lular, és a dir, a partir de l'avaluació de l'assaig de *Single Cell*. Doncs, ni la distància acumulada (Figura 52d) ni la velocitat de migració (Figura 52e) es van veure afectades per Mibefradil o CQ en cèl·lules M3 que sobreexpressaven NRAS^{Q61K}.

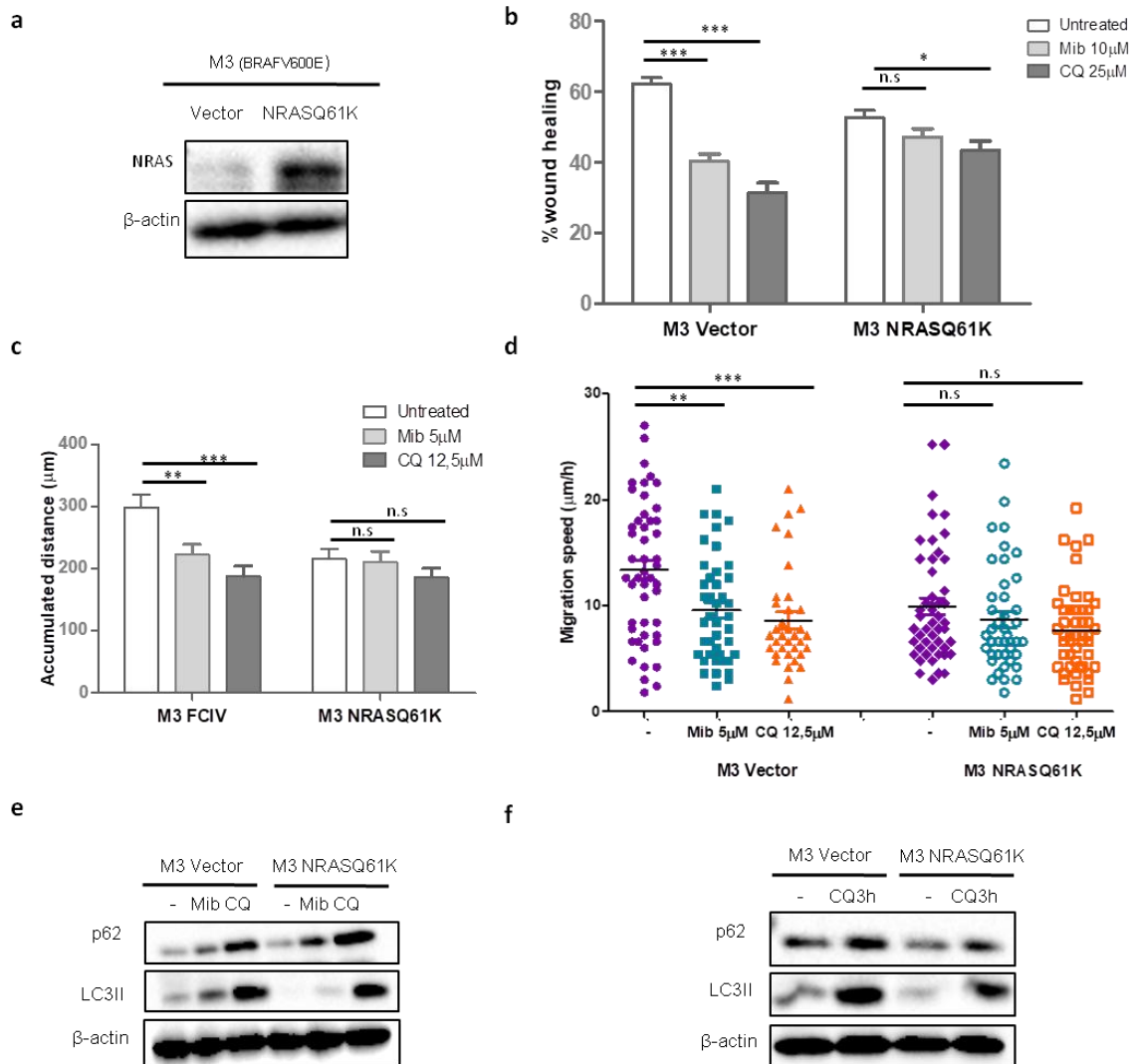


Figura 52. La sobreexpressió de NRAS^{Q61K} rescata l'efecte inhibitor de Mibefradil i CQ sobre la migració cel·lular de les cèl·lules del melanoma BRAF^{V600E} i redueix l'autofàgia basal. a) Anàlisi de l'expressió de NRAS per WB d'extractes de proteïnes totals de la línia M3 control (vector) i la que sobreexpressa NRAS^{Q61K} (M3 NRAQ61K). b) Assaig de wound healing de M3 infectades amb el Vector i amb NRAS^{Q61K} tractades amb Mibefradil (10µM) i Cloroquina (25µM). Totes les mostres van ser analitzades després de 24 hores. Es va analitzar l'interval de temps de la migració de cèl·lules individualitzades per avaluar (c) la distància acumulada i (d) la velocitat de migració de les cèl·lules de melanoma M3 (M3 Vector i M3 NRAS^{Q61K}) quan es sotmeten a tractament amb MIB o CQ. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant un Two-Way ANOVA, seguit del test post hoc de Bonferroni (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; n.s, no significatiu). e) WB per analitzar els nivells de p62 i LC3II després del tractament amb MIB o CQ a fi d'avaluar el flux autofàgic. f) El vector M3 o la línia cel·lular M3 NRAS^{Q61K} O/E van ser tractades amb CQ durant 3h. Els nivells de proteïna de p62 i LC3II van ser analitzats per WB i normalitzats per β-actina.

Introducció

En resum, els resultats indiquen que en presència de la mutació oncogènica NRAS^{Q61K} no disminueix la migració cel·lular quan l'autofàgia està bloquejada per Mibefradil o Cloroquina i a més, l'autofàgia basal és més baixa en comparació amb les cèl·lules basals BRAF^{V600E}. Aquests resultats justifiquen els previs observats entre ambdós grups de línies de melanoma (BRAF vs NRAS).

L'expressió de Snail1 és major en els melanomes BRAF^{V600E} i disminueix amb el bloqueig de l'autofàgia.

Snail1 juga un paper molt important tant en la migració cel·lular com en el procés d'EMT (transició epitelial-mesenchimal) (Cano et al. 2000). L'expressió d'aquest factor de transcripció està estretament regulada a nivell transcripcional i la seva activitat es modula per la seva localització subcel·lular (Mingot et al. 2009). Per això, la modulació de les proteïnes implicades en el transport nuclear pot alterar la localització cel·lular de Snail1 i, en conseqüència, l'impacte de Snail1 en la senyalització de l'EMT (Muqbil et al. 2014).

Per comprendre si l'autofàgia regulava la migració cel·lular i la invasió a través de Snail1, vam quantificar l'expressió de Snail1 en les nostres línies cel·lulars de melanoma tant per WB com per RT-qPCR, i vam observar que tant els nivells de proteïna (Figura 53a) com els de mRNA (Figura 53b) es trobaven augmentats en les línies BRAF^{V600E} en comparació amb les línies amb mutació de NRAS.

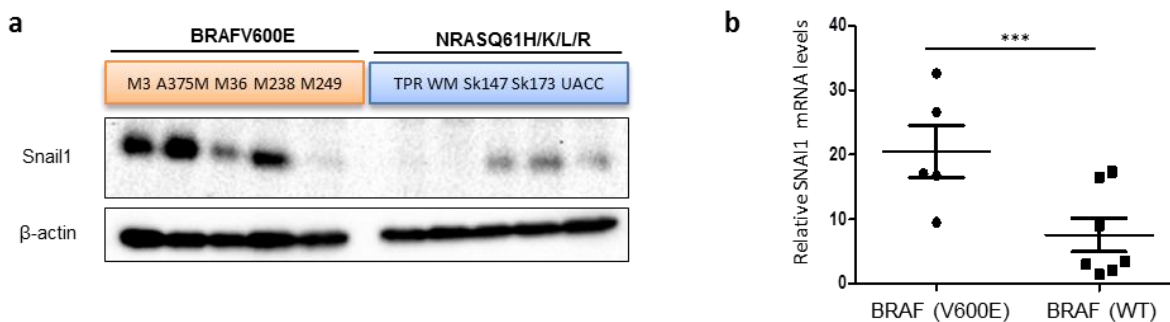


Figura 53. Els melanomes BRAF^{V600E} expressen nivells més alts de Snail1. a) WB i b) nivells de mRNA del marcador d'EMT Snail1 entre línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E} i NRAS. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant la prova de Mann Whitney (***) p <0,001).

Després vam avaluar l'efecte del bloqueig de l'autofàgia, mitjançant inhibidors farmacològics dels TTCCs o CQ, o mitjançant el silenciament gènic de ATG5 o dels TTCCs, sobre l'expressió de Snail1. Els resultats mostren que quan tractàvem farmacològicament aquestes línies amb inhibidors dels TTCCs

(Figura 54a) o amb Cloroquina (Figura 54b), o les sotmetíem a un silenciament gènic (shRNA) de ATG5 (Figura 54c) així com a un silenciament gènic dels TTCCs (Figura 54d), veiem una disminució dels nivells de Snail1 en les línies cel·lulars BRAF^{V600E}. Aquests resultats ens suggereixen que l'expressió de Snail1 està relacionada amb el flux autofàgic de les cèl·lules de melanoma que presenten una mutació a BRAF.

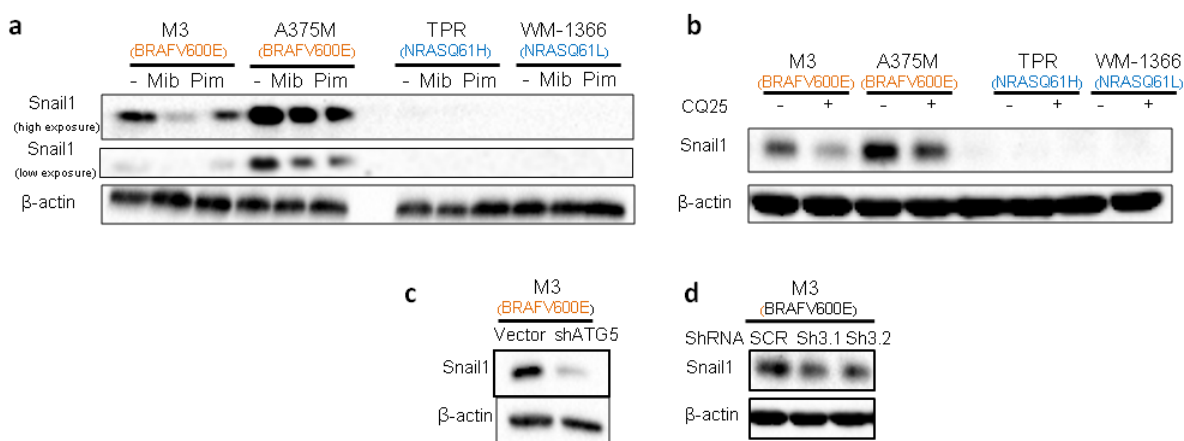


Figura 54. L'expressió de Snail1 disminueix quan l'autofàgia està bloquejada. Anàlisi per WB de Snail1 en les cèl·lules BRAF^{V600E} i NRAS tractades amb (a) Mibefradil, Pimozide o (b) CQ. Nivells proteics d'Snail1 en cèl·lules BRAF^{V600E} silenciades per (c) ATG5, (d) Cav3.1 i Cav3.2.

Atès que s'ha demostrat que Snail1 té un paper important en la progressió del melanoma (Hao et al. 2012; Peinado et al. 2007) i tenint en compte que l'increment de la seva expressió en els tumors primaris promou la motilitat cel·lular i la consegüent adquisició de propietats metastàtiques (Muqbil et al. 2014), vam procedir a silenciar aquest factor de transcripció mitjançant un shRNA per tal d'avaluar l'efecte de la seva inactivació en els processos de migració i invasió. Així, vam observar que amb el silenciament de Snail1 (shSnail1) (figura 55a) es produïa una disminució de la migració i la invasió de les cèl·lules BRAF^{V600E}, simulant l'efecte dels bloquejadors dels TTCC i la CQ (figura 55b,c).

Introducció

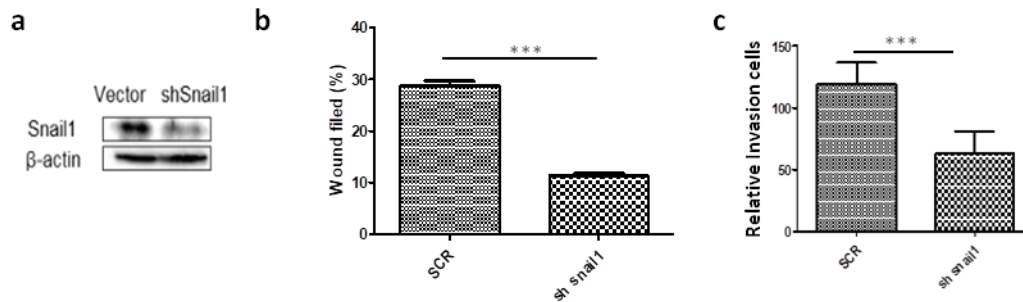


Figura 55. El silenciament gènic d'Snail1 redueix la migració i invasió de les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E}. Anàlisi per WB de Snail1 en les cèl·lules BRAF^{V600E} silenciades per (a) Snail1. (b) Assaig de wound healing i (c) Assaig de Transwell en cèl·lules BRAF^{V600E} després del silenciament de Snail1 en comparació amb cèl·lules control (vector). L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant la prova T-test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s., no significatiu).

Per confirmar que efectivament Snail1 podria modular l'autofàgia de les cèl·lules del melanoma, vam sobreexpressar Snail1 mitjançant un vector lentiviral (PLX-Snail1) en una línia cel·lular amb mutació de NRAS (Skmel-147). Els resultats indiquen, que la sobreexpressió de Snail1 indueix un augment en els nivells de p62 i LC3I/II en comparació amb les cèl·lules infectades amb els vector PLX-GFP control (Figura 56a). A més, la immunofluorescència de LC3B mostrava un lleuger augment d'autofagosomes amb la sobreexpressió de Snail1 i aquest augment era encara major després d'un breu tractament de CQ (3h), suggerint un possible augment de l'autofàgia basal. Per altra banda, el tractament amb Mibefradil també va augmentar els punts positius (AP) per a LC3B en les cèl·lules, però aquest augment era independent de l'expressió Snail1 (Figura 56b).

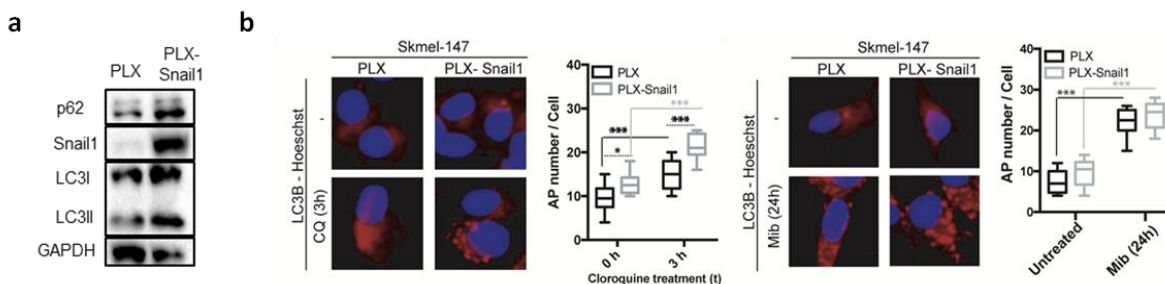


Figura 56. La sobreexpressió d'Snail1 indueix un augment de l'autofàgia basal en cèl·lules de melanoma NRAS a) Anàlisi per WB de LC3I/II i p62 en les cèl·lules PLX-Snail1 vs PLX-vector. b) Immunofluorescència endògena de LC3B quan es van tractar cèl·lules amb Cloroquina (CQ, 3h) o Mibefradil (Mib, 24h). L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant la prova Two-Way ANOVA seguida del test de comparacions múltiples de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s., no significatiu).

A continuació, per investigar si Snail1 participa en el procés de migració/invasió durant la modulació del flux autofàgic, vàrem tractar les cèl·lules NRAS amb sobreexpressió de Snail1 amb Mib o CQ durant 24 hores. Com podem observar, es va produir una reducció de la taxa de migració (Figura 57a) i la invasió (Figura 57c) en les cèl·lules amb Snail1 sobreexpressat després d'un bloqueig de l'autofàgia. A més, el Mibefradil va disminuir la migració de cèl·lules individuals en aquestes cèl·lules PLX-Snail1 (Figura 57b).

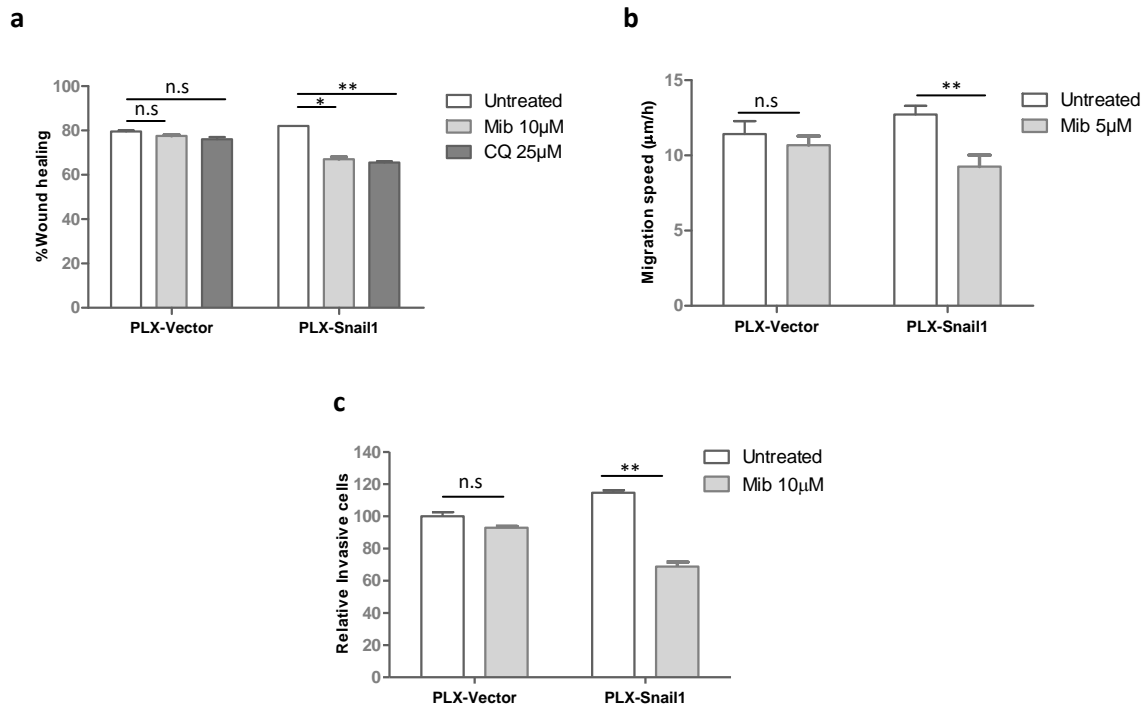


Figura 57. La sobreexpressió d'Snail1 disminueix la migració/invasió cel·lular quan l'autofàgia està bloquejada. a) Assaig de la cicatrització de la ferida (wound healing), (b) assaig de la migració de cèl·lules individuals i (c) assaig de Transwell en cèl·lules Skmel-147 PLX-Snail1 vs PLX-vector (control) tractades amb (a, c) Mibefradil 10µM o (b) 5µM i (a) CQ 25µM durant 24h. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant la prova Two-Way ANOVA seguida del test de comparacions múltiples de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu).

Aquests resultats suggereixen que Snail1 podria ser essencial per disminuir la migració/invasió quan l'autofàgia està bloquejada, en particular mitjançant la modulació dels TTCCs. Per complementar aquests estudis, es va utilitzar la base de dades TCGA disponible públicament i es va trobar que l'expressió de Snail1 es veia incrementada en les biòpsies de melanoma dels pacients amb mutació BRAF^{V600E}, en comparació amb els BRAF WT (Figura 58a).

Introducció

A més, com ja s'ha comentat, la migració i la invasió cel·lular són processos clau durant la disseminació metastàtica; per tant, es va realitzar l'anàlisi immunohistoquímic de Snail1 en biòpsies de pacients, comparant mostres de melanoma metastàtic i de melanoma primari, diferenciades a la vegada pel seu estatus mutacional.

Els resultats mostren que la tinció nuclear de Snail1 (forma activa) va ser significativament major en les metàstasis en comparació amb les lesions primàries només en pacients amb mutacions BRAF^{V600E/K} (Figura 58b). D'altra banda, es va observar una immunotinció nuclear d'Snail1 més alta en les metàstasis BRAF^{V600E/K}, en comparació amb els tumors metastàtics BRAF WT. Aquests resultats indiquen un paper important de Snail1 durant la propagació metastàtica dels melanomes BRAF^{V600E} en comparació amb les biòpsies que no presenten el gen BRAF mutat.

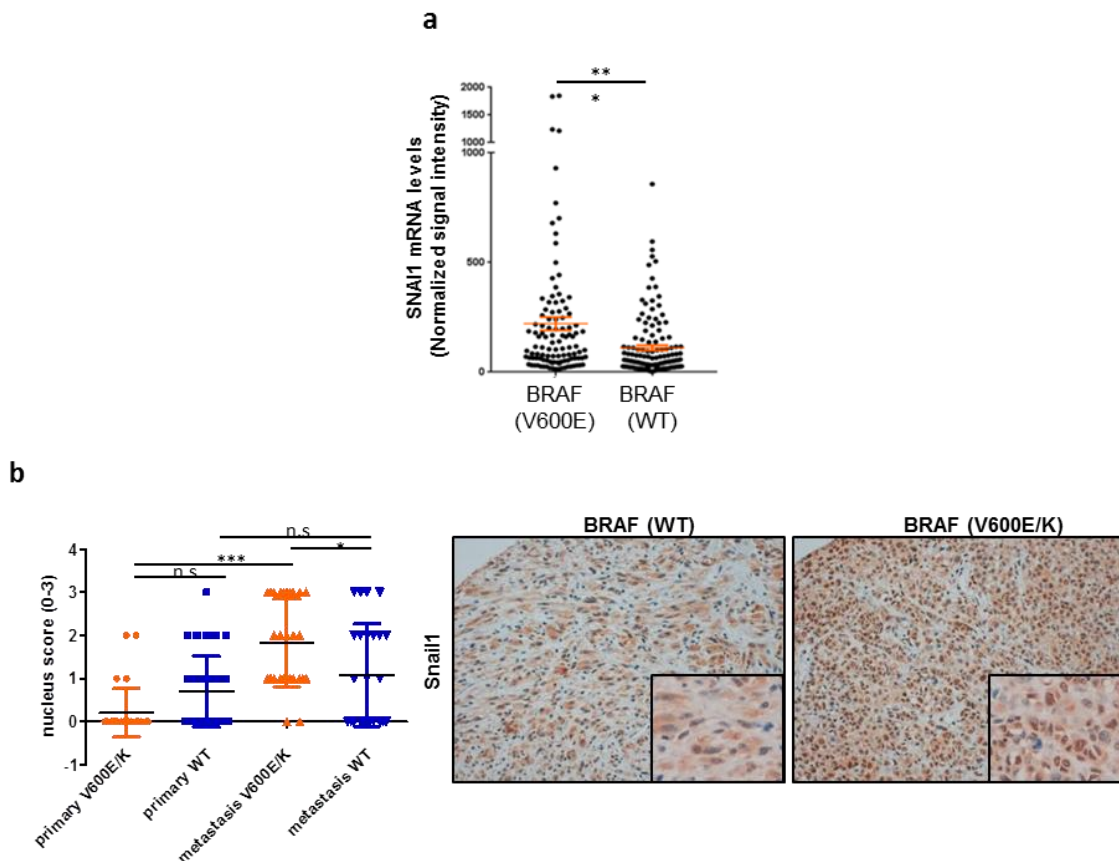


Figura 58. Les metàstasis dels melanomes BRAF^{V600E} presenten major expressió de Snail1 en comparació amb els melanomes WT per BRAF. (a) Expressió d'SNAI1 en mostres de melanoma BRAF^{V600E} i BRAF WT utilitzant dades d'expressió (mRNA) normalitzades de la base de dades TCGA. b) Imatges gràfiques i representatives (ampliacions 10x i 40x) dels nivells nuclears de la immunotinció de Snail1 en biòpsies amb mutació BRAF. Per avaluar-ho es van definir 4 nivells (0-3). L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant (a) la prova de Mann

Whitney i (b) two-way ANOVA seguit del test de comparacions múltiples Bonferroni ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu).*

Com a resum, en aquest primer treball vam confirmar que les cèl·lules de melanoma expressaven nivells elevats de TTCCs, dels quals les isoformes Cav.3.1 i Cav.3.3 eren més intensament expressades en les línies BRAF^{V600E} que en les portadores de mutació de NRAS. Malgrat que tant els bloquejants dels TTCCs com la Cloroquina inhibien de forma efectiva l'autofàgia en totes les línies cel·lulars, tan sols en les BRAF^{V600E} aquesta inhibició de l'autofàgia produïa una disminució de la seva capacitat de migració i invasió. El mateix efecte es va aconseguir per silenciament gènic dels TTCCs o de molècules implicades en el procés autofàgic (ATG5). L'estudi de biòpsies de melanoma va confirmar aquest lligam entre la presència de mutació BRAF^{V600E/K} i la immunoexpressió de l'isoforma Cav3.1 i de LC3.

Per altra banda, vam demostrar que les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} expressaven nivells més alts de Snail1 que les NRAS, i aquests nivells disminuïen a l'inhibir l'autofàgia per diversos mecanismes (bloquejants dels TTCCs o la Cloroquina). A més, el silenciament gènic de Snail1 produïa una disminució de la capacitat de migració i invasió de les cèl·lules BRAF^{V600E} i la seva sobreexpressió en cèl·lules NRAS un augment de l'autofàgia basal. En aquestes cèl·lules NRAS modificades genèticament, es produïa una disminució de les capacitats de migració i invasió al bloquejar l'autofàgia. En biòpsies de melanoma humà es va confirmar que en conjunt els melanomes BRAF expressen majors nivells de Snail1 que els melanomes NRAS i, en concret, que les metàstasis BRAF^{V600E/K} presenten una incrementada expressió de Snail1 que les WT per BRAF i que els propis tumors primaris BRAF^{V600E/K}.

HIPÒTESIS I OBJECTIUS

HIPÒTESIS

1. HIPÒTESI

Hipòtesi 1:

La present tesi estudia la modulació de l'autofàgia com a nova estratègia terapèutica en el melanoma, i concretament en l'aparició de resistències a la teràpia amb inhibidors de BRAF^{V600E}. Hem descrit l'existència d'un patró diferencial i progressiu dels canals de calci de tipus T (TTCCs) des dels melanòcits normals, els nevus benignes, les lesions amb atípia histològica i el melanoma. Aquests resultats donen suport a la possible utilització dels inhibidors dels TTCCs, com a potencials fàrmacs contra dianes terapèutiques a emprar durant la progressió tumoral i l'adquisició d'un fenotip de resistència en el melanoma. Per tot, l'expressió dels TTCCs és possible que també presenti un patró d'expressió diferencial que pugui relacionar-se amb l'adquisició de resistències aparegudes sota tractament.

Atès que, segons els nostres resultats, els inhibidors dels TTCCs indueixen la mort cel·lular i redueixen la migració/invasió en el melanoma mitjançant el bloqueig del flux autofàgic, i que existeix una relació entre la seva expressió i el perfil genètic i mutacional, les nostres hipòtesis són:

1. Els canals de calci de tipus T podrien estar implicats en els processos de migració i invasió en les línies cel·lulars de melanoma resistents a Vemurafenib a causa del flux autofàgic.
2. La resistència adquirida durant la teràpia amb inhibidors de BRAF^{V600E} podria determinar l'eficàcia dels inhibidors dels TTCCs.
3. Els nivells dels TTCCs es correlacionen amb els nivells d'expressió de proteïnes implicades en els processos de migració i invasió.

Hipòtesi 2:

Esta àmpliament descrit que el desenvolupament de resistències en el melanoma sota el tractament amb inhibidors de BRAF^{V600E} és altament freqüent i que s'indueixen canvis en el microambient tumoral. La caracterització del secretoma de les línies cel·lulars resistents respecte a la línia parental, podria proporcionar informació per identificar nous biomarcadors i/o dianes terapèutiques que permetin abordar la progressió del melanoma i l'aparició de resistències.

OBJECTIUS

Objectiu 1. Creació i caracterització de línies cel·lulars de melanoma humà BRAF^{V600E} resistents a Vemurafenib. Anàlisi de l'efecte dels inhibidors (Mibefradil) dels TTCCs sobre l'autofàgia i la mort cel·lular així com sobre els processos de migració i invasió.

1.1 Analitzar l'expressió dels TTCCs i l'autofàgia basal de les línies cel·lulars de melanoma resistents a Vemurafenib i de les biòpsies aparellades de melanoma abans i després del tractament amb inhibidors de BRAF.

1.2 Analitzar els processos de mort cel·lular i migració/invasió de les línies cel·lulars de melanoma resistents a Vemurafenib després del tractament amb un inhibidor dels TTCCs (Mibefradil) en monoteràpia o en combinació amb Vemurafenib.

1.3 Anàlisi de l'efecte del Mibefradil sobre el creixement tumoral (*xenografts in vivo*) de cèl·lules de melanoma sensibles i resistents a Vemurafenib en ratolins SCID.

Objectiu 2. Estudi del secretoma de les línies cel·lulars de melanoma metastàtic BRAF^{V600E} resistents a Vemurafenib.

2.1 Anàlisi mitjançant *citoarray* de les citoquines secretades per les línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E} sensibles i resistents a Vemurafenib.

2.2 Estudi dels processos de migració/invasió i viabilitat cel·lular de cèl·lules sensibles de melanoma sota l'exposició de medis condicionats de línies resistents a Vemurafenib: citoquines implicades en l'adquisició d'un fenotip de resistència.

MATERIALS I MÈTODES

1. TÈCNQUES DE BIOLOGIA CEL·LULAR:

1.1. Cultius Cel·lulars

1.1.1. Cultiu de les línies cel·lulars de melanoma

En aquest treball hem utilitzat diferents línies cel·lulars de melanoma humà d'origen cutani, les quals s'han distribuït per una banda, en dos grups segons la presència de la mutació V600E en el gen de BRAF o NRAS prèviament seqüenciades per PCR (Taula 4). Per una altra banda, les línies cel·lulars les hem diferenciat segons línies BRAF^{V600E} sensibles al fàrmac Vemurafenib (PLX4032) aparellades amb la seva resistent corresponent al tractament (Taula 5). En les taules següents es detalla cada una de les línies cel·lulars utilitzades, amb la mutació que presenta així com la seva procedència.

	BRAF	NRAS	Procedència
M3	V600E	WT	Departament d'immunologia de l'Hospital Clínic de Barcelona, Espanya
M238	V600E	WT	A. Fabra, IDIBELL, Barcelona, Espanya
M249	V600E	WT	A. Fabra, IDIBELL, Barcelona, Espanya
A375M	V600E	WT	A.Yeramian, IRB Lleida, Lleida, Espanya
M36	V600E	WT	Departament d'immunologia de l'Hospital Clínic de Barcelona, Espanya
TPR	pS467L	Q61H	Departament d'immunologia de l'Hospital Clínic de Barcelona, Espanya
WM-1366	WT	Q61H	A. Fabra, IDIBELL, Barcelona, Espanya
Skmel-147	WT	Q61H	A. Fabra, IDIBELL, Barcelona, Espanya
Skmel-173	WT	Q61H	A. Fabra, IDIBELL, Barcelona, Espanya
UACC257	WT	Q61H	A. Fabra, IDIBELL, Barcelona, Espanya

Taula 4. Línies cel·lulars de melanoma segons mutació en BRAF^{V600E} o NRAS^{Q61H}.

BRAF ^{V600E} Sensible	BRAF ^{V600E} Resistent	Procedència
M3	M3R	Laboratori Patologia Oncològica, IRB Lleida, Espanya
M238	M238R	A. Fabra, IDIBELL, Barcelona, Espanya
M249	M249R	A. Fabra, IDIBELL, Barcelona, Espanya
A375	A375R	DS. Pepeer, VU University Medical Center, Amsterdam
SK-Mel-28	SK-Mel-28R	DS. Pepeer, VU University Medical Center, Amsterdam
Mel888	Mel888R	DS. Pepeer, VU University Medical Center, Amsterdam

Taula 5. Línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E} sensibles i resistents a Vemurafenib.

Materials i mètodes

Les línies cel·lulars les cultivem amb medi DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, ThermoFisher Scientific®, GIBCO) que conté 4.5g/L de Glucosa i suplementat amb 10% de sèrum fetal boví inactivat (FBSi), 20µg/ml de Penicil·lina/Estreptomicina (ThermoFisher Scientific®, GIBCO) i 0.1% d'Amfotericina B (ThermoFisher Scientific®, GIBCO). Aquestes línies creixen en incubadors de CO₂ (ThermoFisher Scientific®) a 37°C amb atmosfera humida al 5% de CO₂. En el cas de les línies resistents al fàrmac Vemurafenib, el medi conté les mateixes condicions, però a més, s'hi afegeix Vemurafenib 1µM.

Pel manteniment d'aquestes línies cel·lulars es renten les plaques de cèl·lules amb tampó fosfat salí (PBS) 1x, i es desenganxen les cèl·lules amb tripsina-EDTA (ThermoFisher Scientific®, GIBCO) durant 3 minuts al incubador de 37°C. Després s'inactiva la tripsina amb medi que conté 10% de sèrum FBSi, i tot seguit es recullen les cèl·lules i es centrifuguen a 1000rpm durant 5 minuts. Un cop centrifugades, les cèl·lules es divideixen en un ràtio de 1:2, 1:3 o 1:4, depenent del tipus cel·lular, i es planten.

1.1.2. Generació i cultiu de la línia cel·lular resistent al fàrmac Vemurafenib (PLX4032)

S'ha creat en el nostre laboratori una nova línia resistent al fàrmac PLX4032 (Vemurafenib, Vem), amb la intenció d'establir un model de resistència a aquesta droga utilitzada des de 2011 per a tractar pacients en estadis avançats de melanoma positius per a la mutació BRAF^{V600E}. La línia cel·lular M3 BRAF^{V600E} parental ha estat sotmesa a una concentració de 20µM de Vemurafenib durant 3 dies i després a una concentració de 5µM durant uns 6 mesos fins aconseguir clons resistents. Després de la seva expansió, s'ha anat mantenint a una concentració d'1µM de Vemurafenib.

Més endavant, es van crear línies cel·lulars resistents a Vemurafenib amb les mateixes condicions a partir de les línies estables parentals *M3 amb sobreexpressió de PTEN* i *A375 amb shRNA de PTEN*.

1.1.3. Cultiu de la línia cel·lular melanòcits (HEMn-LP)

Els melanòcits epidèrmics humans neonatals (HEMn-LP) es van adquirir de Cascade Biologics® i es van cultivar amb medi 254 (ThermoFisher Scientific®, GIBCO) complementat amb 1% de HMGS-2 (*Human Melanocyte Growth Supplement-2*, ThermoFisher Scientific®, GIBCO), 20ug/ml de Penicil·lina/Estreptomicina (ThermoFisher Scientific®, GIBCO) i 0.1 % d'Amfotericina B (ThermoFisher Scientific®, GIBCO) a 37°C i 5% de CO₂.

Pel manteniment d'aquestes línies cel·lulars es renten les plaques cel·lulars amb tampó fosfat salí (PBS) 1x, i es desenganxen les cèl·lules amb tripsina-EDTA (ThermoFisher Scientific®, GIBCO) durant 3 minuts al incubador de 37°C a una dilució 1:1 amb PBS, ja que en general són molt poc adherents. Després s'inactiva la tripsina amb el medi 254 complementat i tot seguit es recullen les cèl·lules i es centrifuguen a 1000rpm durant 5 minuts. Un cop centrifugades, les cèl·lules es divideixen en un ràtio no més de 1:2 o 1:3, doncs és una línia cel·lular que creix molt lentament, i es planten.

1.1.4. Cultiu de la línia cel·lular HEK 293T

Les cèl·lules HEK 293T, una línia cel·lular humana de ronyó embrionari, és un bon model per la sobreexpressió de proteïnes intracel·lulars, extracel·lulars, secretades o de membrana. És una variant de la línia cel·lular humana del epitelí renal 293, transformada amb el gen E1A d'adenovirus, que expressa l'antigen T de SV40. És una línia cel·lular que creix molt ràpid i es transfecta molt bé, per això l'hem utilitzat en aquest treball per a la producció de virus. Creixen en medi DMEM suplementat amb 10% FBSi, 1% d'aminoàcids no essencials (NEAA, GIBCO), 1mM Piruvat Sòdic (GIBCO) i 20ug/ml de Penicil·lina/Estreptomicina (ThermoFisher Scientific®, GIBCO).

El manteniment d'aquesta línia cel·lular es realitza desenganxant les cèl·lules de forma mecànica (no és necessari l'ús de tripsina), després es centrifuguen les cèl·lules a 1000rpm durant 3 minuts i es divideixen les cèl·lules 1:10 o 1:15, ja que el temps de duplicació és molt ràpid. Les cèl·lules s'incuben a 37°C en un atmosfera controlada del 5% de CO₂.

1.1.5. Descongelació i congelació

Descongelació:

Les alíquotes de les línies cel·lulars són guardades en nitrogen líquid per tal d'emmagatzemar-les durant molt temps. Per descongelar-les d'una manera adequada, s'extreuen els criotubs del nitrogen líquid i directament es passen a un bany a 37°C, ja que per una descongelació òptima és necessari que aquesta sigui molt ràpida. Una vegada descongelats els tubs, s'aboca el contingut a un tub de 15mL que conté 5mL de medi DMEM complet i es centrifuga 5 minuts a 1000 rpm. S'elimina el sobrenedant per eliminar el dimetil sulfòxid (DMSO, Sigma-Aldrich®) i es resuspèn el pellet amb 1mL de medi DMEM complet. Es planta el mil·lilitre resuspès en una placa p100 amb medi DMEM complet.

Materials i mètodes

Congelació:

Per a una congelació apropiada, les cèl·lules s'han de congelar lentament, idealment, a un grau per hora. En el nostre cas, disposem els criotubs en un tanc de congelació a -80°C que conté isopropanol. Després de 24h les cèl·lules són transferides al nitrogen líquid on poden romandre durant anys.

Per a realitzar la congelació de les cèl·lules en cultiu, el pellet de cada placa p100 és resuspès amb $100\mu\text{L}$ de DMSO i $900\mu\text{L}$ de sèrum FBSi. Es transfereix el contingut a un criotub i aquest al tanc de -80°C .

1.2. Assajos de proliferació *in vitro* i viabilitat cel·lular

1.2.1. Recompte cel·lular

Aquest assaig s'utilitza per fer un comptatge directe de la viabilitat cel·lular. Es planten 20.000 cèl·lules en pous d'una placa M24 i es conta el nombre de cèl·lules al llarg dels dies indicats. Es renten les cèl·lules amb PBS 1X, es tripsinitzen i es centrifuguen. El pellet es resuspèn en $1000\mu\text{L}$ de medi DMEM complet i s'agafen $10\mu\text{L}$ de la resuspensió afegint-la a un eppendorf amb $90\mu\text{L}$ de medi (Dilució 1:10). Aleshores s'agafen $10\mu\text{L}$ d'aquesta dilució i es conten les cèl·lules a la cambra de Neubauer. Es van realitzar triplicats per cada temps i l'experiment es va repetir com a mínim tres vegades.

1.2.2. Recompte de proliferació mitjançant ki67

El Ki-67 és una proteïna nuclear que s'expressa en cèl·lules proliferatives. Això significa que es troba present en aquelles cèl·lules que estan dividint-se. L'anàlisi d'aquest marcador es fa mitjançant immunofluorescència (*apartat de detecció de proteïnes: immunocitoquímica*). D'aquesta manera es pot calcular el percentatge de cèl·lules positives i negatives per ki67 respecte el nombre de cèl·lules totals (positives per Hoechst).

1.2.3. Assaig de viabilitat cel·lular: MTT

Aquest assaig es basa en la reducció metabòlica del *Bromur de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-difeniltetrazol* (MTT) realitzada per l'enzim mitocondrial succinat-deshidrogenasa en un compost acolorit de color blau (Formazà), permetent mesurar el potencial de reducció mitocondrial i per

tant, determinar la funcionalitat mitocondrial de les cèl·lules tractades (Patravale et al. 2012). Aquest mètode ha estat molt utilitzat per mesurar supervivència i proliferació cel·lular. La quantitat de cèl·lules vives és proporcional a la quantitat de formazà produït.

Per tal de determinar doncs, la viabilitat cel·lular mitjançant aquest assaig, es planten aproximadament 5000 cèl·lules en plaques M96 i es tracten si es cau d'acord amb l'objectiu de l'experiment. Transcorregut el temps, s'aspira el medi i s'hi afegeix el MTT a una dilució 1:5 amb medi DMEM complet. Es deixa la placa a l'incubador durant 30 minuts. Llavors, amb cura, es descarta el sobrenedant i s'hi afegeixen 100µL de DMSO per tal de dissoldre els cristalls de formazà produïts per les cèl·lules actives. La placa de cultiu M96 és llegida en un lector de plaques a una longitud d'ona de 595nm. Els valors resultants són presos com a mesura indirecta de massa cel·lular viable. La resistència de les cèl·lules al tractament es representa com el percentatge de cèl·lules vives que han sobreviscut al tractament, en relació amb la condició control.

1.2.4. Recompte de mort apoptòtica per tinció de Hoechst

L'anàlisi de la fragmentació nuclear que ocorre en l'apoptosi s'evidencia mitjançant tinció de Hoechst. El reactiu Hoechst 33258 o Bisbenzimidida és un compost fluorescent que s'uneix al DNA i es visualitza al microscopi òptic de fluorescència. Pot tenyir tant cèl·lules vives com fixades, ja que la seva estructura molecular pot travessar la membrana plasmàtica de les cèl·lules intactes.

Pel recompte de la mort apoptòtica es planten les cèl·lules i s'estabilitza el cultiu durant dos dies, després es fixa amb PFA al 4% durant 15 minuts, es fan tres rentats amb PBS i es tenyeixen les cèl·lules amb 0,5µg/ml de colorant Hoechst durant 30 minuts a temperatura ambient. Per comptabilitzar la mort apoptòtica, es consideren positives aquelles cèl·lules que presenten condensació de la cromatina nuclear o aquells nuclis que formen petits orgànuls anomenats nuclis apoptòtics.

1.2.5. Assaig d'exclusió amb Blau de Tripà

La prova d'exclusió amb el colorant Blau de Tripà s'utilitza per determinar la quantitat de cèl·lules viables presents en un cultiu cel·lular. Es basa en el principi que les cèl·lules vives posseeixen membranes cel·lulars intactes que exclouen certs tints, com el blau de tripà, mentre que les cèl·lules

Materials i mètodes

mortes no ho fan (Strober 2015). En aquest assaig, les cèl·lules es barregen amb el colorant i després s'analitza visualment per determinar si les cèl·lules incorporen o exclouen el colorant.

Les cèl·lules es van plantar amb una densitat de $0,05 \times 10^6$ cèl·lules/pou en plaques de 24 pous i es van incubar amb diferents fàrmacs: $1\mu\text{M}$ de Vemurafenib (48h), $10\mu\text{M}$ de Mibefradil (24h) i el doble tractament. A continuació, s'hi afegeix la solució de Blau de Tripà (Gibco) en una proporció de 1:1 amb PBS 1X. Les cèl·lules totals i les cèl·lules mortes (tacades de color blau) es van comptar utilitzant la cambra de Neubauer. Es va calcular el percentatge de cèl·lules vives i cèl·lules mortes, seguint la següent fórmula:

$$\% \text{ cèl·lules viables} = [1.00 - (\text{Nombre de cèl·lules blaves} \div \text{Nombre de cèl·lules totals})] \times 100$$

1.2.6. Assaig de cicle cel·lular

Amb l'objectiu de determinar el percentatge de cèl·lules en cultiu que es troba a cada fase del cicle cel·lular es realitza aquest tipus d'assaig mitjançant citometria de flux.

En planten 1×10^6 cèl·lules en cada pou d'una placa M6. Al dia següent es realitzen els tractaments si escau i a les 24h o 48h es procedeix a la seva recollida. Es resuspenen les cèl·lules varies vegades amb $500\mu\text{L}$ de PBS 1X per a que quedin ben individualitzades i amb l'ajuda del vòrtex es va afegint 1mL d'etanol fred al 70% gota a gota a cada pou/condició per tal de fixar les cèl·lules. Després, es deixen 2 hores a -20°C i a continuació es centrifuga i es decanta l'etanol. Es fan dos rentats amb PBS 1X i es resuspèn el pellet amb $500\mu\text{L}$ de solució de Iodur de Propidi 0.02mg/mL + RNAsa DNAsa free $50\mu\text{g/mL}$ (Sigma-Aldrich®) en PBS 1X. Es deixen els tubs a 37°C en agitació durant 30 minuts i es processa cada mostra al citòmetre *BD FACSCanto™* valorant-se el contingut de DNA cel·lular per incorporació de Iodur de propidi (emissió fluorescent entre 562-588nm), podent diferenciar les cèl·lules apoptòtiques ($<2n$), cèl·lules en fase G0/G1 i cèl·lules en proliferació (fase S/G2-M, $>2n$).

1.2.7. Assaig d'Anexina V

L'anexina V és una proteïna recombinant que s'uneix específicament a residus de fosfatidilserina, els quals es troben exposats a la cara externa de la membrana plasmàtica, que s'utilitza com a biomarcador efectiu en cèl·lules apoptòtiques (Pozarowski et al. 2003). L'anexina V pot ser combinada amb un marcador d'ADN que no sigui permeable a la membrana sempre i quan aquesta

no es vegi compromesa, per tal de distingir cèl·lules apoptòtiques de necròtiques. S'ha evidenciat que la combinació d'anexina V-FITC i el marcador catiònic iodur de propidi (IP) pot garantir aquesta diferenciació, registrant cèl·lules no apoptòtiques i per tant viables (anexina V-FICT negatiu/IP negatiu), cèl·lules en apoptosi primerenca (anexina V-FICT positiu/IP negatiu) i cèl·lules necròtiques (anexina V-FICT positiu /IP positiu) (Mukhopadhyay et al. 2007).

Es planten 10^6 cèl·lules/pou a plaques de cultiu M6. Després d'aplicar els tractaments adients, es recullen tant el sobrenedant com les cèl·lules adherides de cada condició experimental. Es resuspèn cada mostra amb 100µl d'Annexina + V Binding Buffer 1X (BD D Falcon®) i s'hi afegeix 3µl d'Annexina-V FITC (Immunotools®) i 2µL de Iodur de Propidi (0,02 mg/ml; Sigma-Aldrich®). Es conservaren les mostres durant 15 minuts a temperatura ambient i s'analitzen els resultats al citòmetre *BD FACSCanto™* utilitzant el software Win MDI 2.9. Les mostres són analitzades a través d'una quantificació objectiva i ràpida.

1.3. Assajos de migració i invasió cel·lular

1.3.1. Assaig de migració col·lectiva: *Wound Healing*

L'assaig de tancament de la "ferida" (*Wound Healing*) es basa en l'observació del comportament d'una monocapa de màxima confluència (100% de confluència) de cèl·lules a la que prèviament se li ha realitzat una ratllada amb una punta groga de 200µL. A partir de llavors, s'aspira el medi i es tracten les cèl·lules amb la droga corresponent. Es capturaran tres imatges per pou a temps 0h i després de 24h per calcular el percentatge de la ferida plena de cèl·lules.

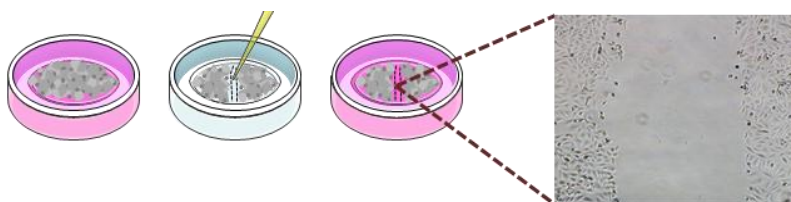


Figura 59. Representació esquemàtica de l'assaig de migració *Wound healing*. Modificat de Píjuan, J (Servei de Citometria i Microscopia de l'IRB Lleida).

Pel que fa a les pel·lícules d'aquest assaig de cicatrització de la ferida mitjançant *time-laps*, es registra el tancament de la ferida, prenent imatges cada 1 hora durant 24 hores utilitzant un microscopi de contrast de fase i el programa *Olympus IX-81 i FluoView 1000*). Totes les imatges s'han

Materials i mètodes

analitzat utilitzant un connector de *Fiji/ImageJ macro* dissenyat per Panosa A i Pijuan J del Servei de Citometria i Microscopia de l'IRB Lleida que calcula diversos paràmetres, com la velocitat a la qual les cèl·lules cobreixen la ferida i la seva velocitat curativa ($\mu\text{m}/\text{h}$).

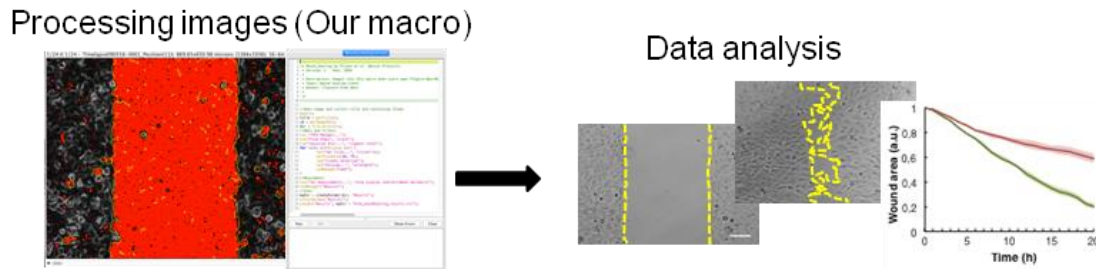


Figura 60. Representació esquemàtica de l'anàlisi de l'assaig de migració Wound healing. Modificat de Pijuan, J (Servei de Citometria i Microscopia de l'IRB Lleida).

1.3.2. Assaig de migració aleatòria de Single Cell

És un assaig per analitzar la migració de cèl·lules individualitzades i no de forma col·lectiva com en el cas del *wound healing*.

Les cèl·lules es planten a baixa densitat ($6000 \text{ cèl·lules}/\text{cm}^2$) per tal de minimitzar la influència de les interaccions cel·lulars. Es tracten les cèl·lules i es realitza una captura d'imatge cada 20 minuts durant les 20h-24h. D'aquesta manera, es va fent un seguiment de les cèl·lules mitjançant un complement del programa *ImageJ* avaluant la distància acumulada (μm) i la velocitat ($\mu\text{m}/\text{h}$) de les cèl·lules individualitzades.

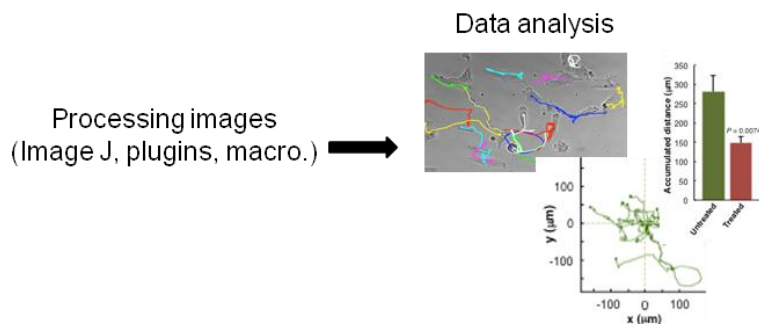


Figura 61. Representació esquemàtica de l'anàlisi de l'assaig de migració Single cell. Modificat de Pijuan, J (Servei de Citometria i Microscopia de l'IRB Lleida).

1.3.3. Assaig d'invasió: *Transwell*

Amb el propòsit d'avaluar la capacitat invasiva de les cèl·lules hem utilitzat l'assaig d'invasió en un sistema bicameral tipus *Transwell* (porus de 8 µm, ThermoFisher Scientific®, Falcon). Hi ha diferents maneres de portar a terme aquesta tècnica:

1. Primer es tracten les cèl·lules durant 24 hores amb el fàrmac corresponent. Després, les cèl·lules es tripsinitzen i es planten en un medi sense sèrum sobre el filtre porós del *Transwell* prèviament recobert d'una matriu extracel·lular reconstituïda (Matrigel).
2. Primer es prepara el *Transwell* amb Matrigel i després es planten les cèl·lules en la part superior de la cambra amb medi sense sèrum. En la part de baix del *Transwell*, com a quimioatreient, s'hi afegeixen els fàrmacs amb el medi corresponent.

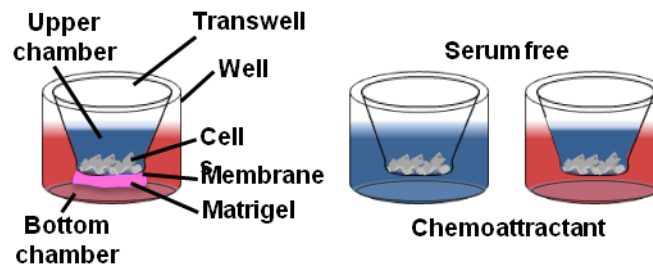


Figura 62. Representació esquemàtica de l'assaig d'invasió *Transwell*. Modificat de Pljuan, J (Servei de Citometria i Microscopia de l'IRB Lleida).

Passades 24 hores o depenent de l'experiment, les cèl·lules es fixen amb paraformaldehid 4% i es tenyeixen amb Hoechst (5µg/ml). Finalment, les cèl·lules s'observen sota un microscopi epifluorescent (*Leica*), abans i després de l'intercanvi de cotó, i es realitza un comptatge (*ImageJ*) per tenir el percentatge de les cèl·lules que han envaït.

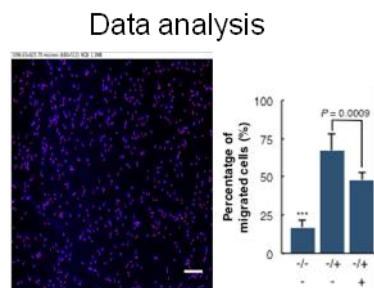


Figura 63. Representació esquemàtica de l'anàlisi de l'assaig d'invasió *Transwell*. Modificat de Pljuan, J (Servei de Citometria i Microscopia de l'IRB Lleida).

1.4. Tractaments i drogues per als experiments *in vitro*

Droga	Proveïdor	Nº Catàleg	Stock	Diluent
Cloroquina	Sigma-Aldrich®	C6628	25mM	DMSO
Rapamicina	Sigma-Aldrich®	R0395	2mM	DMSO
Mibefradil	Santa Cruz Biotechnology	204083 ^a	10 mM	DMSO
Pimozide	Santa Cruz Biotechnology	2062784	10 mM	DMSO
Vemurafenib	Roche	10123741	10 mM	DMSO
rhM-CSF	Immunotools®	11343113	20µg/µL	H ₂ O
mAb M-CSF	ThermoFisher Scientific®	15583502	20ng/µL	H ₂ O
Puromicina	Sigma-Aldrich®	P7255	1mg/mL	H ₂ O
Blasticidina	Sigma-Aldrich®	15205	1mg/mL	H ₂ O

Taula 6. Tractaments i drogues utilitzats en aquest treball.

1.5. Producció de lentivirus i infecció

Els vectors lentivirals permeten la integració de DNA plasmídic al genoma de les cèl·lules que infecten, i per tant presenten l'avantatge d'aconseguir una expressió mantinguda al llarg del temps i que aquesta es transmeti a la descendència.

1.5.1 Transfecció i producció de lentivirus en la línia cel·lular HEK293T

Les partícules lentivirals varen ser produïdes gràcies a la línia cel·lular HEK293T, mitjançant la transfecció amb Polietilenamina (PEI, Sigma-Aldrich®).

La majoria de les membranes cel·lulars tenen càrrega neta negativa, sent molt difícil que les molècules amb càrrega negativa, com són els àcids nucleics, puguin travessar-les. La PEI és una macromolècula orgànica amb un alt potencial de càrregues positives, doncs els lípids catiónics que conté condensen el DNA plasmídic, neutralitzant així les càrregues negatives i protegint-lo de l'acció de les DNases. La transfecció amb PEI és un mètode econòmic, senzill i molt utilitzat per a la incorporació de material genètic en les línies cel·lulars de forma eficient, com les HEK293T.

Per a realitzar aquesta tècnica de transfecció es planten les HEK293T a una confluència del 25% en una placa p100 amb medi DMEM sense antibiòtic ni sèrum. Al dia següent es transfecten les cèl·lules amb PEI utilitzant dues solucions. La primera conté 5µL de PEI 1X (10µM) per cada µg de DNA en 4 volums de NaCl 150mM. La segona conté el DNA plasmídic, que es dilueix també en NaCl 150mM en el mateix volum que està diluït el PEI. A continuació, la solució de PEI s'afegeix sobre la solució que conté el DNA plasmídic i es vorteja durant 30-60 segons. La barreja es deixa reposar durant 20 minuts a temperatura ambient, donant lloc a la formació dels complexos PEI i DNA. Passats aquests minuts, s'afegeix la mescla a la placa de cultiu gota a gota. A les 3 hores després de la transfecció es canvia el medi per medi DMEM complet.

Es transfecta un total de 40µg de DNA per placa p100, que corresponen als tres vectors plasmídics necessaris en proporció 3:2:1. El primer vector utilitzat és el vector lentiviral que conté la seqüència de DNA a transferir a les cèl·lules diana, el segon vector conté totes les proteïnes necessàries per l'empaquetament del virus, en el nostre cas hem utilitzat el vector psPAX2, i el tercer vector conté totes les seqüències que codifiquen per l'embolcall del virus, on hem utilitzat el plasmidi pMD2G.

Les plaques transfectades es deixen incubant durant 2-3 dies més, perquè les cèl·lules HEK293T tinguin temps de produir les partícules víriques i les secretin al medi de cultiu. A continuació, es recullen els sobrenadants de les plaques, on s'hi troben les partícules víriques, i centrifuguem durant 5 minuts a 2500rpm per precipitar restes cel·lulars, mentre que el sobrenadant es filtra amb filtres de 0,45µm. Finalment o bé s'apliquen directament a les cèl·lules que es volen infectar, o bé es conserven a -80°C en alíquotes.

1.5.2 Transducció de les línies cel·lulars mitjançant lentivirus

S'afegeixen les partícules lentivirals a la placa de cultiu que volem infectar en una dilució 1:4 amb el medi habitual més Polibrè (*Hexadimethrine Bromide*, Sigma-Aldrich®), polímer catiònic que augmenta l'eficiència de la infecció, a una concentració final de 1.75µg/mL, en la campana Bio2A. Les línies cel·lulars es deixen en contacte amb el virus durant 24 hores i posteriorment reemplacem el medi amb medi complet. En els casos dels shRNA de SNAI1, CAV3.1 i CAV3.2 el medi inclou també l'antibiòtic de selecció, puromicina (3µg/ml). El virus de shATG5 conté un tag amb GFP i per tant les cèl·lules es poden veure verdes, cosa que ens facilita el fet de poder analitzar el percentatge d'infecció de les cèl·lules. Pel que fa al experiment amb PTEN sobreexpressat s'hi va afegir

Materials i mètodes

Blasticidina (10µg/ml) per tal de seleccionar la població que conté el plasmidi, abans de generar la línia resistent. L'experiment es processa després de 4 a 6 dies depenent del tipus d'experiment plantejat, o es manté com a línia cel·lular estable.

1.6. Transfecció amb Lipofectamina del plasmidi ptf-LC3

La transfecció és el procés pel qual s'introdueix DNA plasmídic exogen a l'interior de cèl·lules receptores. En aquest treball s'utilitza la Lipofectamina 2000 (LFT, Invitrogen™), una mescla de liposomes amb càrrega positiva que tenen la capacitat d'unir-se al DNA i traspasar les membranes plasmàtiques amb càrregues negatives.

El tàndem ptfLC3 és una construcció plasmídica (p-EGFP-C1+mRFP) cedida pel Dr. Tamotsu Yoshimori de la Universitat de Tokio (Japó). Aquest plasmidi conté un promotor, el DNA codificant de la proteïna LC3 i dues proteïnes fluorescents pEGFP-LC3 (que atorga fluorescència verda) i mRFP-LC3 (fluorescència vermella).

Les cèl·lules es planten en pous de M24 a una confluència del 70% amb el seu medi habitual (Medi DMEM complet) un dia abans de ser transfectades. L'endemà es canvia el medi per 100µL de medi OptiMEM (Invitrogen™) per pou i es procedeix a fer la barreja de la transfecció. Per una banda, es prepara la mix de DNA (1µg DNA/50µL Medi OptiMEM) i per una altra la mescla de la lipofectamina (1,5µg LFT2000/50µL Medi OptiMEM). Les dues mescles s'incuben en un inici 5 minuts per separat i tot seguit s'afegeix la mix de DNA sobre la mescla de lipofectamina i s'incuba durant 15-20 minuts a temperatura ambient per a que es formin els complexos dels àcids nucleics amb la LFT. A continuació, 100µL de la barreja total són afegits gota a gota a cada pou. Després de 4 hores, el medi es reemplaça per medi DMEM complet i s'incuben les cèl·lules a 37°C durant 24 hores. Transcorregut el temps, es realitzen les imatges pertinents al microscopi de fluorescència per l'avaluació del flux autofàgic a partir de la colocalització de pEGFP-LC3 i mRFP-LC3.

2. TÈCNIQUES DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR:

2.1. Construccions plasmídiques

En enginyeria genètica, un vector és una molècula de DNA portadora d'una seqüència de DNA d'interès que és capaç d'inserir-se en una cèl·lula, dins la qual es mantindrà i es replicarà. Els plasmidis que són fragments de DNA circular extracromosòmic i es produeixen de forma natural en bacteris, s'utilitzen com a vectors ja que es repliquen de forma autònoma i es poden trobar múltiples còpies del plasmidi en una mateixa cèl·lula.

2.1.1. Vectors de sobreexpressió

Per a generar vectors de sobreexpressió, i com en qualsevol clonatge, primer de tot hem de digerir el vector lentiviral, en el nostre cas el vector FCIV, i el plasmidi que conté el gen que volem clonar, amb l'enzim Bam HI del *multiclonning site*. Un cop digerit el vector i l'insert, aquests es carreguen en un gel d'agarosa amb la finalitat de netejar de sals i dels enzims de restricció i/o dels fragments de DNA que no interessin. Per dur a terme aquest procés s'utilitzen kits comercials (*DNA de Macherey-Nagel®*) de purificació de DNA a partir de gels d'agarosa. En aquest punt tindrem en el vector extrems compatibles amb els extrems del fragment o insert de DNA que conté la seqüència del gen que volem clonar.

Abans de dur a terme la reacció de lligació, s'ha de defosforilar el vector tallat, per tal que es relligui amb èxit amb l'insert. Un cop tenim l'insert i els vectors preparats, es fa la reacció de lligació, que es realitza en una proporció 1:5 de vector respecte a l'insert, utilitzant l'enzim T4 Lligasa (*Roche*), i es transforma amb la soca bacteriana *E. Coli Stbl3*, que són bacteris competents que incorporen el vector clonat gràcies a un protocol de xoc tèrmic. Un cop transformada la lligació, els bacteris es planten amb plaques d'agar que contenen l'antibiòtic específic del vector subclonat, en el nostre cas Ampicil·lina, i es deixen O/N (overnight) a una estufa a 37°C.

Per últim, es preparen cultius bacterians de les colònies crescudes al agar i s'extreu el DNA mitjançant uns kits comercials de purificació del *DNA de Macherey-Nagel®*. El DNA obtingut es digereix amb uns enzims de restricció específics (PvuII i SmaI) que tallin tant a l'insert com al vector per tal de fer un anàlisi direccional de les colònies crescudes. Finalment i gràcies a l'anàlisi de

Materials i mètodes

restricció podem escollir quines colònies han internalitzat el vector amb l'insert i descartar aquelles que han internalitzat el vector buit o han incorporat l'insert en la direcció errònia. Finalment es va seqüenciar el plasmidi obtingut, per tal de corroborar la incorporació del gen al vector FCIV i la presència de la mutació desitjada.

Així doncs, utilitzant aquesta tècnica hem obtingut la seqüència del gen NRASQ61. En la Taula 7 es mostren les construccions plasmídiques de sobreexpressió utilitzades en aquest treball.

Vector	Gen	Referència, Proveïdor
PLX304-GFP	SNAI1	Pepeer DS (Amsterdam)
PLX304-GFP	Empty	Pepeer DS (Amsterdam)
FCIV-GFP	NRASQ61	Macià A (IRB Lleida, Lleida, Espanya)
FCIV-GFP	PTEN	Dolcet X (IRB Lleida, Lleida, Espanya)
FCIV-GFP	Empty	Dolcet X (IRB Lleida, Lleida, Espanya)

Taula 7. Construccions plasmídiques de sobreexpressió utilitzades en aquest treball.

2.1.2. Silenciament gènic mitjançant shRNA

El silenciament gènic mitjançant la interferència de RNA dels shRNA (*small hairpin RNA*) induïx la degradació d'un RNA missatger concret. Són fragments de RNA entre 20-25 nucleòtids, derivats de la fragmentació lineal de la doble cadena que s'uneixen a les seqüències de RNA homòlogues induïnt la seva degradació.

En aquest treball s'ha utilitzat com a vector per a l'expressió dels shRNA el lentivirus. A diferència de la transfecció, amb un vector viral és possible assolir eficiències del 100%, és a dir, infectar totes les cèl·lules. En el cas de la transfecció l'eficiència sol ser del 60-70%.

A la taula 8 s'indiquen els shRNA que s'han emprat en aquest treball pel silenciament gènic:

Vector	Gen	Referència, Proveïdor	shRNA Seqüència
PkLopuro	Scrambled	MFCD07785395, Sigma-Aldrich®	5' CAACAAGATGAAGAGCACCAA 3'
PkLopuro	CACNA1G(CAV 3.1)	TRCN0000044239, Sigma-Aldrich®	5' CGCCCTAGAAATCAGCAACAT 3'
PkLopuro	CACNA1G(CAV 3.2)	TRCN0000044209, Sigma-Aldrich®	5' GCACTGAAGCTGGTAGCATT 3'
PkLopuro	SNAI1	TRCN0000063818, Sigma-Aldrich®	5' CCACTCAGATGTCAAGAAGTA 3'
FSV-GFP	ATG5	Yeramin A (IRB Lleida, Lleida, Espanya)	5' CCTTTCATTGAGAAGCTGTTT 3'
FSV-GFP	Control	Dolcet X (IRB Lleida, Lleida, Espanya)	5' GCAGTATAGAGCGTGCAGATA 3'
FSV-GFP	PTEN	Dolcet X (IRB Lleida, Lleida, Espanya)	5' ATATAGGTCAAGTCAAGTCG 3'

Taula 8. shRNA utilitzats en aquest treball. Es mostren els shRNA utilitzats i el plasmidi on es troben.

2.2. Anàlisi de l'expressió gènica

2.2.1. Extracció de RNA

L'extracció del RNA a partir de cultius cel·lulars es realitza mitjançant el kit comercial *SurePrep™ TrueTotal™ RNA Purification Kit* (ThermoFisher Scientific®) acoblat a la digestió amb DNAsa I, que elimina tot el DNA genòmic contaminant que pugui restar en la mostra i que pot donar una senyal falsa durant la RT-PCR. El *buffer* d'extracció de RNA (Per cada 350µL de *lysis buffer* s'hi afegeixen 3,5µL de β-mercaptoetanol) s'aplica directament a les cèl·lules i els extractes de RNA es guarden a -80°C. Un cop extret el RNA se'n quantifica la concentració obtinguda amb el *NanoDrop® ND-1000*.

2.2.2. Síntesi de cDNA

L'ADN complementari (cADN) és un ADN sintetitzat a partir d'una sola cadena de RNA (RNA missatger (mRNA)) en una reacció catalitzada per l'enzim transcriptasa inversa. Per a la síntesi de cDNA s'utilitza el màxim de µg de RNA de la mostra i es realitza el protocol descrit pel *kit Taqman®* (Applied Biosystems). Les condicions de la reacció de retrotranscripció són: 2 minuts a 90°C (només el RNA), 10 minuts a 25°C, 60 minuts a 42°C i 5 minuts 95°C. Un cop sintetitzat, el cDNA es pot guardar a -20°C fins al moment del seu ús, o es pot emprar directament per a continuar amb la tècnica de la PCR quantitativa a temps real (RT-qPCR).

2.2.3. PCR en Temps Real: RT-qPCR

La tècnica de PCR en temps real utilitza una sonda específica per a cada gen a analitzar. Aquesta sonda està marcada amb un fluorocrom que el termociclador *CFX96™* (BioRad) llegeix i quantifica. El programa que utilitzem comença per 10 minuts a 95°C i després, consta de 50 cicles a 95°C durant 15 segons i 1 minut a 60°C. Les sondes que es detallen a la Taula X van ser adquirides a Applied Biosystems. El gen de la GADPH ha estat utilitzat com a control d'expressió de les mostres analitzades.

Materials i mètodes

Gen	Espècie	Referència
CACNA1H, Cav3.1	Human	Hs00234934_m1
CACNA1G, Cav3.2	Human	Hs00367969_m1
CACNAI, Cav3.3	Human	Hs01096207_m1
SNAI1, Snail1	Human	Hs00195591_m1
CSF1 o M-CSF	Human	Hs00174164_m1
CSF1-R	Human	Hs00911250_m1
GAPDH	Human	Hs99999905_m1

Taula 9: Sondes emprades per a l'anàlisi per RT-qPCR obtingudes a Applied Biosystems.

Un cop finalitzat el protocol de PCR, els resultats ens mostren a quin cicles de PCR comença el creixement exponencial de síntesi de la mostra analitzada, és a dir la Ct (*Cycle Threshold*). Per tant, com més petita sigui la Ct d'un gen analitzat més quantitat de mRNA s'ha amplificat i per tant, més nivells d'expressió d'aquest gen hi ha a la mostra.

La quantitat relativa de mRNA de cada gen es calcula de la següent manera:

$$\Delta Ct = Ct \text{ del gen diana} - Ct \text{ del gen GAPDH}$$

$$\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ condició experimental} - \Delta Ct \text{ control}$$

A partir d'aquests càlculs, el nivell relatiu de mRNA de la condició experimental respecte al control és $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$. Amb aquests valors es calcula la mitjana de cada mostra (es realitzen triplicats) i l'error estàndard.

En tots els experiments realitzats, s'inclou també, per a cada sonda, un control negatiu amb aigua i un control negatiu de la retrotranscripció RT, per descartar la presència de DNA genòmic contaminant.

2.2.4. Anàlisi del transcriptoma mitjançant *Microarray* d'expressió (RNA)

Un microarray és una eina que s'utilitza per detectar l'expressió de milers de gens al mateix temps. S'empren per fer estudis d'expressió global, i comparar sobre un suport sòlid l'expressió diferencial en dues mostres diferents, una control respecte a una tractada o dos tractaments diferents (Tarca et al. 2006).

Per al marcatge fluorescent de les mostres de RNA, fem servir el mètode indirecte. Aquest mètode requereix un pas de síntesi de cDNA a partir del RNA total o mRNA, en el qual s'incorpora una proporció d'un dels nucleòtids modificat químicament amb un grup aminoacil. En una segona etapa, es produeix una reacció química en la qual el fluoròfor es conjuga amb el grup aminoacil del cDNA. Després de la hibridació, el xip es renta diverses vegades per eliminar qualsevol cADN que no s'ha unit a un oligo en el xip. Llavors es procedeix a l'anàlisi de les dades. El xip s'escaneja amb un làser que excita els marcadors fluorescents. La informació de la fluorescència en cada punt es recull i es processa mitjançant un programa especialitzat que crea una imatge en color de la micromatriu. La imatge s'analitza utilitzant un programa que interpreta la fluorescència de cada punt.

L'anàlisi de l'expressió global es va realitzar mitjançant el *Kit Microarray SurePrint G3 Gene Expression v3 8x60K Microarray kit* (G4851C, Agilent). El microarray conté sondes úniques de més de 60.000 gens humans i transcrits, totes amb anotacions publicades per OMIM (base de dades de: RefSeq, Goldenpath, Ensembl, Unigene Human Genome i GenBank). En general, 50 ng d'ARN es van carregar amb el kit *Low input Quickamp Labeling kit* (Agilent). En totes les mostres es van afegir 10 sondes amb controls comercials per estandarditzar els resultats (*RNA Spike-in kit*, Agilent). Les matrius es van escanejar utilitzant l'ADN *Microarray Scanner G2565CA* (Agilent). Finalment, el programa *Feature Extraction* (FES, Agilent) es va utilitzar tant per a realitzar el procés de control de qualitat com per extreure la informació.

En aquest treball hem realitzat gràcies a la col·laboració amb el Departament de Dermatologia (Unitat Melanoma) de l'Hospital Clínic de Barcelona i IDIBAPS microarrays d'expressió gènica per a comprar les línies de melanoma BRAF^{V600E}, les línies amb NRAS mutat i les línies resistents a Vemurafenib, descrites totes elles anteriorment.

2.3. Immunodetecció de proteïnes

2.3.1. Obtenció d'extractes proteïcs

Després de cada tractament, les cèl·lules es renten tres vegades amb tampó fosfat (PBS 1X) fred, abans de processar la mostra. L'extracció de proteïna es realitza mitjançant un *buffer* de lisis desnaturalitzant (Tris 62,5 mM ph 6.8 i 2%SDS) i després es conserva el lisat a -20°C. És important que aquest procés es realitzi de forma ràpida i eficient per evitar degradacions i per a què l'extracció representi l'estat fisiològic de les proteïnes.

2.3.2. Quantificació de proteïnes total pel Mètode Lowry

La valoració quantitativa de les proteïnes es realitza mitjançant el Mètode de Lowry. És un mètode colorimètric en el qual s'afegeix a la mostra un reactiu que forma un complex de Cu^{2+} acolorit amb les proteïnes, sent la intensitat de color proporcional a la concentració de proteïnes, segons la llei de *Lambert-Beer* $A = e.l.c$.

Per determinar la concentració de proteïnes de la mostra problema es construeix una corba patró o de calibratge a partir d'una solució patró (BSA) coneguda. S'afegeixen 3µL de mostra per duplicat en una placa M96 i s'hi apliquen 25µL dels reactius A i S (proporció 50:1) de la casa comercial BioRad. A continuació, s'afegeix 200µL del substrat flurogènic (reactiu B) i es deixa reposar durant 15 minuts protegit de la llum. Seguidament, es llegeix la placa a una absorbància de 595 nm. Els valors d'absorbància obtinguts per a les mostres s'extrapolen als de la recta patró, determinant així, la concentració proteïca de cadascuna de les mostres.

2.3.3. Western Blot

2.3.3.1. Electroforesi en gel de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Un cop tenim els extractes proteïcs quantificats, les mostres es resolen mitjançant electroforesi amb gels de poli-acrilamida amb SDS. Aquests gels s'utilitzen per a separar barreges proteïques complexes segons el seu pes molecular.

Els gels es preparen a partir de la solució ACRYL/BIS™(BioRad), que conté un 39% d'acrilamida amb un 1% de bis-acrilamida. La reacció de polimerització es realitza amb 0,1% de TEMED (Sigma-

Aldrich®) com a iniciador de la reacció i amb persulfat d'amoni (Sigma-Aldrich®) al 0,05% com a catalitzador.

En aquest treball, s'han emprat gels discontinus, formats bàsicament per dos parts amb percentatges d'acrilamida diferents. En la part superior o gel apilador es carreguen les mostres, i serveix per concentrar el front de proteïnes de manera que totes entrin a la vegada al gel separador. Es troba constituït per un percentatge baix d'acrilamida (5%) que es prepara amb tampó 125µM Tris-HCl a pH 6,8. Per l'altra banda, el gel separador, en la part inferior, és on realment es separen les proteïnes segons el seu pes molecular. Es prepara amb tampó 375µM Tris-HCl a pH 8,8, i el seu percentatge d'acrilamida depèn del pes molecular de les proteïnes que es volen detectar, oscil·lant entre el 6 i el 15%.

Una vegada han polimeritzat els gels es preparen les mostres prèviament quantificades afegint tampó de càrrega 5x (10% de SDS, 50% de glicerol, 720 nM β-mercaptoetanol, 250 mM Tris pH 6,8 i blau de bromofenol) i es carreguen al gel. L'electroforesi es deixa migrar a voltatge constant (125 V) amb un tampó de migració que conté 25mM Tris, 1,44% glicina i 0,1% SDS en el sistema *MiniProtean*® de BioRad. En un dels carrils es carrega un marcador de pes molecular pretrenyit (Page Ruler, ThermoFisher Scientific®), utilitzant-lo com a referència per a poder interpretar cada una de les bandes proteiques que detectem.

2.3.3.2. Transferència de proteïnes

Després de la separació de les proteïnes en el gel, es transfereixen a una membrana de PDVF (Immobilon-P, Millipore®). El mètode emprat per la transferència és de nou el sistema *MiniProtean*® de BioRad, on es forma un sandvitx amb el gel, la membrana, dos papers Watman i dues espongetes. El sandvitx es col·loca en una solució de transferència (25 mM Tris 25 i 192 mM glicina a pH=8,3) amb un bloc de gel que evita els sobreescalfaments, i es deixen transferir les proteïnes del gel a la membrana durant 1 hora a un voltatge constant de 70V.

En acabar la transferència i per tal d'evitar possibles unions inespecífiques, la membrana es bloqueja amb llet en pols descremada al 5% en tampó TBS-T (20 mM Tris a pH 7,4; 150 mM NaCl i 0,1% de Tween 20) durant una hora a temperatura ambient.

Materials i mètodes

2.3.3.3. Immunodetecció de proteïnes

Una vegada bloquejada la membrana, es fan tres rentats de 15 minuts amb TBS-T i s'incuba la membrana amb l'anticòs primari d'interès. Els anticossos i les dilucions emprades en aquest treball es detallen a la taula 10. La dilució de l'anticòs primari es prepara en una solució de TBS-T amb 3% de BSA i 0,02% d'Azida sòdica, que evita contaminacions bacterianes i permet reutilitzar l'anticòs. Generalment, la incubació s'acostuma a realitzar durant tota la nit a 4°C, encara que en alguns casos i en funció de l'anticòs, es pot dur a terme durant 1 hora a temperatura ambient.

Antigen	Referència, Proveïdor	Aplicació	Dilució
Cav 3.1	AntibodyBCN	IHC	1:100
Cav 3.2	AntibodyBCN	IHC	1:100
p62/SQSTM1	#NBP1-48320, Novus Biologicals	WB	1:1000
LC3I/II	#NB100-2331, Novus Biologicals	WB,IHC	1:5000
LC3B	#2775, Cell Signaling technology	ICQ	1:1000
Atg5	A0731-100UL , Sigma-Aldrich®	WB	1:2000
Snail1	#3879, Cell Signaling technology	WB, ICQ	1:1000
Snail1	#17732, Abcam	IHC	1:100
p-AKT	#4058, Cell Signaling technology	WB	1:1000
p-ERK	#4370, Cell Signaling technology	WB	1:1000
Ki67	# Sc-15402, Santa Cruz Biotechnology	ICQ	1:1000
PTEN	#9188, Cell Signaling technology	WB, IHC	1:1000
β-actin	a5441, Sigma-Aldrich®	WB	1:10000
GAPDH	#8245 , Abcam	WB	1:10000

Taula 10. Anticossos primaris utilitzats en aquest treball. IHC: immunohistoquímica; WB: Western Blot; ICQ: Immunocitoquímica.

Tot seguit, es recupera l'anticòs primari i la membrana es renta 3 vegades (3 x 10 minuts) amb TBS-T. A continuació, s'incuba amb l'anticòs secundari en solució de bloqueig durant 1h a temperatura ambient. Finalment, la membrana es renta 3 vegades (3 x 10 minuts) amb TBS-T 1X. L'anticòs secundari està conjugat a una peroxidasa (HRP), que permet la detecció de la senyal. Per detectar-la utilitzem un reactiu comercial LuminataTM Forte Western HRP Substrate (Millipore®) que associa la catàlisi de l'aigua oxigenada a l'oxidació del luminol, donant lloc a un increment de la quimioluminescència. Finalment, la membrana es visualitza amb el sistema de documentació ChemiDocTM MP Imaging System (BioRad) i s'analitza amb el programa informàtic associat, *Image Lab*.

Antigen	Referència, Proveïdor	Aplicació	Dilució
Conill-IgG HRP	A0545, Sigma-Aldrich®	WB	1:10000
Cabra-IgG HRP	A5420, Sigma-Aldrich®	WB	1:10000
Mouse IgG Alexa Fluor 594	A11005, Molecular Probes	ICQ	1:600
Mouse IgG Alexa Fluor 488	A11029, Molecular Probes	ICQ	1:600
Rabbit IgG Alexa Fluor 588	A11034, Molecular Probes	ICQ	1:600

Taula 11. Anticossos secundaris utilitzats en aquest treball. **WB:** Western Blot; **ICQ:** Immunocitoquímica.

2.3.4. Immunocitoquímica (ICQ)

La tècnica d'immunofluorescència (ICQ) l'hem realitzat en cèl·lules de cultiu fixades. En primer lloc, es fan tres rentats amb PBS 1X i en el cas del KI-67 s'incuba amb metanol 100% fred durant 10 minuts, per tal de millorar la detecció nuclear.

Abans d'aplicar l'anticòs primari, cal incubar les cèl·lules amb solució de bloqueig, que conté PBS 1X amb 5% de Horse Serum (HS, ThermoFisher Scientific®), 0,2% Glicina (ThermoFisher Scientific®,) i 0,1% de Tritó X-100 (Merck Millipore®) durant 1 hora a temperatura ambient. Durant el procés de bloqueig es donen dos processos, per una banda el Tritó provoca la permeabilització de les membranes de les cèl·lules, fet que permetrà l'accés dels anticossos i la unió als seus antígens específics; i per l'altra, gràcies al sèrum de cavall (HS) es bloquegen els llocs d'unio inespecífics.

A continuació s'incuba amb l'anticòs primari (Taula 10) diluït en la mateixa solució de bloqueig durant tota la nit (ON) a 4°C. Després de tres rentats amb PBS 1X s'incuba amb l'anticòs secundari unit al fluorocrom (Taula 11) en una dilució 1:600 en la solució de bloqueig i per tal de marcar els nuclis s'inclou a la mescla el colorant Hoechst 33258 a una dilució 1:400 durant 40 minuts a temperatura ambient en obscuritat. En acabar es fan tres rentats de 10 minuts amb PBS 1X i ja es poden observar i analitzar les mostres al microscopi òptic invertit d'epifluorescència *Olympus IX70* (10x 0,3 NA i 20x, 0,4 NA) i equipat amb càmera (*Olympus OM-4 Ti*). Les imatges es van prendre utilitzant el programa *DPM manager*.

Materials i mètodes

2.3.5. Anàlisi del secretoma mitjançant *Array de citoquines*

Les citoquines, són proteïnes de senyalització cel·lular secretades les quals tenen un paper important en la inflamació, la immunitat innata, l'apoptosi, l'angiogènesi, el creixement cel·lular i la diferenciació. Estan involucrades en la majoria de malalties, inclòs el càncer. La regulació dels processos cel·lulars per les citoquines és un procés complex i dinàmic (Keren et al. 2009).

En aquest treball hem utilitzat *Human Cytokine Antibody Array G-Series 3 (AAH-CYT-G3-4)* (bioNova, RayBio®) per a la detecció simultània de múltiples citoquines (42) en el sobrenadant de diferents línies cel·lulars de melanoma amb mutació BRAF^{V600E} sensibles (M3, SK-Mel-28, M238, A375) i resistents (M3R, SK-Mel-28R, M238R, A375R) al fàrmac Vemurafenib amb l'objectiu de detectar possibles biomarcadors i/o dianes terapèutiques.

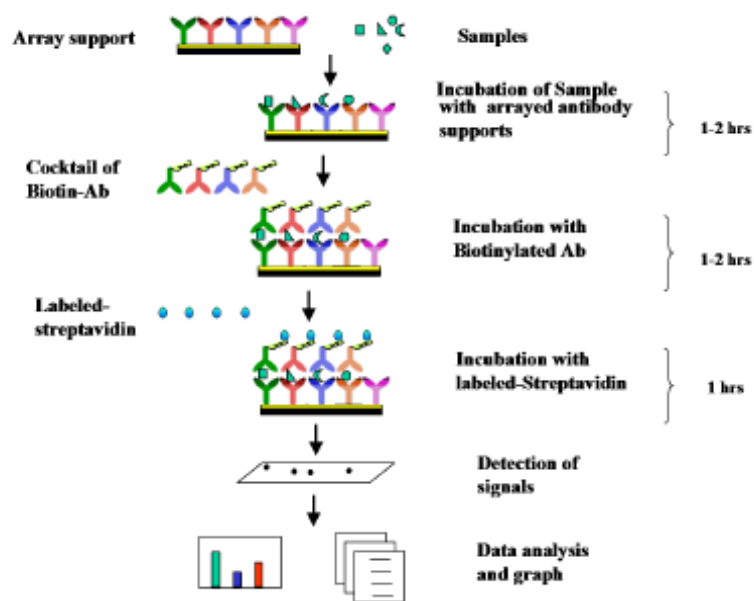


Figura 64. Protocol esquematitzat del citoarray.

Per començar, col·loquem el xip de vidre que conté les citoquines a detectar en la campana de flux laminar per assecat-lo durant 1-2h. Transcorregut aquest temps, afegim 100µl de *Blocking Buffer 1X* a cada pou i ho deixem incubar a temperatura ambient durant 30 minuts per tal de bloquejar les diapositives. Llavors, decantem el *Blocking Buffer 1X* i aspirem el líquid restant de cada pou. Tot seguit, s'hi afegeixen 100µl de les mostres problema (En aquest cas, volem analitzar les citoquines secretades presents en el medi de cultiu i per tant no cal concentrar el sobrenadant). Es cobreix la

cambrà que hi conté el xip de vidre i el sobrenadant problema amb fil adhesiu i s'incuba durant tota la nit (ON) a 4°C.

A continuació, es fan 3 rentats de 2 minuts amb 150µl *Wash Buffer I 1X* i després, es decanta la solució de rentat final. Llavors, es submergeix tot el xip amb *Wash Buffer I 1X* durant 10 minuts més. Aquests mateixos rentats es realitzen una altra vegada, però aquest cop amb *Wash Buffer II 1X*.

Una vegada acabats els rentats, s'incuba amb anticòs primari (70µl de *Biotin-conjugated Anti-Cytokines*) durant tota la nit (ON) a 4°C i després es repeteixen els rentats amb ambdós *buffers*. Seguidament, es fa l'incubació amb l'anticòs secundari (70µl de *Streptavidin-Fluor 1X*) a temperatura ambient durant 2 hores i en fosc per evitar l'exposició a la llum. Transcorregut el temps es repeteixen els rentats anteriors.

Per a l'obtenció d'intensitats de la senyal fluorescent, es deixa que el xip de vidre s'eixugui en una campana de flux laminar durant 20 minuts amb paper d'alumini per protegir-lo de la llum, i després es procedeix a l'escaneig amb un escàner làser (*Innopsys 'InnoScan®*) utilitzant el canal cy3 o "verd" amb una freqüència d'excitació de 532 nm. La intensitat de fluorescència és proporcional a la quantitat de citoquina de la mostra problema.

Per a l'anàlisi, el programa d'escàner de fluorescència làser té una opció per mesurar automàticament el *background* local al voltant de cada punt/spot/citoquina. En aquest valor se li ha de restar el renou de fons mitjançant el paràmetre MITJANA-B532. Després, s'han de normalitzar les dades mitjançant la fórmula:

$$X(Ny) = X(y) * P1/P(y)$$

On: *P1* = intensitat de la senyal mitjana dels punts/controls positius en la matriu de referència predeterminada;
P (y) = intensitat de la senyal mitjana dels punts/controls positius en la matriu problema "i"; *X(y)* = intensitat de la senyal mitjana per al punt "X" a la matriu "i"; *X (Ny)* = intensitat de la senyal normalitzada per al punt "X" a la matriu "i"

Una vegada normalitzats tots els valors, es referencien les dades segons la quantitat de proteïna en la placa cel·lular, quantificada prèviament mitjançant el Mètode Lowry.

3. AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ D'EXOSOMES:

Els exosomes són petites vesícules (de 30 a 150 nm) que contenen ARN complex i carregaments de proteïnes. En l'actualitat, els exosomes es consideren vesícules secretades específicament que permeten la comunicació intercel·lular (Wang et al. 2016).

Les línies cel·lulars M3 (BRAF^{V600E}) parental i la seva resistent a Vemurafenib es van plantar a un 70% de confluència en 7 plaques de 150cm² (a una densitat de 8x10⁶) amb els seus corresponents medis de cultiu suplementats amb un 10% de sèrum fetal boví inactivat (FBSi) durant 48 hores. Transcorregut el temps, es va aspirar el medi, es van fer 3 rentats amb PBS 1X i es van afegir 25mL de medi *serum free* (medi deplecionat d'exosomes). Es va deixar incubant a 37°C durant 6 hores. Després es va aspirar de nou aquest medi i es van afegir 20mL de medi *serum free* per placa durant 60 hores. Passat aquest temps d'incubació es van recollir els medis i, a continuació, es va procedir a aïllar els exosomes a partir dels sobrenadants cel·lulars mitjançant una primera centrifugació a 300xg durant 10 minuts a una temperatura de 4°C per eliminar les restes cel·lulars. Seguidament, es va realitzar una segona centrifugació a 15.000xg durant 20 minuts a 4°C per descartar cossos apoptòtics i vesícules més grans (detritus cel·lulars). Després, es va dur a terme un pas de filtració amb un filtre (Merck Millipore®) de mida de porus de 0,22 micres de fluorur de poliviniliden (PVDF) per eliminar partícules superiors a 200nm. Aquest pas és molt important, doncs depenent de l'objectiu de l'experiment, guardem una part d'aquest sobrenadant que conté exosomes i per tant, ens pot servir com a control positiu en l'experiment.

En darrer lloc, els exosomes es van sedimentar mitjançant una ultracentrifugació a 120.000xg durant 70 minuts a 4°C a la ultracentrífuga *Optima™ MAX-XP* (Beckman Coulter). A continuació, descartem el sobrenadant reservant de nou els mil·lilitres de medi *exosom free* que necessitem per a realitzar l'experiment. El sediment d'exosomes obtingut es resuspèn en un volum de 500µL de PBS 1X i es torna a realitzar una centrifugació a 120.000xg durant 70 minuts a 4°C.

Depenent del que vulguem fer amb els exosomes el pellet dels exosomes el resuspenem amb el *buffer* adient. A una part d'aquest pellet li vam afegir *lysis buffer* per a poder determinar la quantitat de proteïna, i a l'altra li vam afegir medi *serum free* per procedir a realitzar l'experiment de migració.

4. IMMUNOHISTOQUÍMICA (IHC) I TMA (TISSUE MICROARRAY):

4.1. Histologia bàsica i Preparació de les biòpsies

Les mostres d'interès de teixit tant humanes com d'animals s'extreuen i es fixen immediatament amb formol durant 16 hores a 4°C. A continuació, es col·loquen en cassets, es deshidraten i s'inclouen en parafina. Amb la finalitat d'estudiar la histologia de cada teixit, es fan talls de cada bloc de parafina de 5 µm i es tenyeixen amb hematoxilina i eosina (H-E).

4.2. Construcció de TMA

Es va construir un microarray de teixits (TMA) utilitzant l'instrument *Beecher Instruments TMA apparatus* a partir de 61 mostres FFPE (*Formalin-fixed, Paraffin-embedded*) de melanoma (33 melanomes primaris i 28 melanomes metastàtics) provinents del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Arnau de Vilanova de Lleida. Per triar les mostres de melanoma, tant primari com metastàtic, es van obviar totes aquelles que no provinguessin de melanoma superficial (SSMM) o de melanoma nodular (NM), que són tradicionalment els dos tipus més comuns de melanoma i els que més freqüentment són portadors de mutacions de BRAF o de NRAS (Yaman and Akalin 2015). En tots el casos, l'estatus mutacional de BRAF havia estat estudiat prèviament per seqüenciació per PCR. A més, es van afegir mostres de teixit normal (pell) que es van utilitzar com a controls.

Per a la selecció de les zones més representatives de cada tumor, es van efectuar tincions simples d'hematoxilina-eosina sobre els talls complets de les mostres obtingudes. Es va utilitzar un sistema manual per a l'extracció i inserció dels cilindres. La tècnica va consistir en prendre un petit cilindre del bloc de parafina de la mostra d'interès (bloc donant), segons el mapa elaborat prèviament sobre els talls tenyits, i inserir de manera precisa en un bloc receptor de parafina (bloc "en blanc") adequadament perforat. Es varen utilitzar cilindres d'1mm de gruix. L'homogeneïtzació de les mostres un cop introduïdes en el bloc receptor es va realitzar mitjançant calor. Es va anotar la posició de cada cilindre per poder identificar-los posteriorment. D'aquesta manera, es va controlar la identificació de cada cilindre, la seva disposició a la matriu i la determinació del nombre de mostres.

Materials i mètodes

Per altra banda es van utilitzar seccions completes de cinc mostres aparellades de biòpsies FFPE de pacients amb melanoma BRAF^{V600E} abans i després de la teràpia amb inhibidors de BRAF. Les biòpsies van ser realitzades pel Dr. JM Piulats de la Unitat d'Oncologia Mèdica de l'Institut Català d'Oncologia de Barcelona (ICO-IDIBELL) i proporcionades pel Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital de Bellvitge (l'Hospitalet de Llobregat, Barcelona). El tractament específic en cada pacient va ser: Pacient 1 i 3 (Vemurafenib), Pacient 2 i 4 (Dabrafenib + Trametinib) i Pacient 5 (Vemurafenib + Cobimetinib). El comitè d'ètica local va aprovar l'estudi i es va obtenir el consentiment informat de cada pacient.

4.3. Immunohistoquímica

Per estudiar la presència de les proteïnes d'interès en les mostres FFPE dels TMAs o de les biòpsies humanes, o de les seccions completes que procedien de models murins, es va fer un anàlisi immunohistoquímic emprant anticossos específics contra les mateixes. El mètode utilitzat va ser el següent: Es realitzen talls de 3µm dels blocs de parafina i s'assequen durant 1 hora a 65°C. A continuació, es realitza un pretractament de desparafinació i rehidratació del teixit. El següent pas consisteix en el desemmascament antigènic, que permet recuperar i exposar antigens emmascarats durant la preparació de la mostra. Així, s'incuben els portaobjectes amb un tampó comercial, que conté Tris/EDTA 50X a pH 9, en un mòdul de pretractament PT-LINK (Dako) durant 20 minuts a 95°C. A continuació, es bloqueja la peroxidasa endògena de la mostra incubant els portaobjectes amb una solució d'H₂O₂ al 3% per reduir el soroll de fons que s'obté amb el cromogen emprat. Tot seguit, es realitzen tres rentats amb PBS 1X i s'incuba la mostra amb l'anticòs primari durant 30 minuts a temperatura ambient. Posteriorment, es fan tres rentats més amb PBS i s'incuba la mostra amb l'anticòs secundari. Si la senyal és prou forta, s'utilitza un anticòs secundari conjugat amb la peroxidasa (HRP) i s'incuba durant 30 minuts. Per contra, en aquells casos en què sigui necessari amplificar la senyal, s'empra un anticòs secundari conjugat a biotina durant 30 minuts, i finalment, s'incuba la mostra 15 minuts més amb estreptavidina unida a la peroxidasa (HRP), sempre a temperatura ambient. Per acabar, s'aplica el cromogen diaminobenzimida (DAB, Dako) per rebel·lar la reacció, i es realitza una contra-tinció amb hematoxilina per visualitzar els nuclis de les cèl·lules del teixit analitzat.

El protocol optimitzat requereix, per tant, un pretractament amb solució *High pH* (DM828) durant 40 minuts a 97°C, una dilució d'anticossos primaris (Cav3.1: 1/150; LC3: 1/200) amb diluent FLEX (DM830) durant 30 minuts, i el sistema d'afinitat *EnVision FLEX HRP* de Dako (K802321).

A la taula 10 s'indiquen els anticossos que s'han emprat en aquest treball per als anàlisis immunohistoquímics.

4.4. Avaluació dels resultats de l'anàlisi immunohistoquímic

Es va obtenir una puntuació histològica (*Histocore*, Hs) de cada mostra amb valors que van des de 0 (sense immunoreacció) fins a 300 (immunoreactivitat màxima). La puntuació es va obtenir aplicant la següent fórmula:

$$Hs = 1 \times (\% \text{ de tinció de llum}) + 2 \times (\text{tinció moderada}\%) + 3 \times (\% \text{ de tinció forta}).$$

S'ha utilitzat un sistema de puntuació alternativa per avaluar la tinció nuclear de Snail1. Es va utilitzar una puntuació nuclear de 4 nivells (0-3), tenint en compte el patró de tinció nuclear amb diversos nivells d'intensitat (0-negatiu, 1-baix, 2-moderat, intensitat 3-alta). En totes les tincions s'han realitzat els controls negatius i positius adequats.

En el cas de les biòpsies aparellades de pacients abans i després del tractament amb BRAFi, la quantificació de la tinció es va realitzar amb el programa *QuPath 0.1.2* (Bankhead et al. 2017) (*Centre for Cancer & Inflammation of Barts Cancer Institute*, Regne Unit). La regió d'interès (ROI) es va definir com a teixit tumoral viable, excloent la necrosi. Es va realitzar una detecció de cèl·lules positives i es van aplicar tres llindars diferents segons les puntuacions d'intensitat (0, 1, 2 i 3). A continuació, es va utilitzar el programa creant un algoritme de classificació d'arbres aleatoris combinat amb la informació obtinguda sobre les diferents intensitats, per tal de diferenciar el tumor de l'estroma i de les cèl·lules immunes.

5. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ:

5.1. Consideracions prèvies

En aquest treball, s'han emprat com a animals d'experimentació ratolins de laboratori allotjats en instal·lacions de barrera. Els ratolins s'han sotmès a procediments lliures de patògens i s'han mantingut a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ amb una humitat relativa del $50\pm 5\%$, seguint cicles de 12 hores de llum/fosc i amb un accés *ad libitum* a menjar i aigua. A més els ratolins immunodeprimits SCID (*severe combined immunodeficiency*) s'han mantingut en condicions SPF (*specific-pathogen free*).

Tots els estudis *in vivo* realitzats en aquest treball, i per tant, emprant ratolins d'experimentació, s'han regit per les següents disposicions legals:

- Llei 5/1995, del 21 de juny, de la Generalitat de Catalunya, de protecció dels animals emprats per a experimentació animal y per a altres finalitats científiques.
- Decret 214/1997, del 30 de juliol, de la Generalitat de Catalunya, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques.
- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
- En el marc de la legislació europea, la Directiva 63/2010/UE, que deroga a la Directiva 86/609/CEE, del 22 de setembre del Consell d'Europa sobre la protecció de los vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos.

Finalment, tots els procediments amb ratolins s'han realitzat sota la supervisió del personal corresponent del nostre centre, i sempre respectant les directrius legals i ètiques vigents. A més, l'estudi ha estat aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Lleida.

5.2. Ratolins SCID

Els ratolins SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) es caracteritzen per la incapacitat de poder donar una resposta immune apropiada a causa de l'absència o defectuositat dels limfòcits T i B, degut a una mutació recessiva en el cromosoma 16. A nivell funcional, aquesta mutació provoca que

el sistema immunològic no maduri i aquests ratolins no poden combatre infeccions ni rebutjar tumors o trasplantaments. Per tant, són un model animal molt útil per l'estudi de tumors subcutanis o *xenografts*. El nostre laboratori va adquirir els ratolins SCID a través de la companyia *The Jackson Laboratory*.

5.3. Establiment de tumors subcutanis en ratolins SCID

Per a l'establiment de tumors subcutanis o *xenografts in vivo* s'utilitzen animals SCID d'entre 8-12 setmanes d'edat i amb un pes comprès entre els 20-25 grams. Els animals van ser alimentats *ad libitum*. S'injecten subcutàniament, a cada flanc del ratolí, 10^6 cèl·lules de cadascuna de les línies cel·lulars emprades (Skmel147, M238, M238R, Sk-Mel-28R, A375, A375R) en un volum total de 100µl. El creixement tumoral es mesura cada dos dies amb un peu de rei digital i el volum tumoral es calcula d'acord amb la següent fórmula:

$$TV \text{ (tumor volume)} = (D \times d^2) / 2,$$

D correspon al diàmetre gran del tumor i *d*, al petit.

Si es cau, els ratolins es comencen a tractar en el moment que els tumors mesuren 100 mm³. Un cop finalitzat el tractament, els ratolins es sacrifiquen per dislocació cervical i el tumor es col·lecta per al seu anàlisi macroscòpic i immunohistològic.

5.4. Tractaments farmacològics *in vivo*

Vemurafenib

El Vemurafenib s'adquireix en pols (Roche) i es dissol, per al seu ús *in vivo*, en aigua miliQ amb un 4% de DMSO + 3% PEG400 (polietilenglicol) + 5% Tween 80 fins a una concentració de 5 mg/mL. És important mantenir la preparació a 4 °C i vortejar-la bé per dissoldre completament el fàrmac. Aquest tractament s'administra via oral mitjançant unes cànules especials per l'administració de fàrmacs a ratolins (50mg/kg) de forma diària durant 10 dies consecutius.

Mibefradil

El Mibefradil s'adquireix en pols (Santa Cruz Biotechnology) i, per als experiments *in vivo*, es dissol en aigua miliQ per a que estigui a 50mM. En aquest punt es conserva a -20°C fins el seu ús. En el

Materials i mètodes

moment de l'experiment, s'hi afegeix aigua miliQ fins una concentració 28.4mg/mL. Aquest tractament s'administra via oral (25mg/kg) de forma diària durant 10 dies consecutius.

5.5. Extracció de plasma de ratolí

Per tal de validar els biomarcadors detectats en els medis de cultius *in vitro*, s'han extret mostres de sèrum dels ratolins d'interès. Mitjançant una petita punxada a la vena facial dels ratolins podem aconseguir uns 400-500µl de sang, o bé si en necessitem més quantitat la podem obtenir per punció cardíaca sempre i quan es produeixi l'eutanàsia de l'animal quan s'hagi completat l'extracció. La sang es recull amb uns tubs que contenen heparina i després d'uns 15-20 minuts a temperatura ambient, es centrifuguen els tubs a 13000rpm durant 5 minuts i aconseguim un volum de 100-150µl de plasma que es pot utilitzar per diversos anàlisis o guardar a -80°C.

6. EINES BIOINFORMÀTIQUES:

Base de dades TCGA

Ofereix la possibilitat de visualitzar, analitzar i descarregar una gran quantitat de dades genòmiques de múltiples tipus de càncers (Gao et al. 2013).

Per a l'anàlisi *in silico* de l'expressió d'SNAI1, es van descarregar dades d'expressió gènica d'mRNA normalitzades (RNA-Seq z-score) del (cBioPortal(<http://cancergenome.nih.gov/>)). Es van analitzar 243 mostres de melanoma humà (109 BRAF^{V600E} i 134 BRAF WT). Només es van considerar mostres amb més del 70% de contingut de cèl·lules tumorals.

Per a l'estudi de l'autofàgia amb mostres de pacients abans i després de la teràpia dirigida amb inhibidors de BRAF, l'expressió gènica i les dades clíniques es van obtenir del conjunt de dades de la sèrie GEO "GSE50509" (Rizos et al. 2014) a través del paquet R "GEOquery". Es van descarregar un total de 61 mostres amb tota la informació disponible. Les dades d'expressió es van descarregar com a sondes normalitzades de *microarrays* Illumina HumanHT-12 V4.0. Els identificadors de la sonda es van anotar amb símbols de gens HGNC pel resum dels components principals. A continuació, les dades es van transformar a escala log-2. Es van analitzar les dades clíniques per obtenir informació sobre el tractament i el temps d'extracció de la mostra (basal o resistent).

GSEA

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) és un mètode computacional que determina si un conjunt de gens definit a priori mostra estadísticament diferències significatives i concordants entre dos estats biològics (Damian and Gorfine 2004; Subramanian et al. 2005). Aquest anàlisi es pot realitzar mitjançant dades amb perfil molecular conegut o mitjançant base de dades de conjunts de gens.

En el nostre cas, hem utilitzat aquest mètode per a explorar si els gens relacionats amb l'autofàgia estan implicats en la teràpia amb els inhibidors de BRAF. Es va comparar per una banda, el microarray d'expressió gènica (*SurePrint G3 Human Expression v3 8x60K Microarray Kit, Agilent*) entre tres línies cel·lulars de melanoma sensibles i les corresponents resistents a Vemurafenib amb el *Gene set GO-autophagy*. De la mateixa manera, es va comparar la *Gene set GO-autophagy* amb el perfil d'expressió gènica pública (Rizos 2014: GSE50509) de pacients amb melanoma abans i després de la teràpia dirigida amb inhibidors de BRAF.

Materials i mètodes

ImageJ/Fiji

Image J és un programa de processament d'imatge digital de domini públic programat en Java. Aquesta aplicació permet visualitzar i manejar imatges obtingudes a partir de qualsevol microscopi. És molt útil, ja que permet editar o donar color a qualsevol imatge, quantificar intensitats, comptar punts, seleccionar regions d'interès, desenvolupar anàlisis de colocalització, avaluar assajos de migració i invasió, entre d'altres moltes funcions.

Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic s'ha realitzat mitjançant el programa *GraphPad Prism*. Atès que totes les dades emprades són variables contínues, s'han expressat com a mitjana \pm SD de com a mínim tres experiments independents. En tots els anàlisis estadístics s'ha fixat un nivell de significació estadística de $p=0.05$, corregint els p-valors per el test de comparacions múltiples quan ha estat adient. La significació estadística es va verificar mitjançant l'aplicació de la prova de normalitat Kolmogorov-Smirnov seguida de la prova T o la prova One-way ANOVA (comparació de dues o més variables, respectivament) i comparacions múltiples mitjançant el test de Bonferroni per a dades paramètriques. En el cas de dades no paramètriques s'ha utilitzat la prova de Mann-Whitney per a la comparació de dues variables o Kruskal-Wallis per a més de dues. Per tal d'avaluar tant l'efecte principal de cada variable independent sobre una dependent contínua com també si hi ha alguna interacció entre totes elles s'ha realitzat la prova Two-way ANOVA amb la conseqüent correcció amb la prova post-hoc Bonferroni. En el cas de l'anàlisi de les biòpsies aparellades abans i després del tractament amb els inhibidors de BRAF, s'ha utilitzat el test de Wilcoxon per a determinar l'existència de diferències entre les mostres abans i després del tractament. Els p valors s'indiquen amb asteriscs * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

RESULTATS

1. Creació i caracterització de línies cel·lulars de melanoma humà BRAF^{V600E} resistents a Vemurafenib. Anàlisi de l'efecte dels inhibidors (Mibefradil) dels TTCCs sobre l'autofàgia i la mort cel·lular així com sobre els processos de migració i invasió.

Tal i com hem comentat, un alt percentatge de melanomes (40-60%) són portadors de la mutació BRAF^{V600} (V600E o V600K) (Ascierto et al. 2012). El primer fàrmac inhibidor de BRAF^{V600} aprovat pel tractament del melanoma avançat va ser el Vemurafenib. El seu principal problema (comú a altres inhibidors de BRAF, com Dabrafenib) és el desenvolupament freqüent de resistències secundàries (Winder and Virós 2017). Per això, la caracterització dels mecanismes de resistència a Vemurafenib pot ser essencial per determinar estratègies terapèutiques de nova generació (Amann et al. 2017; Dummer et al. 2016; Muñoz-Couselo et al. 2017).

Establiment i validació d'un model resistent a Vemurafenib (M3R) generat a partir de la línia parental M3.

La línia cel·lular M3R resistent al inhibidor de BRAF, Vemurafenib, es va crear al laboratori a partir de la línia cel·lular sensible M3, la qual es va anar exposant a dosis decreixents del fàrmac començant per una concentració de 20µM de Vemurafenib durant 3 dies i després a una concentració de 5µM durant uns 6 mesos fins aconseguir clons resistents. Després de la seva expansió, s'ha anat mantenint a una concentració d'1µM de Vemurafenib, aconseguint un model de resistència escalat evidenciat en la figura 65.

La línia M3R tractada amb el fàrmac (Vemurafenib) era capaç de proliferar de forma semblant al control no tractat, mentre que la línia M3 sensible parental quan es tractava amb Vemurafenib, presentava una disminució de la proliferació (Figura 65a-b) així com de la tinció positiva per ki-67 (marcador de proliferació), a més de mostrar parada del cicle cel·lular en les fases G1 i S (Figura 65c).

Resultats

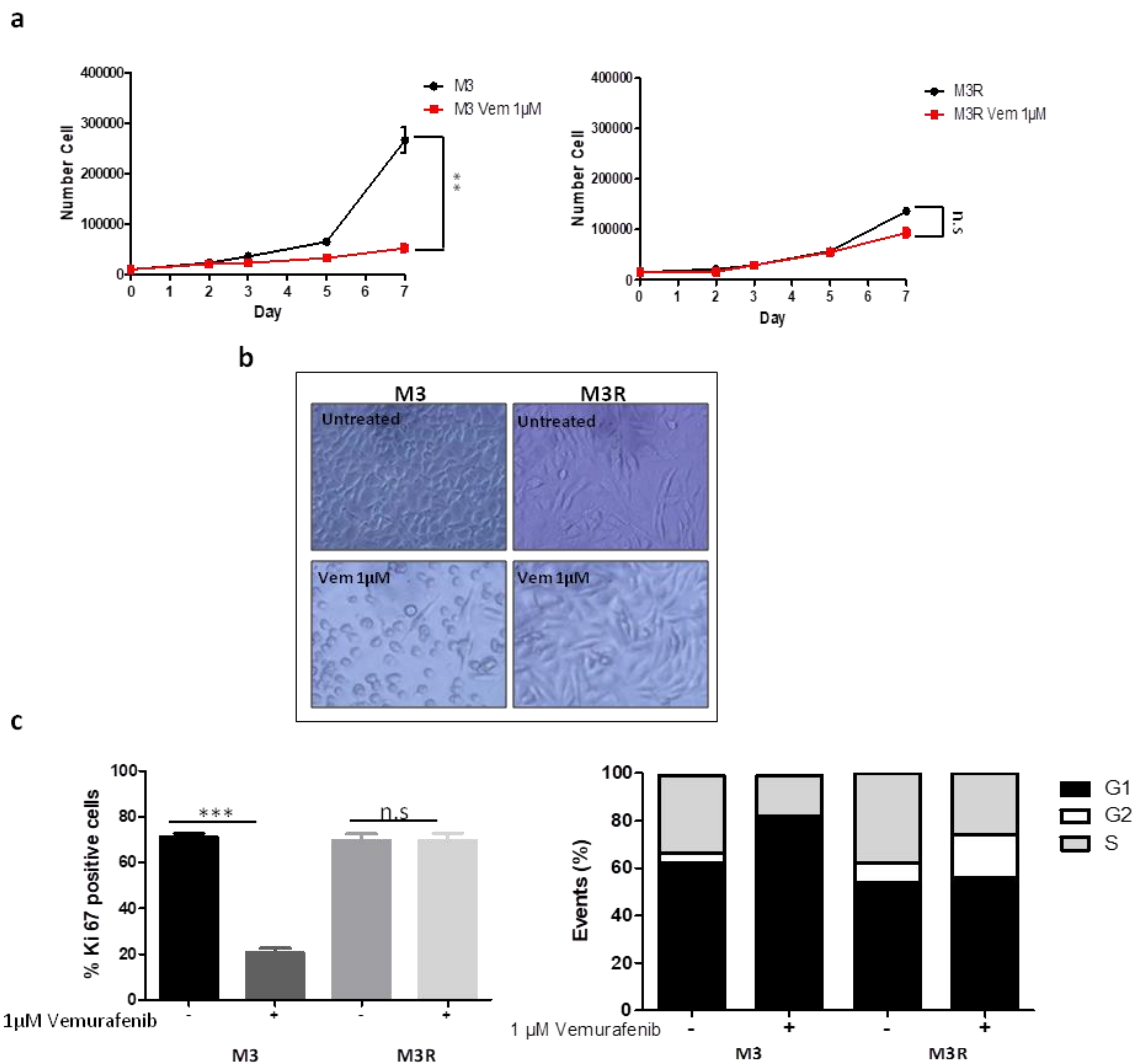


Figura 65. Model de resistència a Vemurafenib. Taxes de proliferació, viabilitat i cicle cel·lular. a) Corba de proliferació de la línia cel·lular parental M3 i resistent M3R sota el tractament amb Vem ($1\mu\text{M}$) durant 7 dies. b) Imatges representatives de les cèl·lules M3 vs M3R abans i després del tractament amb Vem. c) Assaig de cèl·lules positives per Ki-67 (%) i assaig del cicle cel·lular (%) de la línia cel·lular parental (M3) i la seva resistent corresponent (M3R) després del tractament amb Vem ($1\mu\text{M}$, 48h). L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant un Two-Way ANOVA, seguit del test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu).

Seguidament, vam realitzar assajos de mort cel·lular per determinar si el tractament amb Vemurafenib a més de reduir la proliferació cel·lular, també induïa mort en les cèl·lules sensibles. En la Figura 66 observem que efectivament amb el tractament amb Vemurafenib ($1\mu\text{M}$) les M3 van reduir la viabilitat cel·lular (mesurada en assaigs MTT) (Figura 66a); i així mateix es va induir la seva

mort per apoptosi, com podem observar amb el contactge de nuclis apoptòtics i mitjançant les cèl·lules positives per Annexina V (Figura 66b). Per contra, la línia M3R, resistent al fàrmac, mantenia la seva viabilitat cel·lular després de ser tractada amb BRAFi (Vemurafenib).

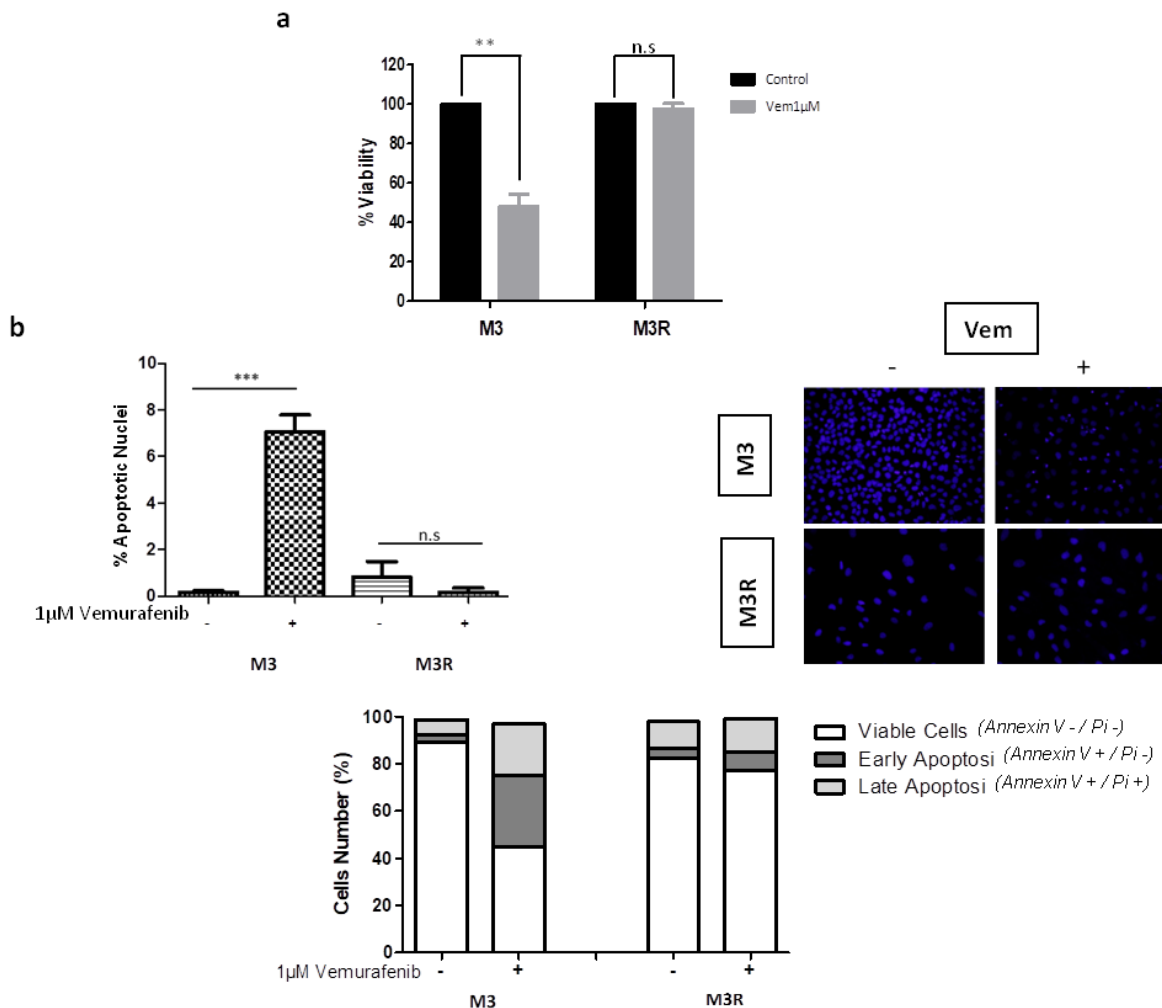


Figura 66. Model de resistència a Vemurafenib. El Vemurafenib indueix mort cel·lular per apoptosi a la línia sensible. a) Assaig de viabilitat cel·lular (%) de la línia cel·lular parental M3 i resistent M3R sota el tractament amb Vem (1µm) durant 48h. b) Nuclis apoptòtics i assaig d'Annexina V (%) després del tractament amb Vemurafenib a les 48h. L'anàlisi estadístic es va realitzar amb (a) la prova de Mann Whitney i (b) ANOVA, seguida del test post hoc de Bonferroni (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; n.s., no significatiu).

Resultats

Cav3.1 està sobreexpressat en cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} resistents a Vemurafenib.

Atès que anteriorment havíem determinat que el TTCC Cav3.1 es trobaven altament expressat en els melanomes BRAF^{V600E} en comparació amb les cèl·lules de melanoma NRAS (Maiques et al. 2018), vam voler comprovar la seva expressió per RT-qPCR en sis línies cel·lulars de melanoma (M3, M249, SK-Mel-28, M238, A375, Mel888) sensibles i resistents a Vemurafenib portadores de la mutació BRAF^{V600E}.

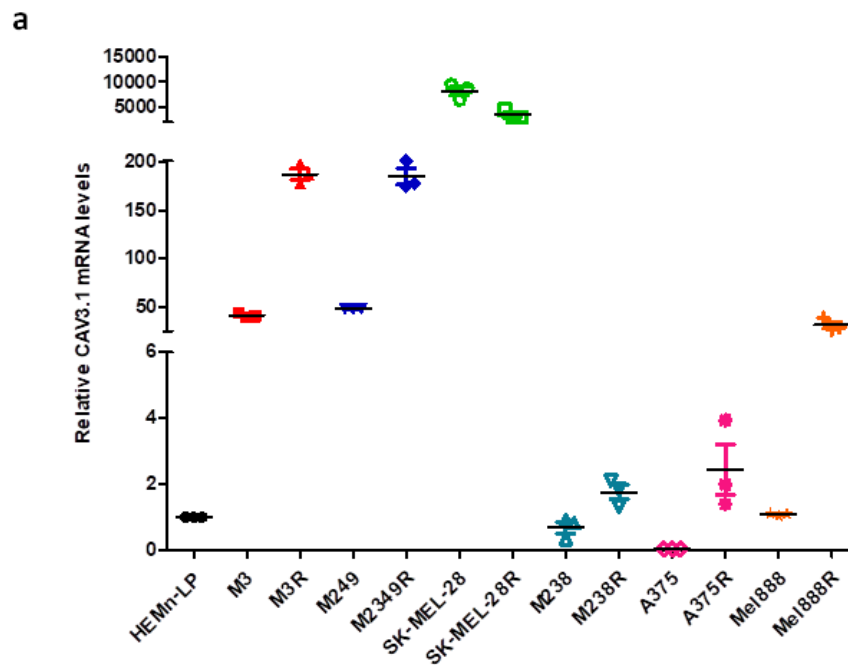


Figura 67. L'expressió de la isoforma Cav3.1 dels TTCCs es troba incrementada en les línies BRAF^{V600E} resistents a Vemurafenib. qRT-PCR de Cav3.1 en tots els parells cel·lulars BRAF^{V600E} sensibles i resistents a Vemurafenib. Les dades es van normalitzar amb l'expressió de la GAPDH. Els nivells d'ARNm dels melanòcits (HEMn-LP) es mostren per comparar.

Les dades mostren que el TTCC Cav3.1 està sobreexpressat en totes les línies cel·lulars resistents en comparació amb els melanòcits (HEMn-LP). A més, si comparem cada línia cel·lular (sensible vs resistant) l'expressió de mRNA de Cav3.1 es veu incrementada en gairebé totes les línies cel·lulars resistents a l'inhibidor de BRAF (BRAFi) en comparació amb les seves parentals (Figura 67).

Les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} resistents a Vemurafenib presenten un increment de l'autofàgia basal.

El melanoma presenta una autofàgia constitutiva, la qual es troba incrementada en biòpsies i línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E} (Maiques et al. 2018; Maiques et al. 2016). Per tal d'estudiar l'autofàgia en les cèl·lules de melanoma resistents, vam mesurar els nivells proteics de p62 i LC3II, ja que són molècules associades als autofagosomes i representen els marcadors autofàgics quantitius més utilitzats per Western blot (WB). Els resultats van mostrar nivells de p62 i LC3II més alts en la majoria de les línies cel·lulars resistents (Figura 68a). A més, a la figura 68b, les cèl·lules M3R mostren un lleuger augment dels nivells de p62 i LC3II en comparació amb M3 i aquest increment és encara major després d'un breu tractament amb Cloroquina (CQ, inhibidor de l'autofàgia), el que suggereix un augment de l'autofàgia basal en les cèl·lules resistents.

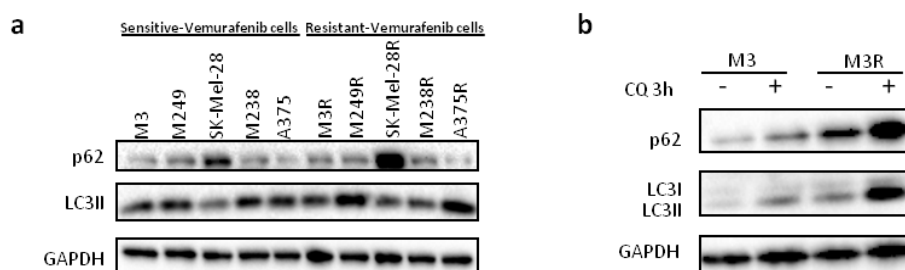


Figura 68. Els melanomes BRAF^{V600E} resistents a Vemurafenib presenten un increment de l'autofàgia basal.

a) Anàlisi de p62 i LC3II per WB a partir de lisats proteics totals de totes les línies cel·lulars sensibles i resistents al fàrmac. b) Anàlisi per WB per a determinar els nivells de proteïna p62 i LC3II de M3 i M3R després d'un breu tractament amb Cloroquina (CQ) durant 3h. S'ha utilitzat la GAPDH com a control de càrrega.

Per explorar si els gens relacionats amb l'autofàgia estaven implicats en la teràpia BRAFi, es va realitzar un *microarray* d'expressió gènica (*SurePrint G3 Human Expression v3 8x60K Microarray kit, Agilent*), gràcies a la col·laboració amb la unitat de melanoma del Departament de Dermatologia de l'Hospital Clínic i IDIBAPS de Barcelona sota la direcció de la Dra. Susana Puig. Gràcies a l'extracció de mRNA de tres línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E} sensibles i Vem-resistents (M3, M249, M238 i les corresponents resistents) es va realitzar el *microarray d'expressió*, i es va comparar amb la *Gene Set GO-AUTOPHAGY signature*. Un anàlisi específic d'enriquiment del conjunt de gens (GSEA) va mostrar una associació significativa ($p < 0.05$) entre les nostres mostres i el conjunt de gens implicats en l'autofàgia (Figura 69a). Per altra banda a més, es va comparar la *Gene Set GO-AUTOPHAGY signature* amb el perfil d'expressió gènica d'una base de dades pública de pacients amb

Resultats

melanoma abans i després de la teràpia dirigida contra BRAF (Rizos 2014, GSE50509). L'anàlisi mitjançant GSEA va mostrar un solapament significatiu entre els melanomes resistents a inhibidors de BRAF i la signatura d'autofàgia (GO-AUTOPHAGY) (Figura 69b). Aquestes dades suggereixen que els melanomes resistents presenten un perfil d'expressió gènica associat amb la via de l'autofàgia, indicant un increment de l'autofàgia basal.

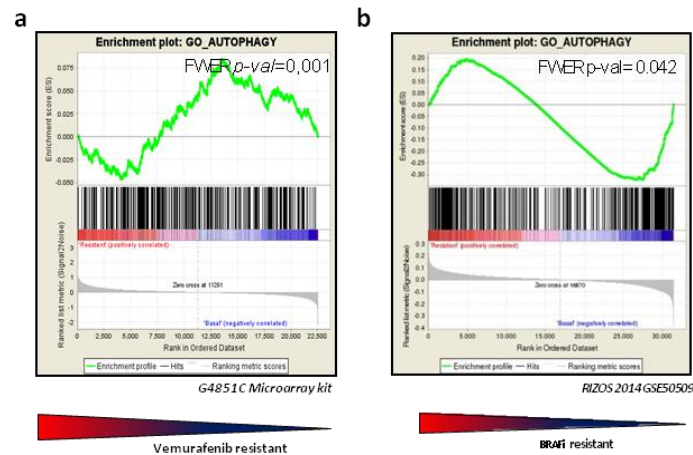


Figura 69. Anàlisi d'enriquiment del conjunt de gens (GSEA) de la GO-autophagy signature del (a) microarray d'expressió gènica (SurePrint G3 Human Gene Expression v3 8x60K Microarray kit, Agilent) de tres línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E} sensibles versus Vem-resistents i (b) base de dades pública de pacients amb melanoma abans i després del tractament amb BRAFi (Rizos 2014: GSE50509).

Els nivells de Cav3.1 i LC3 augmenten en les biòpsies humanes de melanomes resistents a BRAFi.

Per ampliar les nostres observacions a la clínica, es van avaluar els nivells proteics de Cav3.1 i LC3 en una cohort de cinc biòpsies de pacients aparellades abans i després de la teràpia BRAFi. Es van analitzar els nivells d'ambdós marcadors en les seccions tumorals de cada pacient abans i després de la teràpia. Els nivells (*histoscore*) dels dos biomarcadors van ser determinats per IHC.

En general, es va observar una major immunoexpressió de Cav3.1 i també de LC3 en gairebé tots els tumors resistents després del tractament (Figura 70), confirmant així els resultats amb cultius cel·lulars. A més, si dividim la immunotinció per *scores* utilitzant tres llinars diferents segons la intensitat, el *score* 3 d'ambdós biomarcadors augmentava significativament en les biòpsies posteriors al tractament (Figura 70a). Aquestes dades suggereixen un increment de l'autofàgia basal i un augment progressiu del TTCC Cav3.1 sobre les biòpsies resistents a la teràpia inhibidora per BRAF, assenyalant una possible implicació de Cav3.1 en el mecanisme de resistència en el melanoma.

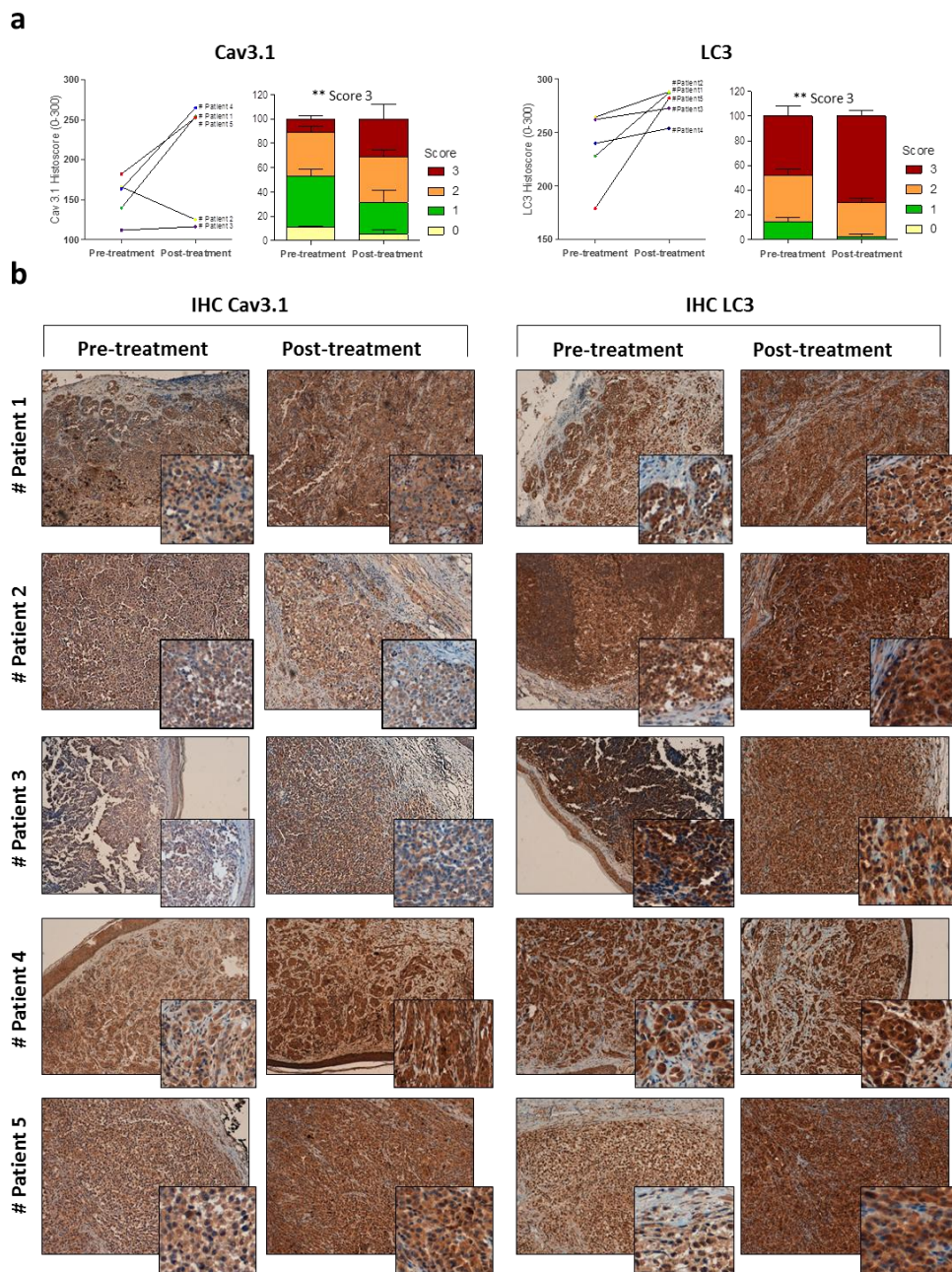


Figura 70. La immunoexpressió de LC3 i Cav3.1 augmenta en biòpsies de pacients amb melanoma resistent a BRAFi. a) El gràfic de l'esquerra de cada biomarcador mostra la quantificació de la tinció de Cav3.1 i LC3 abans i després del tractament amb BRAFi de 5 pacients. L'anàlisi estadístic es va estimar mitjançant la prova de wilcoxon. Per al gràfic de la dreta es van aplicar tres llinars diferents de cèl·lules positives per Cav3.1 i LC3 segons la intensitat (0, 1, 2 i 3). L'anàlisi estadístic es va estimar mitjançant proves ANOVA i Bonferroni ($p < 0,01$). b) Fotografies representatives de Cav3.1 i LC3 en les mostres aparellades de pacients abans i després de a teràpia a BRAFi. Ampliació de fotos 10x i 20x. El tractament específic en cada pacient va ser: Pacient 1 i 3 (Vemurafenib), Pacient 2 i 4 (Dabrafenib + Trametinib) i Pacient 5 (Vemurafenib + Cobimetinib).**

Resultats

L'inhibidor dels TTCCs, Mibefradil, indueix mort cel·lular mitjançant un bloqueig de l'autofàgia en totes les línies cel·lulars de melanoma resistent a Vemurafenib.

Seguint amb la nostra línia d'estudi, vam voler avaluar l'efecte de la inhibició de l'autofàgia mitjançant l'inhibidor dels TTCCs, Mibefradil, sobre la viabilitat cel·lular en totes les línies de melanoma resistent a Vemurafenib per tal de determinar la sensibilitat al fàrmac de cada una d'elles. Per dur a terme aquests experiments de mort cel·lular de les línies enfront al tractament amb Mibefradil, vam generar cultius cel·lulars al 70% de confluència.

Tal com observem en els gràfics que mostren la viabilitat cel·lular (%) mitjançant l'assaig MTT, les línies resistent no eren més sensibles a Mibefradil en comparació amb les seves parentals (Figura 71), tot i expressar nivells transcripcionals (mRNA) més alts de la isoforma Cav3.1 dels TTCCs (Figura 67). Tal com es mostra en la corba de dosi-resposta generada (Figura 71), la concentració essencial per aconseguir l'IC50 va ser entre 10-12 μ M en totes les línies cel·lulars i no es van observar diferències en la viabilitat cel·lular entre les parelles sensibles i resistent. Aquests resultats suggereixen que l'increment de l'expressió de Cav3.1 no incrementa la sensibilitat a Mibefradil de les línies resistent respecte a la viabilitat cel·lular.

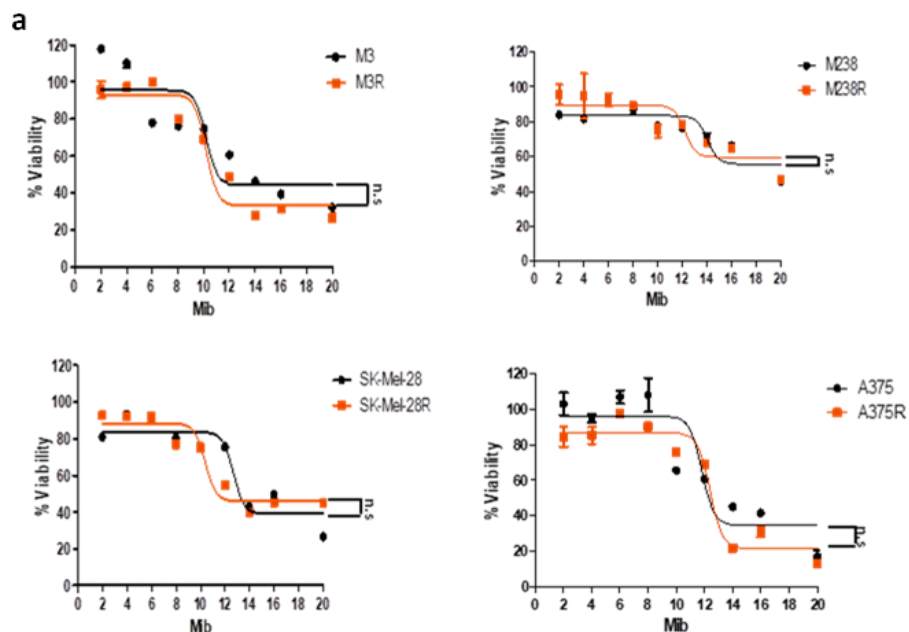


Figura 71. Les línies de melanoma $BRAF^{V600E}$ resistent no són més sensibles al Mibefradil que les seves parentals. Corba de dosi-resposta (%) de Mibefradil en les línies cel·lulars M3, M238, SK-Mel-28 i A375 sensibles i resistent a Vemurafenib. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un Two-Way ANOVA, seguit del test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s., no significatiu).

Per altra banda, en línia amb resultats anteriors utilitzant l'inhibidor dels TTCCs, vam voler estudiar si el bloqueig dels TTCCs mitjançant el tractament amb Mibefradil induïa un bloqueig del flux autofàgic també en les línies de melanoma resistents a Vemurafenib. Amb aquest fi, vam portar a terme un anàlisi proteic dels marcadors d'autofàgia per WB i per immunocitoquímica.

Els resultats van indicar nivells més elevats de p62 i LC3II en les línies cel·lulars resistents a BRAFi respecte les sensibles al fàrmac (Figura 72a) una vegada sotmeses a un tractament de 24h de Mib. A més, el tractament amb CQ, que impedeix la fusió d'autofagosomes (AP) amb lisosomes (Boya et al. 2005), va conduir a increments similars de les proteïnes LC3II i p62 en totes les línies cel·lulars resistents a Vem (Figura 72b), indicant que efectivament el tractament amb Mibefradil bloqueja l'autofàgia a les línies resistents a Vemurafenib.

Adicionalment, la immunofluorescència LC3B mostrava un augment del nombre d'autofagosomes (AP) tant en les cèl·lules M3 com en les M3R quan van ser sotmeses al tractament amb Mib o CQ (Figura 72b-c). Per corroborar que certament el Mibefradil també indueix un bloqueig de l'autofàgia en les línies resistents, vam determinar per WB que l'addició de CQ durant 3h en les cèl·lules tractades amb Mibefradil, no augmentava encara més els nivells de p62 i LC3II (Figura 72c). En conjunt, aquests resultats indiquen que el Mibefradil bloqueja l'autofàgia, independentment de l'adquisició o no de la resistència a Vemurafenib.

Per tal d'analitzar l'efecte dels inhibidors farmacològics de l'autofàgia en la mort cel·lular i l'apoptosi de les línies cel·lulars resistents a Vemurafenib, es van realitzar assajos de viabilitat cel·lular i d'Annexina V després dels tractaments amb Vem (1 μ M) durant 48h, Mibefradil (Mib, 10 μ M) i CQ (12.5 μ M) durant 24 hores en les línies cel·lulars M3 i M3R. De nou, tots els tractaments augmentaven el percentatge de cèl·lules positives per Annexina V i reduïen la viabilitat cel·lular en ambdues línies cel·lulars, indicant en resum, que el Mibefradil indueix mort per apoptosi també en les línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E} resistents a Vemurafenib (Figura 72d).

Resultats

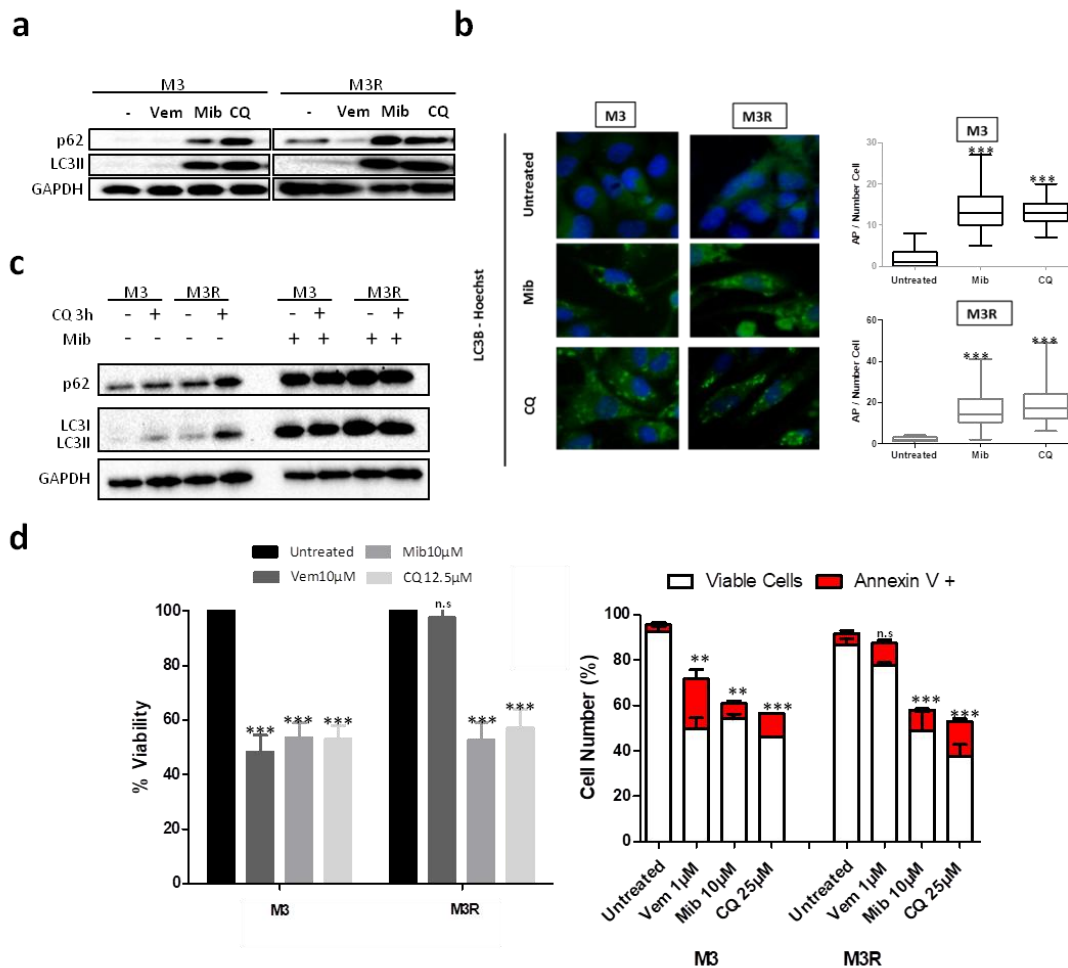


Figura 72. El Mibefradil indueix la mort cel·lular en totes les cèl·lules de melanoma resistents per inhibició de l'autofàgia. a) Anàlisi dels nivells proteics de p62 i LC3 per WB de les línies cel·lulars de melanoma M3 i M3R exposades a Vem (1µM) durant 48h, Mibefradil (Mib, 10µM) i CQ (12.5µM) durant 24 hores. S'ha utilitzat la GAPDH com a control de càrrega. b) Imatges i gràfics de la Immunofluorescència de LC3B en cèl·lules sensibles (M3) i Vem-R (M3R) després dels tractaments. AP: Autofagosomes. c) Els nivells de les proteïnes p62 i LC3I/II van ser analitzats per WB en línies cel·lulars M3 i M3R tractats amb Mibefradil (10µM) durant 24 hores. Paral·lelament, la meitat dels cultius cel·lulars es van tractar addicionalment amb CQ (25µM) durant les últimes 3h per comprovar els nivells proteics dels marcadors autofàgics. d) Per analitzar la mort cel·lular es van realitzar assajos de viabilitat cel·lular i l'assaig d'Annexina V després dels tractaments amb Vem (1µM) durant 48h, Mibefradil (Mib, 10µM) i CQ (12.5µM) durant 24 hores en línies cel·lulars M3 i M3R. Els tractaments augmenten el percentatge de cèl·lules positives per Annexina V i redueixen la viabilitat cel·lular. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n., no significatiu, van ser determinats per la prova Two-Way ANOVA, seguit del test post hoc de Bonferroni.

El Mibefradil inhibeix el creixement tumoral *in vivo* de les cèl·lules de melanoma sensibles i resistents per inhibició de l'autofàgia.

A continuació, es va pretendre analitzar l'efecte del Mibefradil sobre el creixement tumoral *in vivo* utilitzant models de *xenografts*. Vam injectar cèl·lules A375 i A375R (10^6) subcutàniament en ratolins SCID. Deu dies després del trasplantament, vam administrar cada dia i durant dues setmanes Vemurafenib (50mg/kg) o Mibefradil (25mg/kg) per via oral. Com era d'esperar, els tumors derivats de les cèl·lules A375R tractats amb Vemurafenib van créixer de manera similar a aquells tractats amb el control (vehicle). No obstant, el tractament amb Vemurafenib va disminuir el creixement dels tumors dels *xenografts* sensibles (A375). Per altra banda, en tots els casos, el Mibefradil va inhibir significativament el creixement del tumor tant en el model sensible com resistent en ratolins SCID en comparació amb els *xenografts* control (Figura 73a).

Després, vam analitzar l'autofàgia i l'apoptosi per IHC en els *xenografts* generats. Els tumors tractats amb Mibefradil van mostrar una major immunoexpressió de LC3 en comparació amb els controls (Figura 73b), confirmant així els nostres resultats *in vitro* (Figura 72a-b). A més, la immunotinció de Caspasa-3, un marcador d'apoptosi (Chen et al. 2015), mostrava una major tinció en els tumors tractats amb Mibefradil, indicant que l'inhibidor dels TTCC indueix mort cel·lular també en el model de *xenografts* de ratolins *in vivo* (Figura 73b).

En conjunt, aquests resultats suggereixen que el Mibefradil té un paper important en la reducció de la proliferació cel·lular i del creixement tumoral mitjançant un bloqueig de l'autofàgia, i per tant, indueix mort cel·lular per apoptosi en cèl·lules de melanoma tant sensibles com resistents *in vivo* (Huang et al. 2015).

Resultats

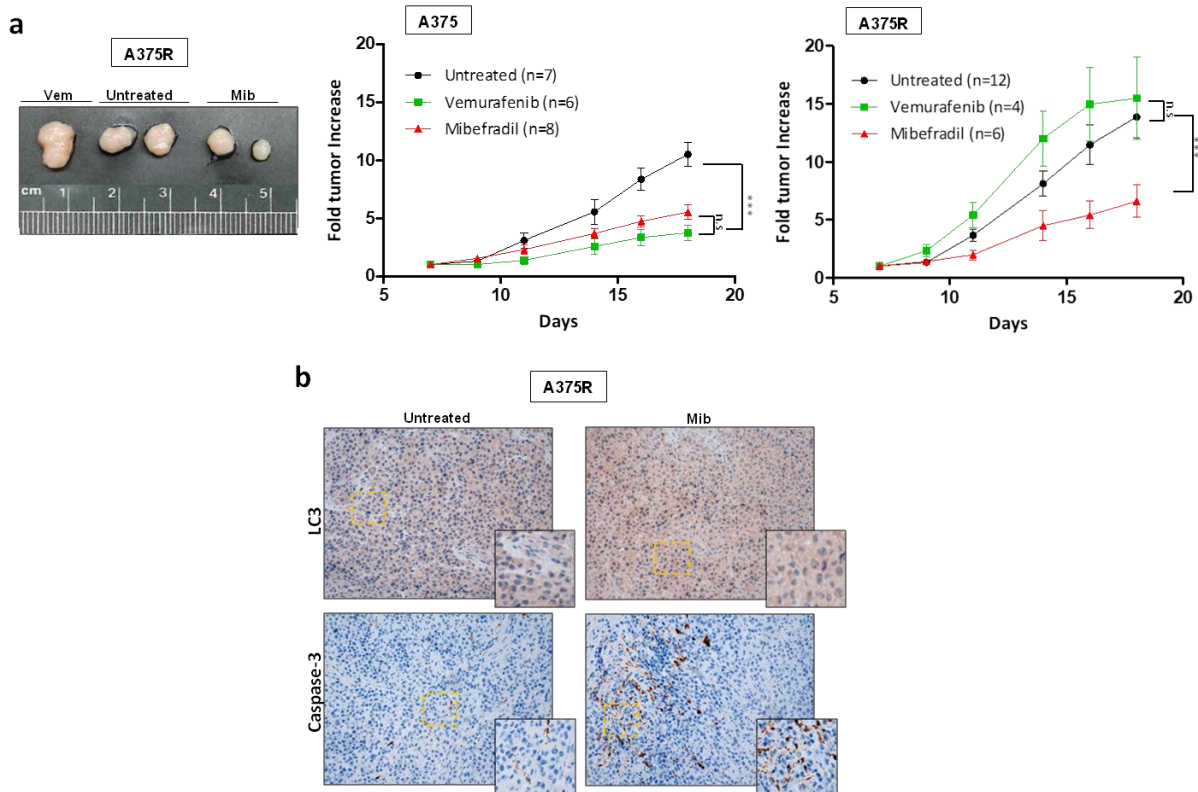


Figura 73. El Mibefradil inhibeix el creixement tumoral en ratolins SCID prèviament injectats amb cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} sensibles i resistents a Vemurafenib. a) Eficàcia terapèutica in vivo (fold tumor increase) del Mibefradil (25mg/kg) i Vemurafenib (50mg/kg) després de 10 dies de tractament en tumors A375 i A375R. b) Imatges representatives que mostren la tinció de LC3 i Caspase-3 per IHC en el model subcutani de A375R. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un Two-Way ANOVA, seguit del test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$; n.s, no significatiu).**

El Vemurafenib induïx l'autofàgia com a mecanisme de resistència en les línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E}.

S'ha descrit que el Vemurafenib podria induir l'autofàgia com un mecanisme potencial per promoure la resistència en cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} (Ma et al. 2014; Martin et al. 2017). Primer, per confirmar que el Vemurafenib induïa l'autofàgia en les nostres línies cel·lulars, vam tractar-les amb el fàrmac a una concentració d'1µM durant 48h i després li vam afegir CQ durant les últimes 3 hores de cultiu per avaluar els nivells dels marcadors autofàgics tant per proteïna com per immunofluorescència.

L'acumulació de LC3II i el punteig d'autofagosomes (punts positius per LC3B) amb el co-tractament va ser més elevada en comparació amb la condició tractada només amb Vem (Figura 74a), demostrant que el Vemurafenib també induïx l'autofàgia en les nostres línies de melanoma cutani tant parentals com resistents.

Per acabar de confirmar els resultats descrits anteriorment, es va mesurar el flux autofàgic tant en condicions basals com després dels tractaments amb Mibefradil i Vemurafenib amb el sistema tàndem en la línia resistent M3R. Com s'ha comentat, el plasmidi tàndem (ptLC3/mRFP-GFP) és una construcció que permet la sobreexpressió de la proteïna autofàgica LC3 associada a les proteïnes fluorescents mRFP i GFP. La proteïna GFP perd la fluorescència a pH àcid, per tant, una vegada es fusionen els autofagosomes i el lisosomes aquesta proteïna perd emissió verd fluorescent, quedant només la fluorescència vermella. Aquest assaig ens permet distingir els autofagosomes, on la fluorescència serà groga a causa de la colocalització verda i vermella, dels autofagolisosomes que mostraran fluorescència vermella per la pèrdua de la fluorescència verda dins dels lisosomes. De nou, com a controls s'han utilitzat la CQ (control de bloqueig d'autofàgia) i la Rapamicina (control inducció autofàgia).

Les imatges mostren que les cèl·lules control presentaven nivells basals d'autofàgia elevada (puntejat vermell). Després dels tractaments amb Cloroquina (CQ) 25µM i Mibefradil (Mib) 10µM, es van observar punts grocs que indiquen un bloqueig del flux autofàgic. El tractament amb Rapamicina (Rapa) 500nm i Vemurafenib (Vem) 1µM mostrava punts vermells demostrant una inducció de l'autofàgia. En resum, el conjunt de resultats indiquen que el Mibefradil també inhibeix l'autofàgia i que el Vemurafenib la induïx en les línies resistents de melanoma BRAF^{V600E} (Figura 74b).

Resultats

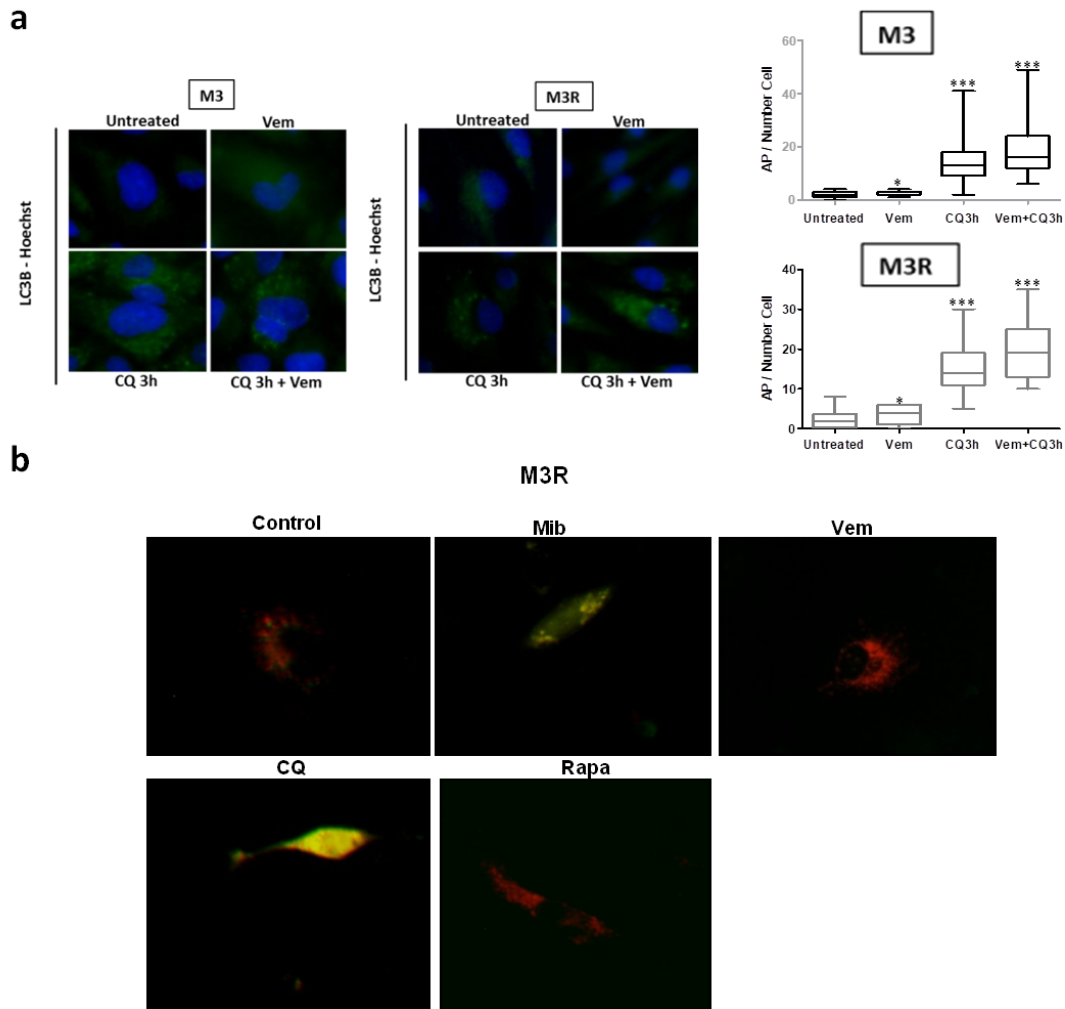


Figura 74. El Vemurafenib actua com inductor de l'autofàgia en les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E}. a) Immunofluorescència de LC3B en M3 i M3R després del tractament amb Vem ($1\mu\text{M}$, 48h) i co-tractament amb Vem més 3 hores de CQ. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n., no significatiu, van ser determinats mitjançant la prova one-way ANOVA, seguida del test post hoc de Bonferroni. b) Imatges representatives de les cèl·lules M3R transfectades amb el plasmidi ptfLC3 i tractades amb Cloroquina (bloquejant de l'autofàgia) o rapamicina (inductor de l'autofàgia), a més de Vemurafenib i Mibefradil. Les cèl·lules amb puntejat de LC3 groc degut a la colocalització de la fluorescència vermella i verda mostren els autofagosomes. Les cèl·lules amb puntejat vermell indiquen la presència d'autofagolisosomes.

El bloqueig de l'autofàgia restableix la viabilitat cel·lular en combinació amb Vemurafenib en algunes línies cel·lulars de melanoma resistent al fàrmac.

Llavors, vam procedir a estudiar la viabilitat cel·lular en totes les línies sensibles i resistent de melanoma cutani sota diferents condicions i en combinació amb els diferents tractaments. Com era d'esperar, les cèl·lules de melanoma sensibles reduïen la viabilitat quan es tractaven amb Vemurafenib, no així en el cas de les seves resistent (Figura 75a). Basant-nos en aquesta evidència i pel paper citoprotector conegut de l'autofàgia en el melanoma (Ma et al. 2014), vam testar l'efecte de l'inhibidor dels TTCCs, Mibefradil, en la mort cel·lular induïda per Vemurafenib. La viabilitat i la mort cel·lular de les cèl·lules de melanoma es van analitzar després del tractament amb Vem (1 μ M) durant 48h i/o amb Mibefradil (10 μ M) i CQ (25 μ M) durant 24 hores.

En termes de viabilitat cel·lular, els resultats van mostrar que en totes les cèl·lules de melanoma sensibles, la teràpia combinada (Vem+Mib o Vem+CQ) reduïa la viabilitat cel·lular tant com la monoteràpia sola, és a dir, amb el tractament amb Mibefradil sol, fins i tot quan l'autofàgia està bloquejada (amb el tractament amb CQ). Tot i això, no es van observar efectes additius ni sinèrgics en els tractaments combinats (Figura 75a). Pel que fa a les línies cel·lulars resistent, tant el tractament amb Mibefradil com el bloqueig de l'autofàgia amb CQ promouen la mort cel·lular i reduïen la viabilitat en totes les cèl·lules, tal com s'ha descrit anteriorment. No obstant, sorprenentment, amb les teràpies combinades podíem separar clarament dos grups de línies cel·lulars segons el seu efecte. Els resultats van revelar que les teràpies combinades disminuïen la viabilitat en algunes línies cel·lulars resistent (M238R, A375R i Mel888R), però en altres (M3R i Sk-Mel-28R), el tractament combinat mantenia la seva viabilitat en comparació amb el tractament en monoteràpia (Mib o CQ). És a dir que, en algunes línies resistent (M3R i Sk-Mel-28R) el tractament combinat (Vem+Mib o Vem+CQ) no tan sols no actuava additiva o sinèrgicament, sinó que determinava una millor viabilitat cel·lular que el tractament amb monoteràpia tan sols amb Mibefradil o tan sols amb Cloroquina (Figura 75a-b).

Resultats

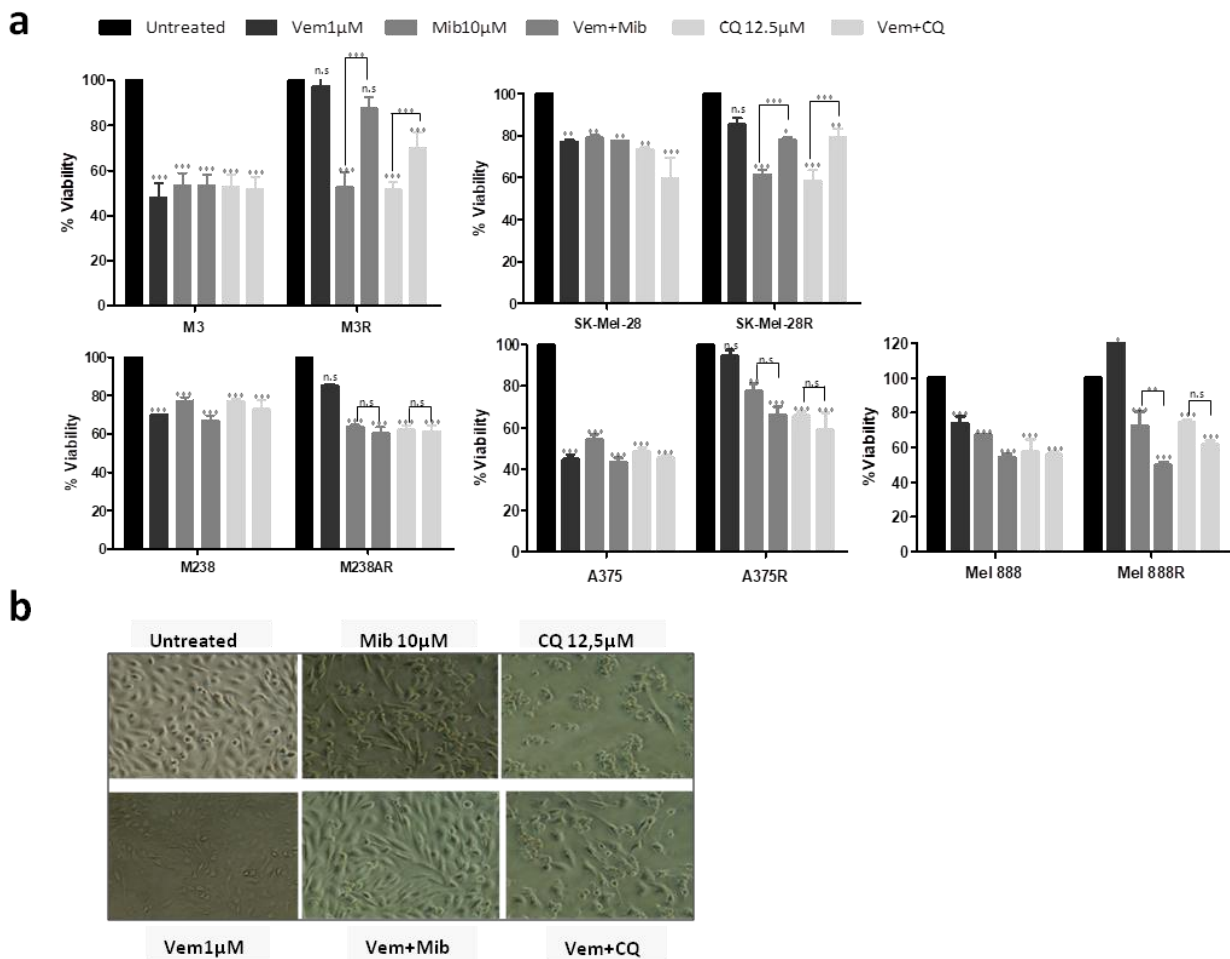


Figura 75. El bloqueig de l'autofàgia restableix la viabilitat cel·lular en combinació amb Vemurafenib en algunes línies cel·lulars de melanoma resistents. a) Assajos de viabilitat cel·lular (%) per MTT de totes les línies cel·lulars parentals i les seves resistents corresponents sota tractament de Vem ($1\mu\text{M}$, 48h) i/o de Mibefradil ($10\mu\text{M}$) durant 24h. b) Imatges representatives de la viabilitat cel·lular afectades pels tractaments en M3R. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant un Two-Way ANOVA, seguit del test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu).

A més, la corba dosi-depenent de Mibefradil en les cèl·lules resistents prèviament tractades amb Vemurafenib mostrava un efecte lleugerament sinèrgic en unes línies (M238R, A375R i Mel888R) o es produïa un *shift* que resultava en una recuperació significativa de la viabilitat cel·lular en les línies resistents M3R i Sk-Mel-28R (Figura 76a).

Finalment i per analitzar l'apoptosi de la teràpia combinada, es va realitzar l'anàlisi d'Annexina V i l'assaig d'exclusió de Blau de Tripà en les cèl·lules M3R i Sk-Mel-28R. Els resultats ens indiquen una

disminució del percentatge de cèl·lules apoptòtiques (Annexin V) i de mort cel·lular (positives per Blau Tripà) després de l'exposició de la teràpia combinada(Figura 76bc).

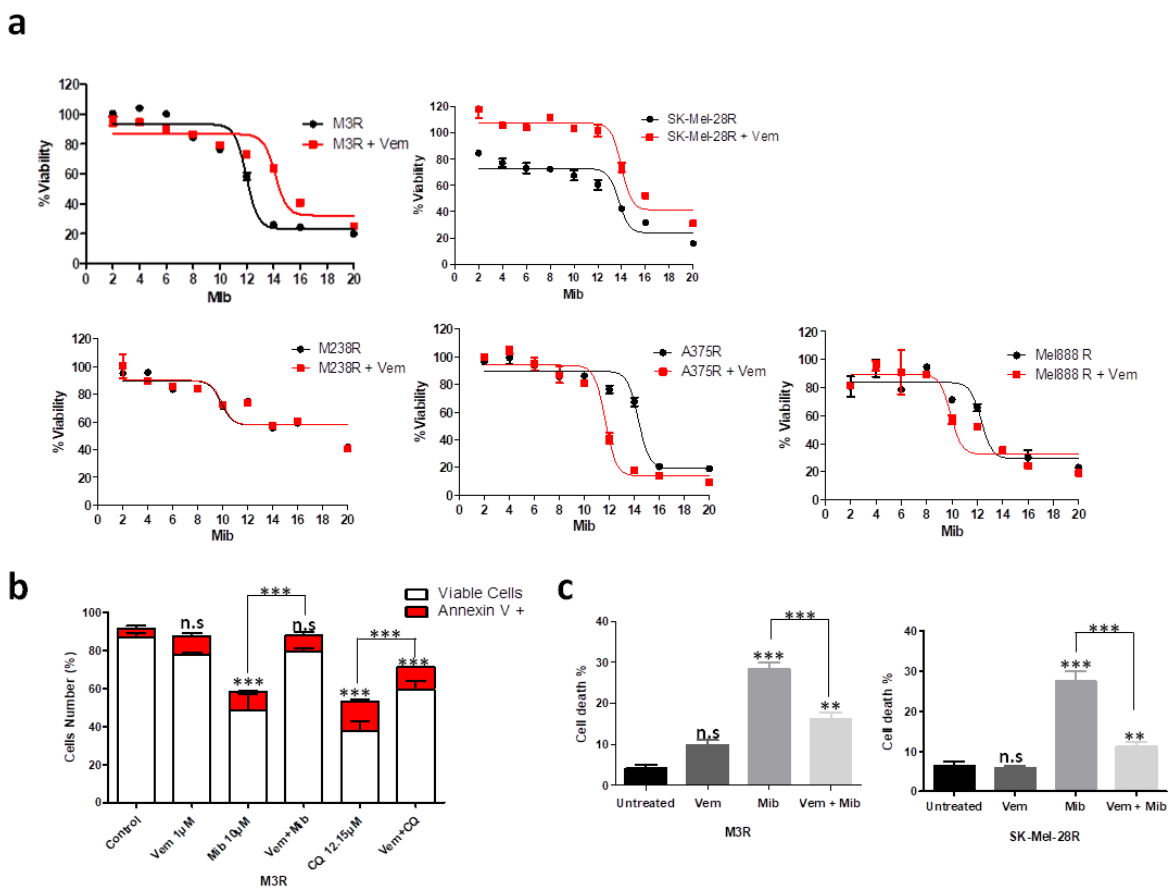


Figura 76. El bloqueig de l'autofàgia disminueix la mort cel·lular en combinació amb Vemurafenib en algunes línies cel·lulars de melanoma resistents. a) Anàlisi de la concentració inhibidòria (IC50) de Mibefradil a les 24 hores en les línies cel·lulars M3, M338, A375 i Mel888 i les resistents corresponents després d'un pre-tractament amb Vem de 48 hores. Per analitzar l'apoptosi vam realitzar b) Assaig d'Annexin V i c) Assaig d'exclusió de Blau de Tripà per explicar les cèl·lules apoptòtiques i el percentatge de mort cel·lular després dels tractaments. $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$; n.s, no significatiu, van ser determinats per els test ANOVA, seguit de la prova de comparació múltiple de Bonferroni.**

En conclusió, les teràpies combinades que indueixen un manteniment de la viabilitat en algunes línies cel·lulars resistents a Vemurafenib (M3R i Sk-Mel-28R), presenten una disminució significativa de la mort cel·lular sota el doble tractament en comparació amb el tractament amb monoteràpia, Mib o CQ, en aquestes mateixes línies (Figura 76b-c).

Resultats

Per altra banda, amb l'objectiu de determinar si la teràpia combinada bloqueja l'autofàgia, es van analitzar els nivells de p62 i LC3II per WB en totes les línies cel·lulars sensibles i resistents, i en tots els casos es va observar un increment d'ambdós marcadors autofàgics tant amb el tractament amb monoteràpia com també amb el doble tractament (Figura 77).

a

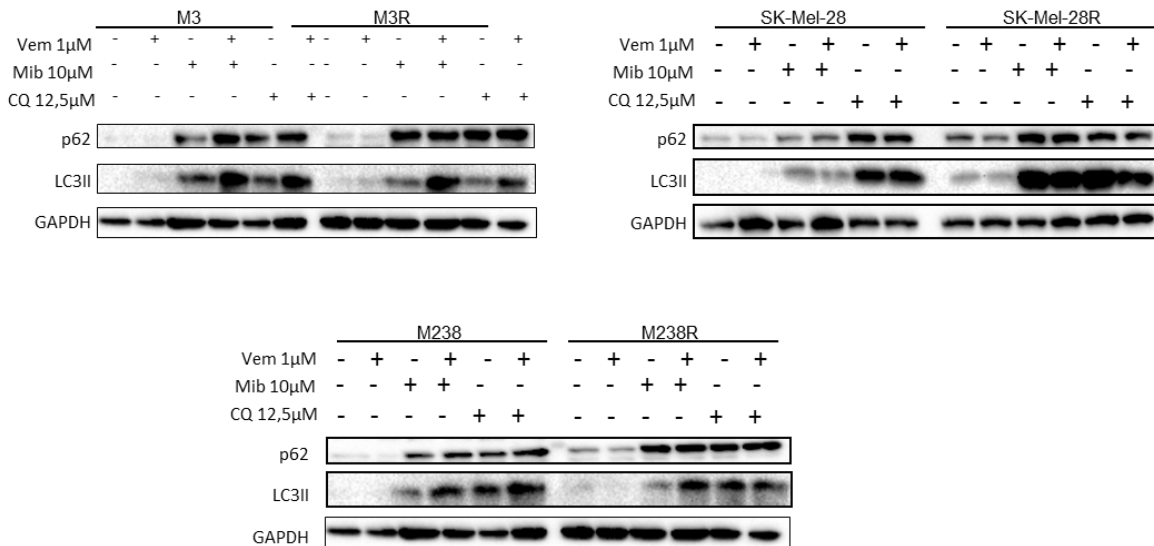


Figura 77. Les teràpies combinades bloquegen l'autofàgia de les línies de melanoma basals i resistents. a) Anàlisi de P62 i LC3II per WB després del tractament amb Vem (1 μ M) durant 48h i/o amb Mibefradil (10 μ M) i CQ (12,5 μ M) durant 24h.

Tot plegat, aquestes dades suggereixen que malgrat que l'autofàgia estigui bloquejada de forma efectiva per l'acció dels fàrmacs (Mibefradil o Cloroquina), les teràpies combinades amb Vemurafenib podrien restaurar parcialment la viabilitat i la mort cel·lular en alguns melanomes resistents a Vemurafenib.

El bloqueig dels TTCCs afecta a la migració i la invasió de les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} resistents i recupera les taxes de migració en línies cel·lulars específiques en combinació amb Vemurafenib.

En concordança amb la nostra línia d'estudi, el següent punt va ser avaluar l'efecte del bloqueig dels TTCCs sobre la migració i la invasió cel·lular en cèl·lules de melanoma resistents, com a processos clau en la metàstasi del melanoma (Paluncic et al. 2016). Per a aquests experiments, les cèl·lules de melanoma es van plantar al 100% de confluència per prevenir la mort cel·lular amb els tractaments utilitzats.

Tal i com es podia predir, el tractament amb Vemurafenib reduïa la migració cel·lular en totes les cèl·lules de melanoma sensibles, però aquest efecte no es produïa en les línies resistents al fàrmac (Figura 78).

Per altra banda, el tractament amb Mibefradil inhibia la migració cel·lular no només en les cèl·lules sensibles BRAF^{V600E}, tal com s'esperava (Maiques et al. 2018), sinó també en totes les cèl·lules de melanoma resistents. Per contra, la teràpia combinada reduïa el percentatge de cicatrització de la ferida en les línies cel·lulars resistents M238R, A375R i Mel888R, però va mantenir el tancament de la ferida en altres línies (M3R i SK-mel-28R) en comparació amb la monoteràpia (Mib) (Figura 78). Aquests resultats corroboren els obtinguts amb els assajos de viabilitat i mort cel·lular (Figura 75 i Figura 76).

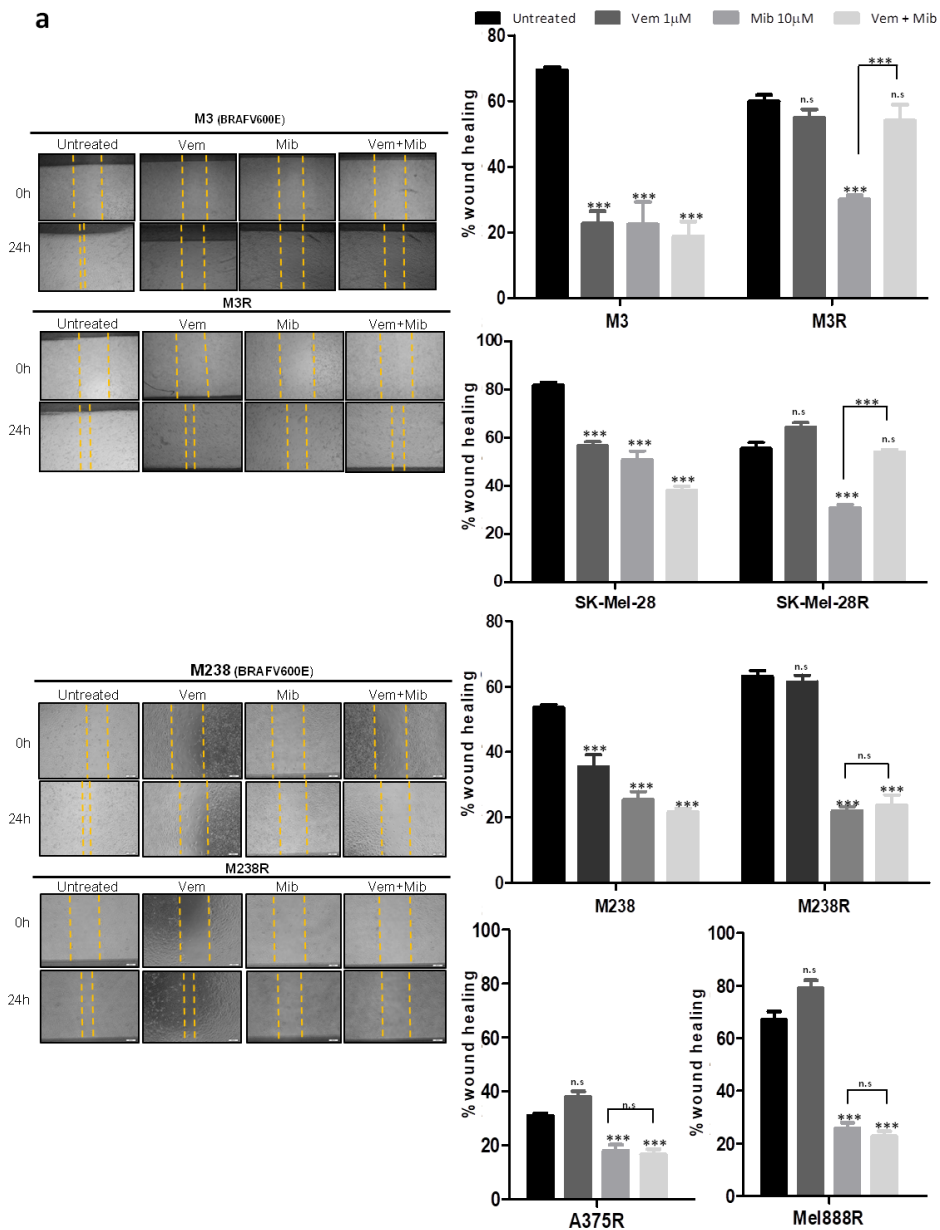


Figura 78. El bloqueig dels TTCCs afecta a la migració de les cèl·lules de melanoma resistents i restaura les taxes de migració en línies cel·lulars específiques en combinació amb Vemurafenib. a) Imatges i gràfics representatius de l'assaig de wound healing de les línies cel·lulars M3 i M238 i les seves Vem-R corresponents tractades amb 48h de Vem (1µM) i/o Mib (10µM) durant 24 hores. Els panells situats a la dreta de cada línia cel·lular representen el percentatge de tancament de la ferida com a resultat de com a mínim tres experiments independents. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant un Two-Way ANOVA, seguit del test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu).

A continuació, per tal d'avaluar l'efecte de la inhibició farmacològica de l'autofàgia sobre la migració de les cèl·lules de melanoma resistents, totes les línies cel·lulars van ser sotmeses a CQ sola o en combinació amb Vemurafenib. Els resultats indicaven que el bloqueig de l'autofàgia també disminuïa la migració cel·lular en totes les línies cel·lulars resistents, però quan la CQ es combinava amb Vemurafenib es recuperava el percentatge de tancament de la ferida en les mateixes línies cel·lulars resistents que ho feia el tractament Mib+Vem (M3R i SK-mel-28R) (Figura 79).

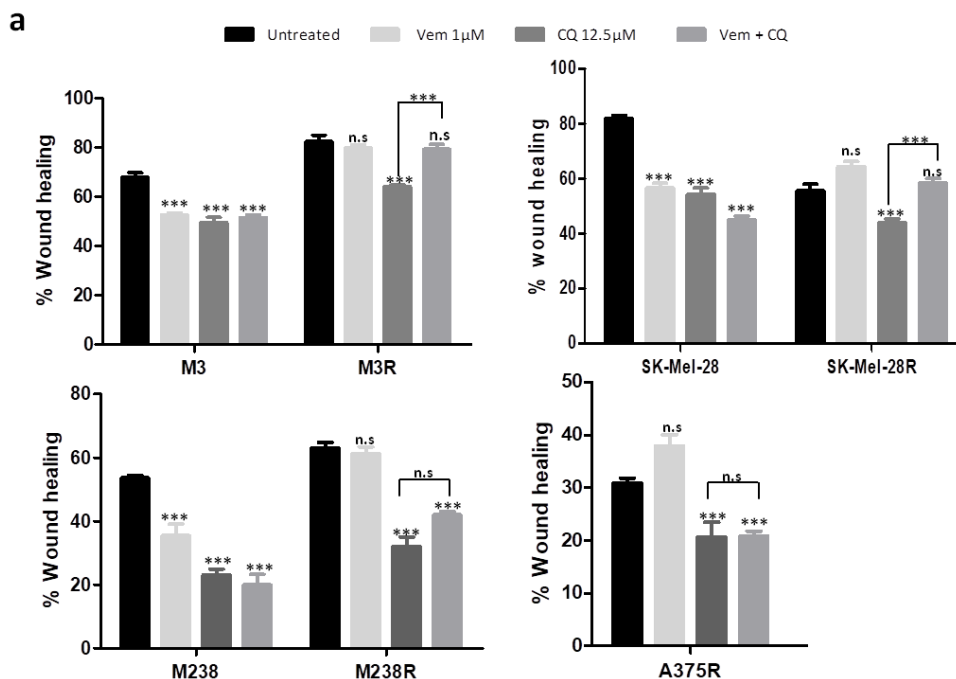


Figura 79. El bloqueig de l'autofàgia afecta a la migració de les cèl·lules de melanoma resistents i manté les taxes de migració en línies cel·lulars específiques en combinació amb Vemurafenib. a) Imatges i gràfics representatius de l'assaig de wound healing de les línies cel·lulars M3 i M238 i les seves Vem-R corresponents tractades amb 48h de Vem (1µM) i/o CQ (25µM) durant 24 hores. Els panells situats a la dreta de cada línia cel·lular representen el percentatge de tancament de la ferida com a resultat de com a mínim tres experiments independents. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un Two-Way ANOVA, seguit del test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$; n.s, no significatiu).**

En la mateixa línia, tant en l'assaig de *single cell* que avalua la migració de les cèl·lules individuals com en l'assaig d'invasió per *Transwell*, la teràpia combinada (Vem+Mib) mantenia tant la velocitat migratòria com la distància acumulada (figura 80a), i el percentatge de cèl·lules invasives (figura 80b) en cèl·lules M3R en comparació amb el tractament amb Mibefradil en monoteràpia. Aquests

Resultats

resultats mostren que el bloqueig de l'autofàgia també redueix les taxes de migració individualitzada i invasió en les línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E} resistents a BRAFi i recupera aquest fenomen quan es combina amb Vemurafenib en algunes línies resistents específiques (M3R i Sk-Mel-28R).

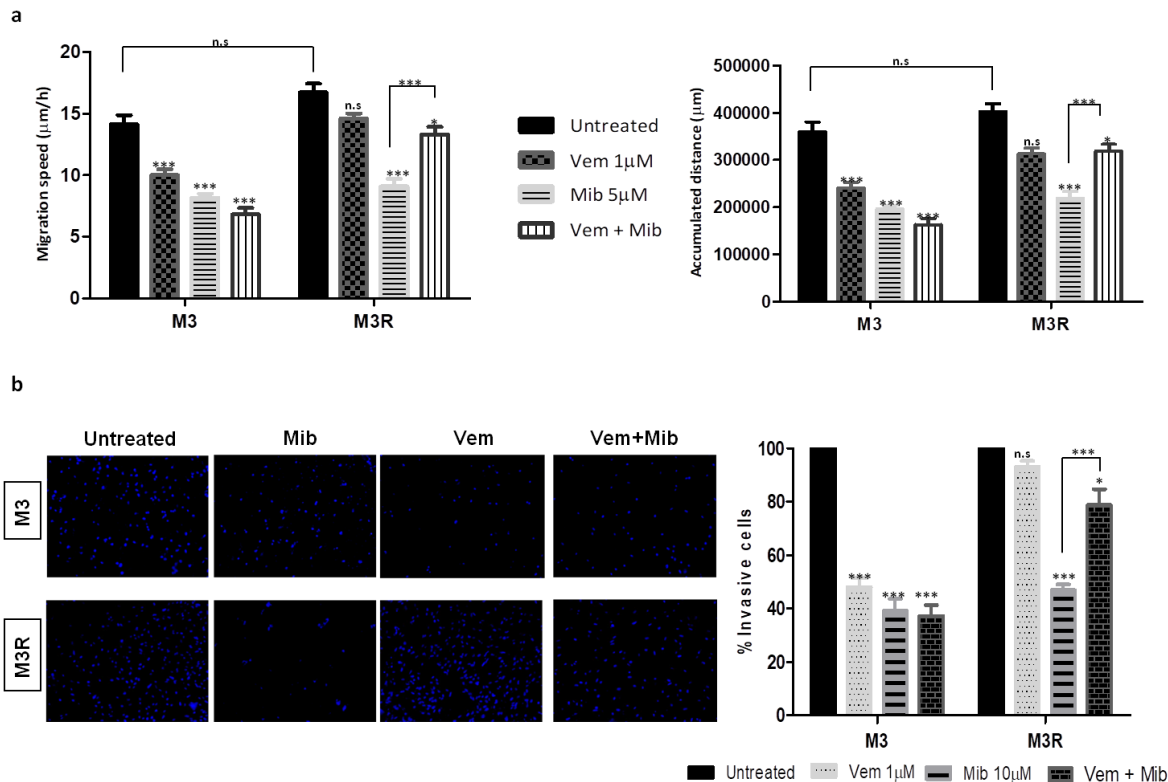


Figura 80. El bloqueig dels TTCCs afecta la migració individualitzada i la invasió de les cèl·lules de melanoma resistents i restableix les taxes d'invasió en línies cel·lulars específiques en combinació amb Vemurafenib a) L'anàlisi de seguiment de cèl·lules es va dur a terme durant 24 hores a una velocitat de 1 marc per 20 minuts. La velocitat de migració ($\mu\text{m} / \text{h}$) i la longitud acumulada total migrada (μm) de les cèl·lules tractades i no tractades es van analitzar en cèl·lules M3 i M3R. b) Imatges representatives de tinció nuclear de Hoechst de les línies cel·lulars M3 i M3R després del canvi de cotó (camp microscòpic x10) i percentatge (%) de les cèl·lules que van envair el matrigel després del tractament amb Vem i/o Mib en comparació amb el control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n., no significatiu, van ser determinats mitjançant un Two-Way ANOVA, seguit del test post hoc de Bonferroni.

L'expressió de mRNA de Cav3.1 s'incrementa en cèl·lules de melanoma resistent a Vemurafenib quan PTEN no és funcional.

PTEN és un gen supressor tumoral que inhibeix la via PI3K en condicions normals (Wu et al. 2003). Com s'ha comentat, el 20-30% dels melanomes presenten pèrdua de funció de PTEN (Wu et al. 2003), ja sigui per mutació o deleció. A més, aquesta pèrdua de funció de PTEN és mútuament exclouent de les mutacions NRAS i coexisteix amb la mutació de BRAF (Manzano et al. 2016). Per estudiar si els mecanismes d'adquisició de la resistència a Vemurafenib en cèl·lules de melanoma depenen de l'estat funcional de PTEN, primer vam comprovar l'expressió d'aquest supressor tumoral en totes les línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E}. Segons el publicat en la literatura, tres de les nostres línies cel·lulars tenen PTEN WT (M238, A375, Mel888), mentre que tres línies no expressen PTEN o el tenen mutat, és a dir, no funcional (M3 i M249 amb pèrdua PTEN, SK-Mel-28 amb mutació en PTEN) (Zuo et al. 2018). El nivell proteic de PTEN en aquestes línies cel·lulars va ser confirmat mitjançant WB (Figura 81a).

Després del tractament amb Vemurafenib de les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E}, es va observar una disminució significativa de p-ERK en les cèl·lules de melanoma sensibles. Al contrari, el tractament amb Vemurafenib en les línies cel·lulars resistent mantenia els nivells proteics de p-ERK, representant una major activació de la via ERK en els melanomes resistent a Vemurafenib (Lidsky et al. 2014; Das Thakur et al. 2013; Villanueva et al. 2010) (Figura 81b). Aquests resultats indiquen que el Vemurafenib inhibeix la senyalització de les MAPKs en cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} sensibles i, per tant, inhibeix la proliferació cel·lular en aquestes línies cel·lulars (Su et al. 2012). Els nivells de proteïna p-AKT es trobaven incrementats amb el tractament amb Vemurafenib tant en cèl·lules sensibles com en resistent (Figura 81b). Aquestes dades indiquen que l'activació de la resistència a Vemurafenib pot estar determinada per un alt nivell d'AKT fosforilat (p-AKT) en les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} (Luo et al. 2016).

Resultats

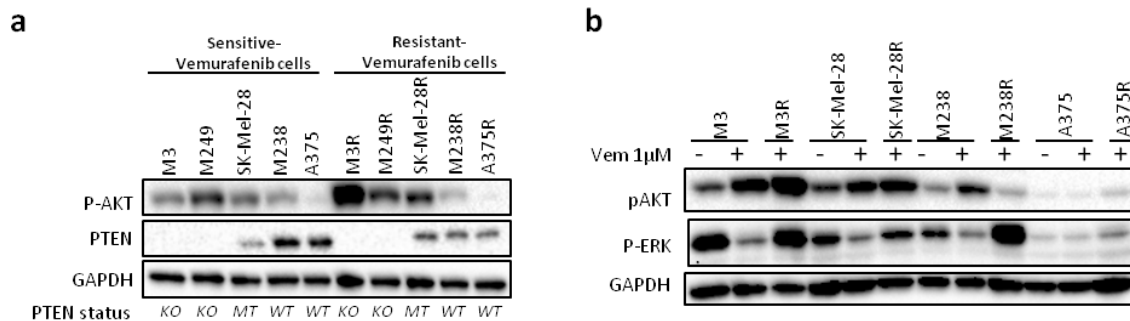


Figura 81. Expressió de PTEN en les línies de melanoma sensibles i resistents a Vemurafenib. a) WB dels nivells de PTEN en tot les línies de melanoma sensible i resistents. b) Anàlisi dels nivells proteics per WB de p-AKT i p-ERK en totes les línies de melanoma tractades amb o sense Vemurafenib (1µM, 48h).

A continuació, es va voler estudiar si l'expressió del TTCC Cav3.1 tenia alguna correlació amb l'estat funcional de PTEN en les nostres línies cel·lulars de melanoma. Per això, es van analitzar i comparar els nivells de mRNA de Cav3.1 entre els dos grups de línies de melanoma segons l'estat de PTEN (PTEN WT vs PTEN KO/mutat). Els resultats obtinguts representats en la figura 82a mostren un increment significatiu dels nivells de mRNA de Cav3.1 en les cèl·lules de melanoma resistents a Vemurafenib amb PTEN KO/mutat, en comparació amb el grup PTEN WT.

Llavors, amb l'objectiu d'investigar si PTEN podria modular l'expressió dels TTCCs en cèl·lules de melanoma resistents, en primer lloc vam sobreexpressar PTEN, mitjançant infecció lentiviral, en una línia cel·lular de melanoma sensible amb PTEN deletat (M3). Una vegada aconseguida aquesta línia estable, vam generar-ne la línia resistent a BRAFi (Vem) (Figura 82b). A continuació, vam procedir a analitzar els transcrits de Cav3.1 després de la sobreexpressió de PTEN. Els resultats van indicar que la sobreexpressió de PTEN a la línia resistent (M3R OE PTEN) augmentava els nivells de mRNA de Cav3.1 en comparació amb la línia sensible amb PTEN no funcional (M3) (Figura 82c), però mostrava una disminució de l'expressió de Cav3.1 quan es va comparar amb les cèl·lules resistents amb PTEN *knockout* (M3R) (Figura 82c).

De forma complementària, es va realitzar l'shRNA de PTEN a una línia sensible amb PTEN WT (A375). De nou, després de generar la línia estable amb el silenciament gènic de PTEN es va crear la resistència al BRAFi (Figura 82d). Seguidament, es van analitzar els nivells de mRNA de l'isoforma Cav3.1 dels TTCCs mitjançant RT-qPCR. Els resultats obtinguts indicaven una sobrerregulació dels nivells de Cav3.1 en la línia A375R amb l'shRNA-PTEN en comparació amb la línia parental, però també respecte l'A375R PTEN WT (Figura 82e), corroborant els nostres resultats previs.

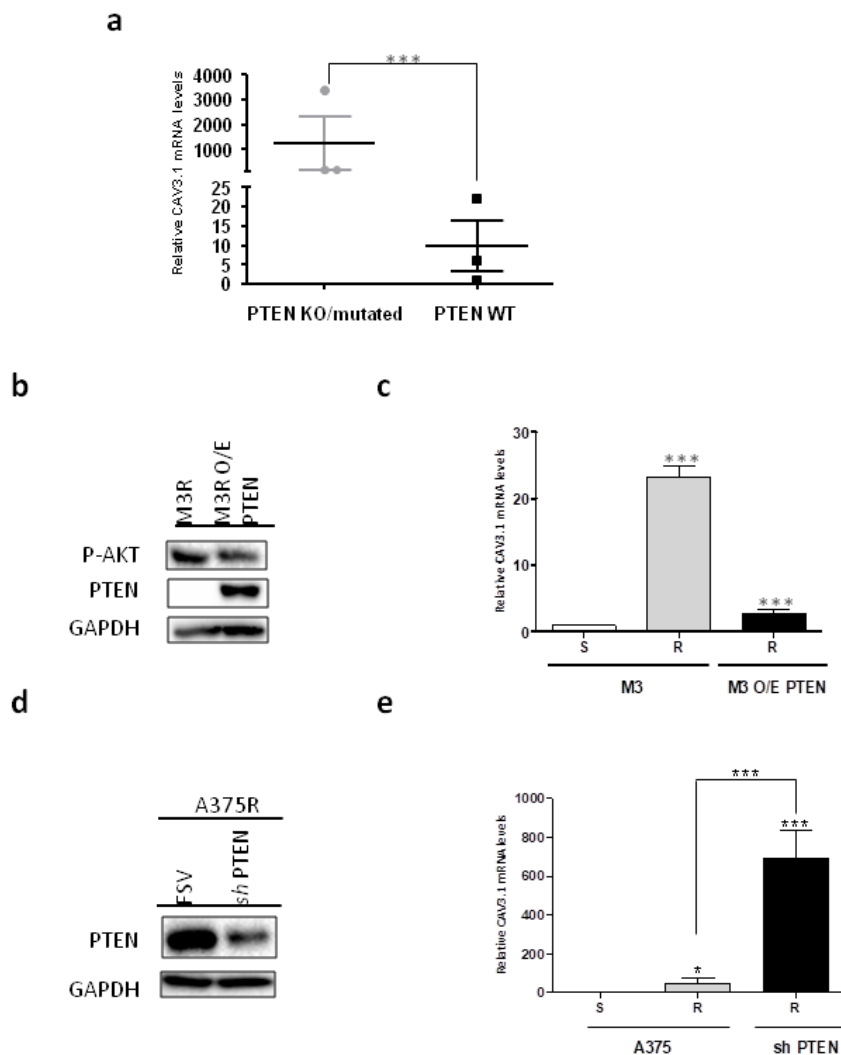


Figura 82. Increment dels nivells de TTCC Cav3.1 en les línies resistents amb PTEN no funcional (pèrdua o mutació). a) Nivells de mRNA de PTEN en les línies resistents segons PTEN KO/mutat o PTEN WT. b) Anàlisi de PTEN per WB en les línies GFP-PTEN vs GFP-vector resistents a Vemurafenib. c) qRT-PCR de Cav3.1 en la M3 sensible, la M3R resistent i la resistent amb sobreexpressió de PTEN (M3R OE PTEN). L'expressió de GAPDH es va utilitzar per normalitzar els nivells. d) Anàlisi de PTEN per WB en les cèl·lules A375R amb l'shRNA de PTEN vs el vector buit resistents a Vemurafenib. e) qRT-PCR de Cav3.1 en la A375 sensible, la A375R resistent i A375R shRNA PTEN. L'expressió de GAPDH es va utilitzar per normalitzar els nivells. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s., no significatiu, es van determinar mitjançant (a) la prova de Mann Whitney o (c,e) la prova one-way ANOVA, seguida del test post hoc de Bonferroni.

Resultats

L'expressió de PTEN determina la viabilitat i migració/invasió de les línies cel·lulars de melanoma resistents a Vemurafenib en combinació amb Mibefradil.

En primer lloc, vam procedir a investigar si PTEN participa en la viabilitat cel·lular i en el procés de migració/invasió durant la modulació del flux autofàgic. Com observem en la figura 83, les cèl·lules sobreexpressades amb PTEN i resistents redueixen la viabilitat cel·lular (Figura 83a), la taxa de migració (Figura 83b) i la invasió (Figura 83c) quan l'autofàgia estava bloquejada amb Mibefradil, però també amb la teràpia combinada (Vem+Mib) (Figura 83d), en concordança amb els resultats obtinguts amb les altres línies cel·lulars (M238R, A375R, Mel88R) amb PTEN WT funcional.

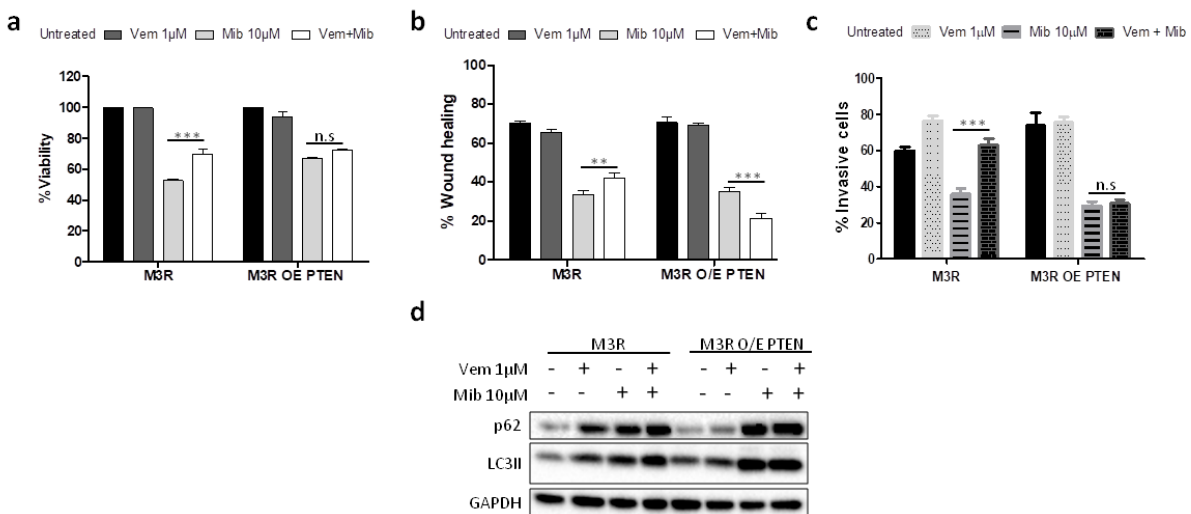


Figura 83. La sobreexpressió de PTEN en la creació de línies resistents a Vemurafenib redueix la viabilitat i la migració/invasió cel·lular en la teràpia combinada (Vem + Mib). Assajos de a) wound healing, (b), single cell (c) invasió transwell en les línies resistents amb sobreexpressió de PTEN vs les cèl·lules controls (vector) després del tractament amb Vem (1µM, 48h), Mib 10µM (a,c) or 5µM(b) i Vem+Mib durant 24h. b) Analysis de p62 i LC3II per WB després del tractament amb Vem (1µM, 48h) i/o amb Mib (10µM, 24h) en les M3R GFP-vector i M3R GFP-PTEN. La GAPDH s'ha utilitzat com a control de càrrega. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu, es van determinar mitjançant el test Two-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni.

Paral·lelament, es va procedir a avaluar la migració en les cèl·lules resistents silenciades genèticament amb l'shRNA de PTEN. En la figura 84 es pot observar que amb tal silenciament la migració cel·lular sota el tractament amb la doble teràpia incrementava la taxa de tancament de la ferida respecte la monoteràpia amb Mibefradil (Figura 84).

Aquests resultats suggereixen que l'estat de PTEN podria tenir un paper important en el mecanisme de resistència en les cèl·lules de melanoma a més de modular la resposta de les cèl·lules a la teràpia combinada de Vemurafenib i Mibefradil durant el procés de migració/invasió (Dankort et al. 2009; Lin et al. 2010).

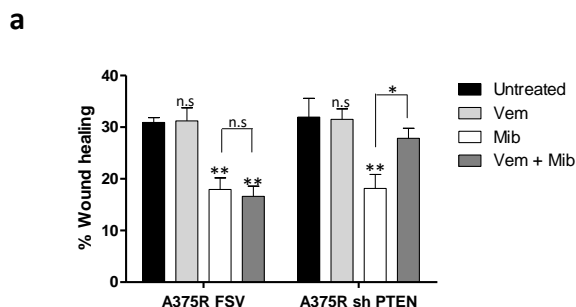


Figura 84. El silenciament gènic de PTEN en la creació de línies resistents a Vemurafenib recupera la migració cel·lular en la teràpia combinada (Vem + Mib). Assaig de a) wound healing en les línies resistents A375R amb shRNA de PTEN respecte les cèl·lules control després del tractament amb Vem (1 μ M, 48h), Mib 10 μ M) i Vem+Mib durant 24h. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu, es van determinar mitjançant el test Two-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni.

El tractament combinat de Vemurafenib i Mibefradil retarda la mort cel·lular i la inhibició del creixement tumoral *in vivo* quan PTEN no és funcional.

En un intent per aclarir si el restabliment de la viabilitat cel·lular durant el tractament combinat en les cèl·lules resistents amb PTEN mutat (M3R) era degut a una recuperació del fenotip o simplement a un retard de la mort cel·lular, es va realitzar un assaig de viabilitat dels tractaments farmacològics utilitzats al llarg del temps. Com observem en la figura 85, les cèl·lules resistents PTEN KO (M3R) mantenen la viabilitat cel·lular durant les primeres 24-48 hores del tractament combinatori (Vem+Mib) respecte a la monoteràpia (Mib), fet que no s'observa en les cèl·lules resistents sobreexpressades amb PTEN (M3R OE PTEN) ni com ja havíem demostrat, en la M3 sensible al fàrmac. No obstant això, els resultats van determinar que la viabilitat cel·lular es retardava en el temps, ja que a les 96 hores després del tractament amb la teràpia combinada es va acabar produint una disminució de la viabilitat cel·lular quasi completa en totes les línies estudiades, de la mateixa manera que succeeix sota el tractament amb la monoteràpia (Mib). Aquests resultats ens suggereixen que la teràpia combinada activa un retard en la viabilitat de les cèl·lules de melanoma resistents a Vemurafenib que presenten una disfunció de PTEN.

Resultats

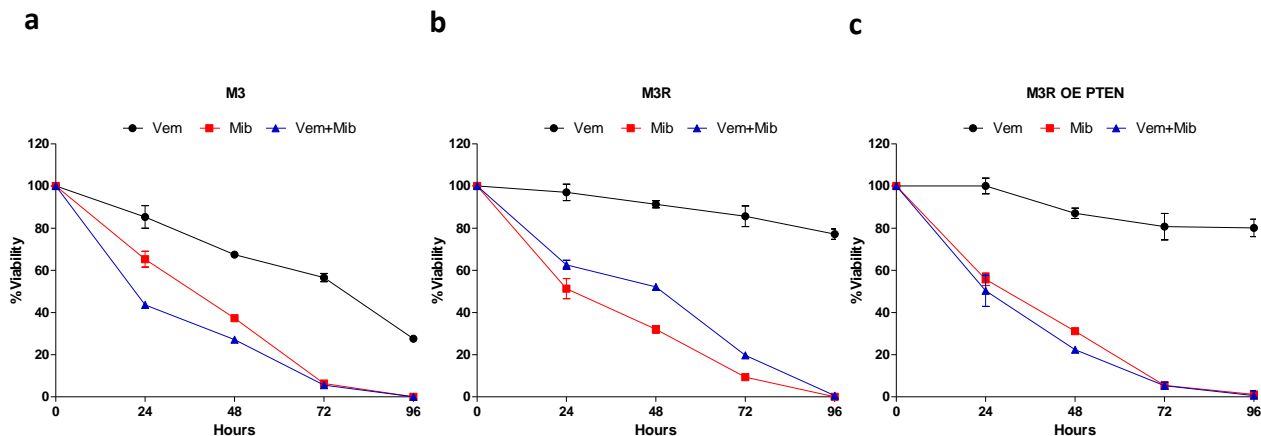


Figura 85. La teràpia combinada activa un retard en la viabilitat de les cèl·lules que presenten una deleció o mutació de PTEN. Corba de viabilitat a diferents hores dels tractaments amb Vem (1 μM, 48h), Mib 10 μM i Vem+Mib durant 24h en les línies cel·lulars M3, M3R i M3R amb sobreexpressió de PTEN. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un Two-Way ANOVA, seguit del test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu).

A continuació, es va tractar d'analitzar l'efecte del tractament combinat (Vem+Mib) sobre el creixement tumoral *in vivo* utilitzant models de *xenografts*. Vam injectar cèl·lules Sk-Mel-28R subcutàniament en ratolins SCID. Aproximadament 17 dies després del trasplantament, vam administrar diàriament per via oral Vemurafenib i/o Mibefradil durant dues setmanes i vam mesurar el volum tumoral cada dos dies fins al final de l'experiment (15 dies). Els resultats van mostrar que els tumors dels ratolins tractats amb Vemurafenib van créixer de manera similar al grup control (vehicle) i el tractament amb Mibefradil va reduir significativament el creixement tumoral, tal com s'esperava. Pel que fa a la teràpia combinada, no es van observar diferències significatives en el creixement del tumor durant la primera setmana de tractament en comparació amb els tumors tractats amb Vemurafenib, corroborant els resultats *in vitro* a temps curts. Tot i així, amb el tractament combinat a temps més llargs es va observar una inhibició del creixement tumoral, similar a la observada en els tumors tractats amb monoteràpia (Mibefradil), per tant sense presentar un efecte de sinèrgia (Figura 86a).

A més, els tumors tractats amb Mibefradil en monoteràpia o en combinació amb Vemurafenib van mostrar una major immunoexpressió de LC3 en comparació amb els controls (Figura 86b). Aquests resultats reforcen els descrits anteriorment *in vitro* (Figura 85). En resum, els resultats obtinguts posen de manifest que el bloqueig dels TTCCs, en monoteràpia o en combinació amb Vemurafenib,

inhibeix l'autofàgia i redueix la proliferació i el creixement tumoral del melanoma en models de *xenografts in vivo*.

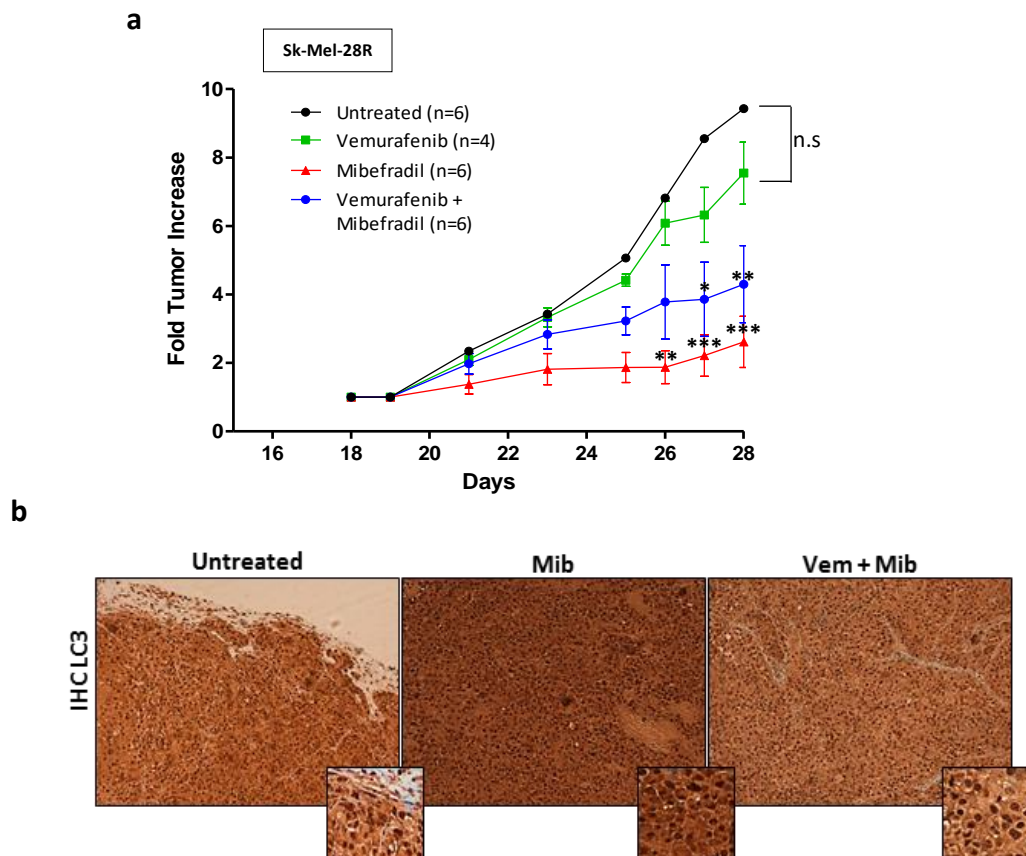


Figura 86. El Mibefradil en monoteràpia o en combinació amb Vemurafenib inhibeix la progressió tumoral del melanoma resistent *in vivo*. **a)** Eficàcia *in vivo* (Fold tumor increase) de la teràpia combinada durant 15 dies per via oral de Vem (50mg/kg) i/o Mib (25mg/kg) en xenografts de Sk-Mel-28R. **b)** IHC de LC3 dels xenografts subcutanis de ratolí de la línia Sk-Mel-28R. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu, es van determinar mitjançant el test Two-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni.

Resultats

El Mibefradil impedeix l'adquisició de resistència a Vemurafenib en cèl·lules de melanoma

BRAF^{V600E}.

Finalment, vam voler crear una línia resistent al tractament combinatori (Vem+Mib) a partir d'una línia cel·lular sensible, la M3. Així, les cèl·lules M3 es van exposar a les drogues corresponents (Vem, Mib, o Vem+Mib) i vam anar tractant-les amb els fàrmacs cada 3-4 dies. A més, vam comptar el nombre de cèl·lules vives, durant els intervals de temps que es mostren a la figura 87a.

Com ens mostren els resultats, al voltant de 30-60 dies després del tractament amb els diferents fàrmacs, les cèl·lules es van anar fent resistents al tractament amb Vemurafenib i van començar a créixer lentament. No obstant, cap cèl·lula sota el tractament combinatori (Vem+Mib) va sobreviure, per tant no vàrem poder obtenir cap clon resistent. L'experiment es va repetir gairebé 5 vegades, però amb les nostres mans, no vam aconseguir en cap cas una resistència ni a la teràpia combinada ni tampoc al tractament amb monoteràpia amb Mibefradil (Figura 87a-b).

Aquests resultats podrien suggerir que la inhibició dels TTCCs podria ser una estratègia per evitar l'adquisició de resistència a Vemurafenib en les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E}.

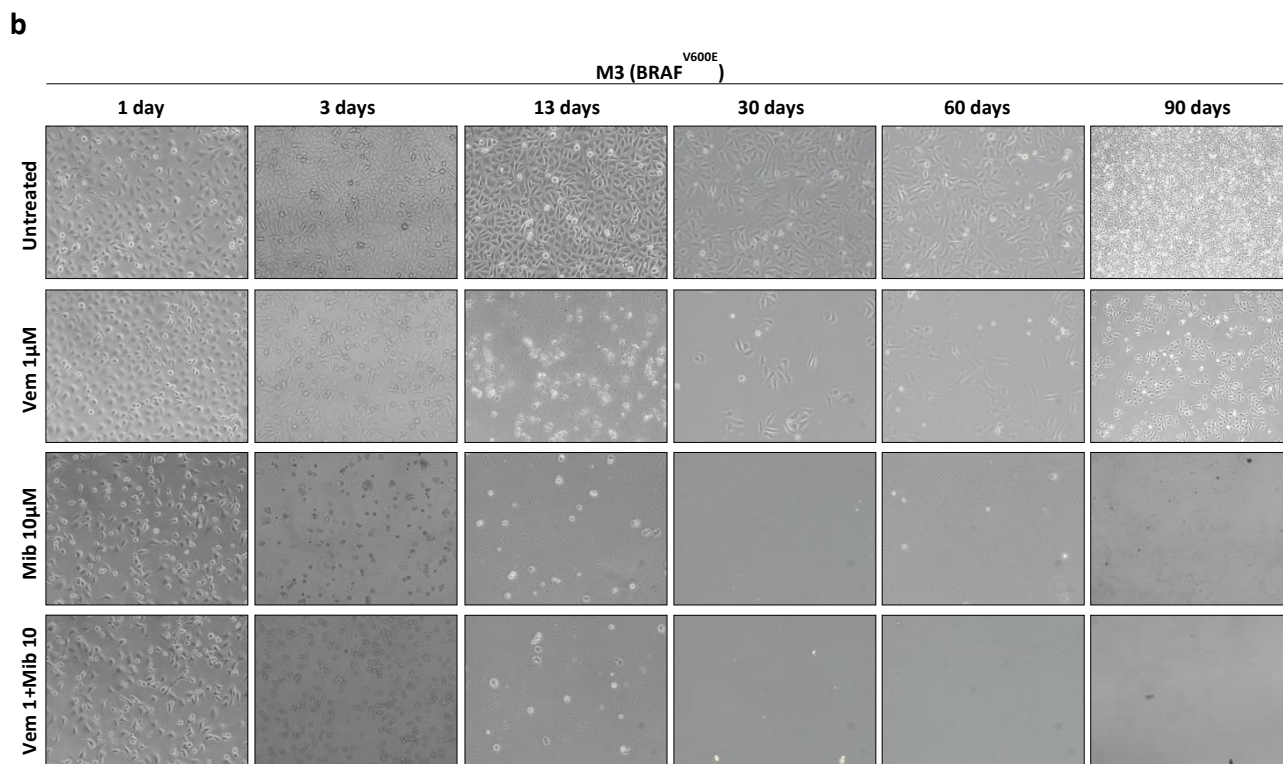
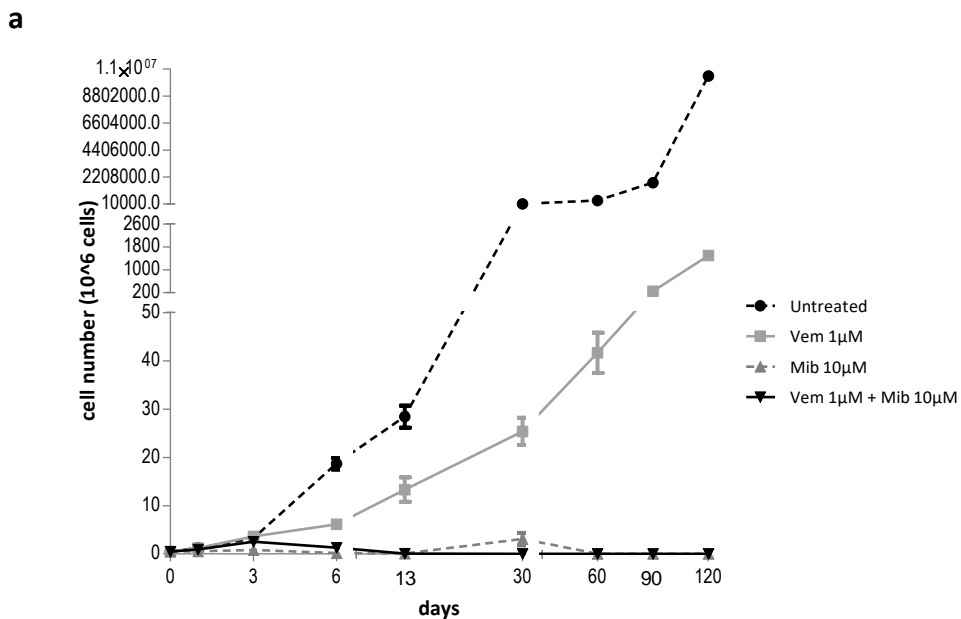


Figura 87. El Mibefradil en combinació amb Vemurafenib inhibeix l'adquisició de resistència als fàrmacs en el melanoma BRAF^{V600E}. Corba de proliferació (Nombre de cèl·lules) de la línia cel·lular parental (M3) sota el tractament amb Vem(1µm), Mib (10µM) i teràpia combinada durant 90 dies. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu, es van determinar mitjançant el test Two-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni.

Resultats

En conclusió, en aquest treball vam verificar que tant les cèl·lules com les biòpsies de melanoma BRAF^{V600E} resistents a Vemurafenib expressaven nivells majors de TTCC Cav3.1 en comparació amb les parentals respectives, i a més, presentaven un increment de l'autofàgia basal. Tant l'inhibidor dels TTCCS, Mibefradil, com la Cloroquina, inhibien de forma efectiva l'autofàgia en totes les línies cel·lulars BRAF^{V600E} resistents al inhibidor de BRAF, Vemurafenib, així com en *xenografts* de ratolí *in vivo*, i produïen una disminució tant de la viabilitat cel·lular com de la seva capacitat de migració i invasió i del creixement tumoral en models murins *in vivo*.

Pel que fa a la teràpia combinada (Vem+Mib), no es va demostrar una acció additiva o sinèrgica de la mateixa en línies resistents a Vemurafenib. De forma sorprenent, però, vam demostrar que el tractament amb ambdós fàrmacs tenia un efecte diferencial en el comportament d'aquestes cèl·lules resistents i que depenia de l'estat funcional de PTEN. En aquest sentit, quan PTEN no és funcional, la teràpia combinada provocava un retard en la inducció de mort i la inhibició de la migració cel·lular en les línies resistents a Vemurafenib. A més, els nivells d'expressió del TTCC Cav3.1 eren significativament majors en les línies amb PTEN no funcional respecte les línies resistents que sí expressen PTEN. Així mateix, per una banda, el silenciament de PTEN produïa un increment de l'expressió del TTCC Cav3.1 i un manteniment de la capacitat de migració sota el tractament combinat (Vem+Mib). Per altra banda, amb la sobreexpressió de PTEN en cèl·lules PTEN KO, s'observava una disminució de l'expressió del TTCC Cav3.1 i una reducció de les taxes migratòries/invasives després de la teràpia combinada.

Finalment, vam demostrar que sota el bloqueig dels TTCCs no s'obtenen *in vitro* cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} resistents a Vemurafenib. En conjunt, els nostres resultats suggereixen que els TTCCs constitueixen dianes terapèutiques vàlides en línies de melanoma BRAF^{V600E} resistents a Vemurafenib. Aquests resultats estan enviats a una revista d'impacte en l'àmbit de la dermatologia oncològica i es troben a l'espera de ser publicats (ANNEX).

2. Estudi del secretoma de les línies cel·lulars de melanoma metastàtic BRAF^{V600E} resistents a Vemurafenib.

En el melanoma les cèl·lules veïnes, és a dir, les cèl·lules estromals, com els neutròfils, els macròfags i els fibroblasts, tenen una importància cabdal en una sèrie d'esdeveniments biològics de senyalització relacionats amb l'oncogènesi tals com la invasió i la migració tumoral. La secreció de molècules bioactives com ara factors de creixement i proteases, promouen el reclutament de les cèl·lules estromals per part de les cèl·lules tumorals per a participar en l'oncogènesi, conduint eventualment a la progressió i la difusió del tumor (Liberato et al. 2018; Rocco et al. 2011). Així, la manipulació terapèutica del microambient tumoral sembla ser un enfocament molt prometedor en la teràpia contra el càncer (Kupcova Skalnikova et al. 2017; Liberato et al. 2018).

Els melanomes BRAF^{V600E} resistents a Vemurafenib secreten citoquines que promouen l'adquisició de resistència a la teràpia amb inhibidors de BRAF.

Hi ha prou evidències que suggereixen que la resistència a la inhibició de BRAF no només està impulsada per mecanismes intratumorals, sinó també mitjançant la inducció d'un microambient tumoral immuno-supressor (Kodet et al. 2018; Menon and Schaidler 2015; Sandri et al. 2016). Per això, vam voler estudiar si l'adquisició de la resistència a Vemurafenib de les línies de melanoma utilitzades depenia únicament de la modulació de les vies de senyalització intrínseques o si el microambient tumoral (secretoma) també tenia un paper rellevant. Per a portar-ho a terme, en primer lloc es van anar recollint els sobrenadants de les línies de melanoma resistents (M.C líniaR) per utilitzar-los com a medi de cultiu sobre les cèl·lules parentals. A banda, també es van recollir els sobrenadants (medis condicionats, M.C línia) de les pròpies línies sensibles com a control per verificar que els medis no estaven obsolets (Figura 88).

Resultats

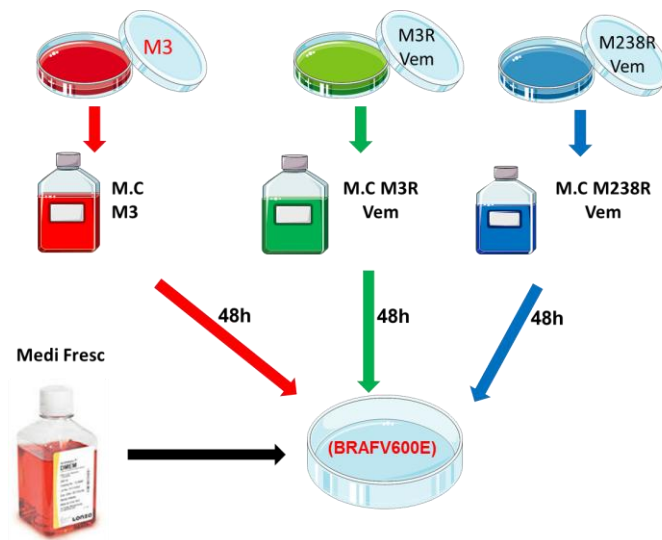


Figura 88. Representació gràfica del protocol de treball per a la recollida dels medis condicionats.

Llavors, vam cultivar les cèl·lules parentals (M3, M238, Sk-Mel-28, A375) amb el seu propi medi condicionat i amb el medi condicionat de les seves corresponents resistents. Seguidament, es va avaluar l'efecte de l'inhibidor de BRAF, Vemurafenib, sobre la viabilitat i la migració cel·lular mitjançant assajos MTT i de *wound healing*, respectivament.

Els resultats van mostrar que quan les cèl·lules sensibles es cultivaven amb el seu propi medi condicionat i sota el tractament amb Vemurafenib, la viabilitat i la migració cel·lular es veia reduïda de manera similar al que succeeix amb el medi de cultiu fresc. Sorprenentment, vam observar que quan les cèl·lules parentals es cultivaven amb medi condicionat procedent de la seva línia resistent (M.C líniaR) i es tractava amb Vemurafenib, mantenien la viabilitat cel·lular gairebé al 100% i es restablien les taxes migratòries, comportant-se com una línia resistent (Figura 89).

Aquestes troballes suggereixen que les línies cel·lulars sensibles a Vemurafenib cultivades amb medi condicionat de la línia resistent en combinació amb Vemurafenib es comporten com a línies cel·lulars resistents al fàrmac tant en termes de viabilitat cel·lular com de migració. Per tant, la secreció de les línies resistents condiciona el microambient tumoral i indueix resistència a la teràpia en les cèl·lules sensibles.

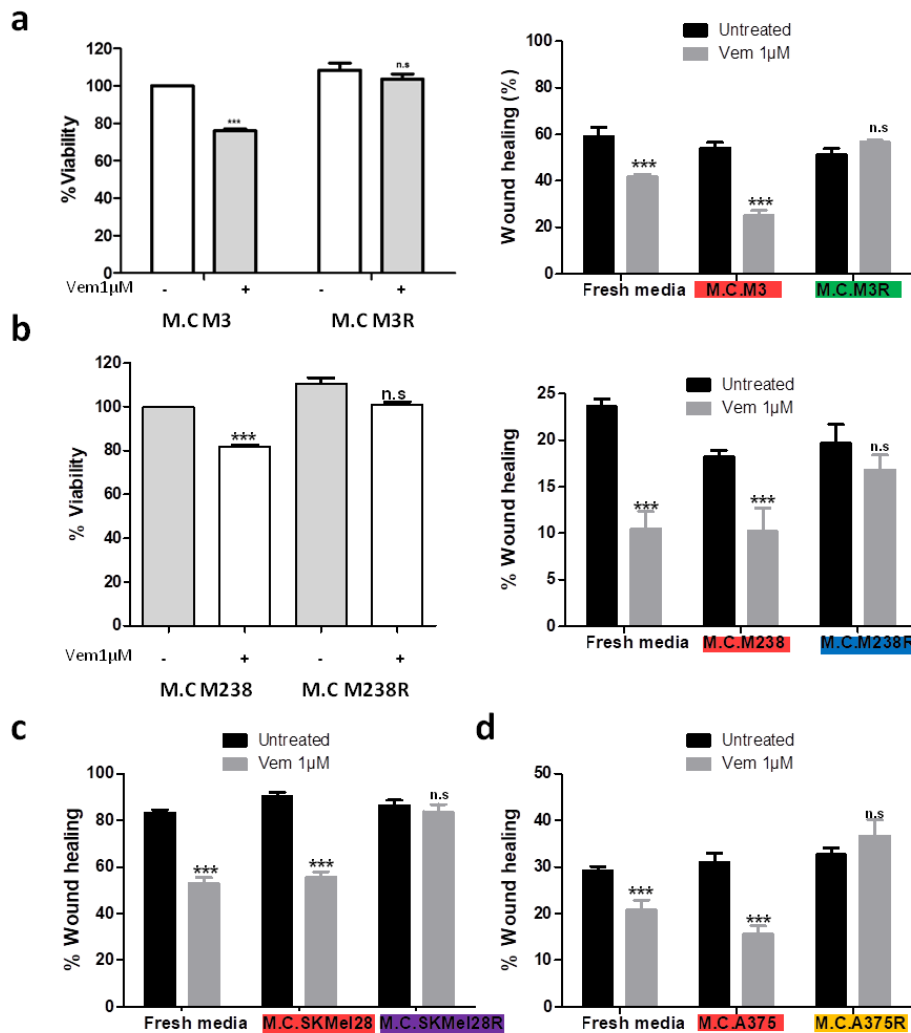


Figura 89. Efecte del secretoma en la viabilitat i migració cel·lular de les línies resistents a Vemurafenib sobre les línies parentals de melanoma. Assaig de viabilitat en cèl·lules (a) M3 i (b) M238 tractades amb medi condicionat (M.C) propi i procedent de la línia resistent tractades amb Vemurafenib (1µM,48h). Assaig de migració (wound healing) en (a) M3, (b), M238, (c) Sk-Mel-28 i (d) A375 després de cultivar les cèl·lules amb medi condicionat propi o procedent de la corresponent resistent amb Vemurafenib (1µM,48h). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu, es van determinar mitjançant el test Two-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni.

A continuació, vam procedir a investigar l'efecte dels medis condicionats i l'inhibidor de BRAF sobre la capacitat invasiva de les cèl·lules de melanoma. Per a realitzar l'assaig *Transwell* en aquest cas, les cèl·lules es van tripsinitzar i es van plantar en la part superior de la cambra del *Transwell* recoberta

Resultats

amb Matrigel en un medi sense sèrum. Com a quimioatraient (en la part inferior de la cambra), vam utilitzar 3 condicions diferents (Figura 90a):

- Medi fresc com a control positiu d'invasió
- Medi condicionat
- Medi condicionat en combinació amb Vemurafenib

En consonància amb els nostres resultats, el tractament de la línia sensible M3 amb el seu propi medi condicionat i Vemurafenib durant 48 hores inhibia la seva capacitat invasiva. De nou, les diferències no eren significatives quan es tractaven les cèl·lules M3 amb medi condicionat procedent de la línia resistent M3R en combinació amb Vemurafenib. Aquests resultats ens manifesten que la línia resistent a Vemurafenib secreta factors al medi que condicionen també la capacitat invasiva de la línia parental (Figura 90b).

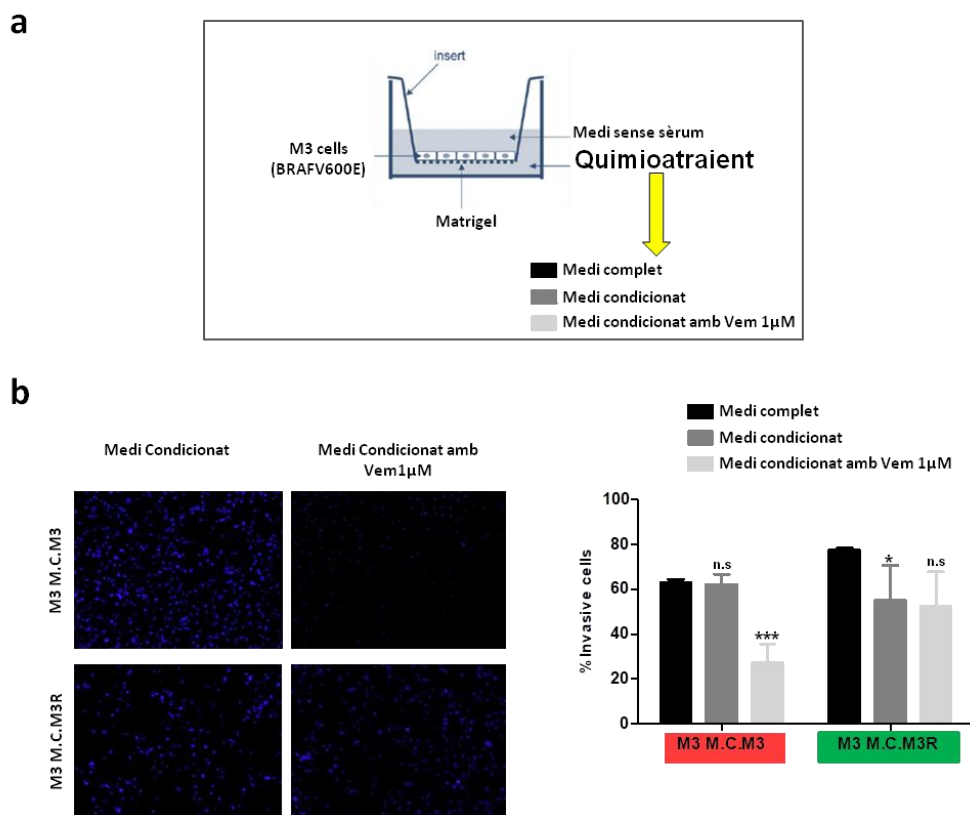


Figura 90. El secretoma de les cèl·lules M3R indueixen el procés d'invasió cel·lular sobre la línia M3 parental tractades amb Vemurafenib. a) Esquema representatiu de l'experiment d'invasió per Transwell. b)

*Imatges representatives de tinció nuclear de Hoechst de la línia cel·lular M3 (camp microscòpic x10) i percentatge (%) de les cèl·lules que van envair el matrigel després de cultivar-les amb medi condicionat propi o procedent de la corresponent resistent amb Vemurafenib (1µM,48h). * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; n.s, no significatiu, es van determinar mitjançant el test Two-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni.*

Per acabar de confirmar els resultats obtinguts anteriorment, es van utilitzar diferents combinacions entre medis condicionats procedents de línies resistents i cèl·lules parentals per tal de verificar si totes les línies cel·lulars sensibles a Vemurafenib adquirien la resistència a l'inhibidor de BRAF sota la influència del medi condicionat procedent de qualsevol línia resistent (Figura 91).

Els resultats mostren que ambdues línies cel·lulars parentals (M3 i M238) quan s'exposaven amb medi condicionat procedent de qualsevol línia sensible al fàrmac conjuntament amb Vemurafenib disminuïen la taxa de migració. Per contra, aquestes mateixes cèl·lules sotmeses a medi condicionat procedent de diferents línies resistents en combinació amb Vemurafenib mantenien els percentatges de migració, indicant de nou, que es feien resistents al fàrmac (Vem) (Figura 91).

En conjunt els resultats suggereixen que les línies resistents secreten factors determinants per a l'adquisició de resistència a la teràpia amb Vemurafenib (Menon and Schaidler 2015; Whipple and Brinckerhoff 2014).

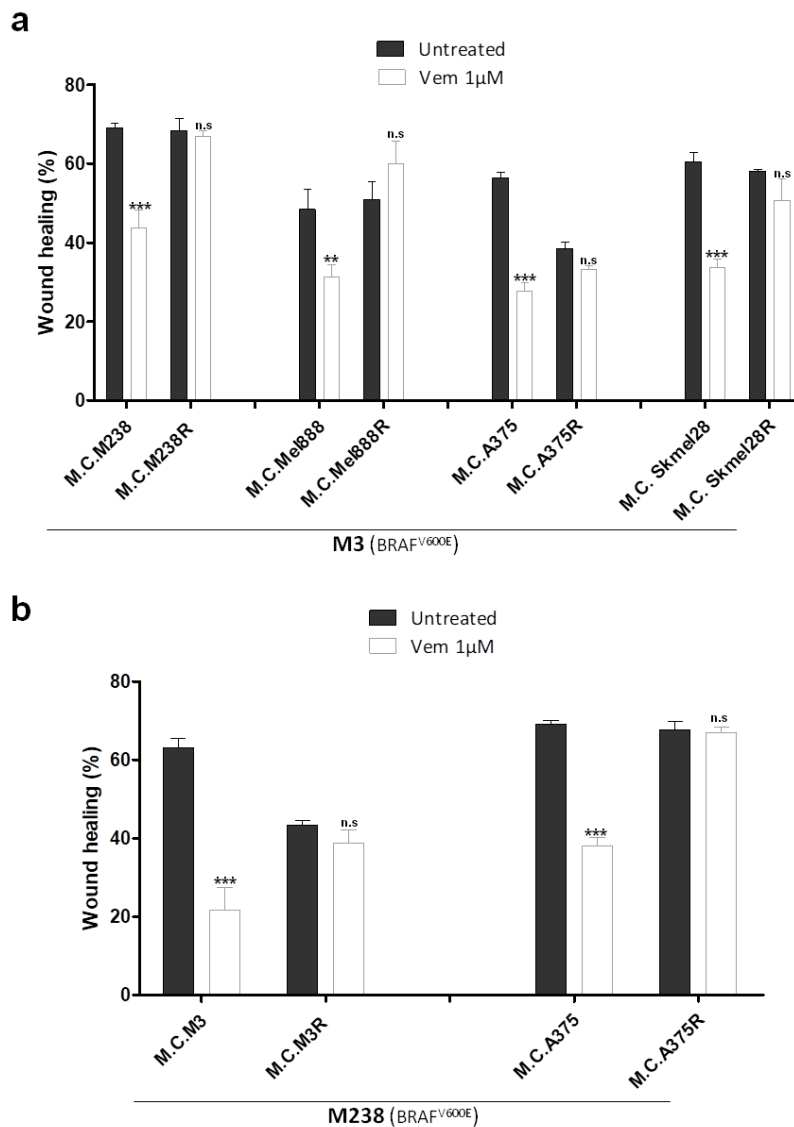


Figura 91. El secretoma de les línies resistent a Vemurafenib provoquen l'adquisició d'un fenotip de migració resistent sobre diferents línies parentals de melanoma. Assaig de migració (wound healing) de les línies (a) M3 i (b) M238 cultivades amb medi condicionat de diferents parentals o resistent amb Vemurafenib (1µM,48h). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu, es van determinar mitjançant el test Two-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni.

El bloqueig de l'autofàgia amb medis condicionats de cèl·lules resistents inhibeix la migració de les línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E} sensibles i restaura les taxes de motilitat cel·lular en combinació amb Vemurafenib dependent del estat funcional de PTEN.

En els estudis previs havíem demostrat que el Mibefradil inhibeix la migració cel·lular en totes les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} tant sensibles com resistents a Vemurafenib. Aquí en primer lloc, es va tractar d'avaluar si el bloqueig dels TTCCs amb Mibefradil també inhibia la migració cel·lular de les cèl·lules de melanoma cultivades amb els medis condicionats de les línies resistents. Tal i com s'observa a la Figura 92, efectivament el tractament amb Mibefradil també reduïa la capacitat migratòria de les cèl·lules de melanoma cultivades indistintament tant amb medi condicionat procedent d'una línia cel·lular sensible (M3 o M238) o procedent de les resistents (M3R o M238R), constatant per tant, els estudis anteriors.

Per altra banda, prèviament havíem determinat que la doble combinatòria (Vem + Mib) provocava un efecte diferencial sobre la viabilitat cel·lular, la migració i la invasió dependent de l'estat funcional de PTEN (Figura 83 i 84). Per aprofundir en aquest aspecte, es van realitzar assajos de *wound healing* amb una línia cel·lular de melanoma sensible a Vemurafenib amb PTEN KO (M3) i una amb PTEN WT (M238). En ambdós casos es va utilitzar com a medi condicionat 3 medis diferents: 1. Medi fresc com a control positiu, doncs prèviament ja havíem avaluat aquesta condició; 2. Medi condicionat de la pròpia línia sensible com a segon control per determinar que el medi condicionat no estava obsolet; 3. Medi condicionat procedent de la seva línia resistent corresponent. Després del tractament amb els fàrmacs, es va observar que en ambdues línies cel·lulars (M3 i M238) el medi condicionat propi amb Vemurafenib o amb Mibefradil en monoteràpia o en combinació amb els dos fàrmacs provocava una disminució significativa de la migració cel·lular (Figura 92). Al contrari, i corroborant els resultats *in vitro*, la línia M3 (KO per PTEN) cultivada amb el medi de la línia cel·lular resistent i amb el doble tractament (Vem + Mib) provocava una recuperació de la taxa de migració respecte el tractament amb Mibefradil en monoteràpia. En canvi, la línia M238 (WT per PTEN) cultivada amb el M.C.M238R i la teràpia combinada va disminuir la motilitat cel·lular tal com passava en els experiments *in vitro* amb medi fresc (Figura 92).

Resultats

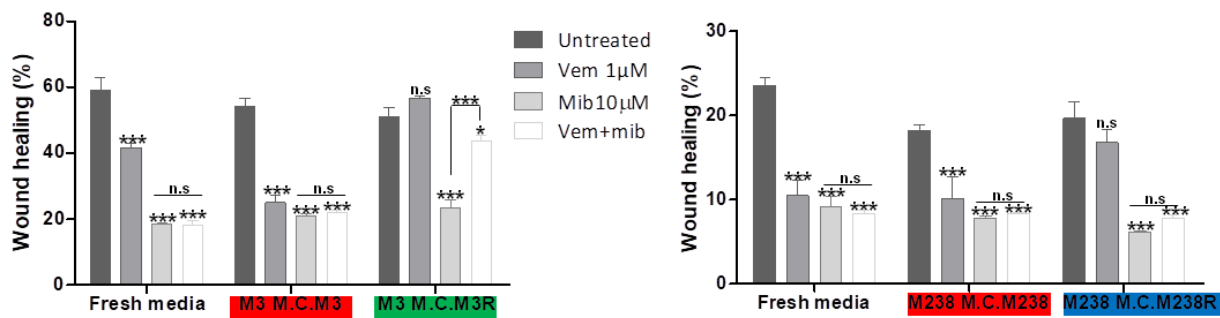


Figura 92. El bloqueig de l'autofàgia amb medis condicionats de resistents inhibeix la migració de línies sensibles de melanoma BRAF^{V600E} i manté les taxes de motilitat cel·lular en combinació amb Vemurafenib dependent de l'estat funcional de PTEN. Assaig de migració (wound healing) en M3 i M238 després de cultivar les línies cel·lulars amb M.C. de la línia cel·lular parental o M.C. de la línia resistent i els diferents tractaments (Vemurafenib 1µM, 48h, Mibefradil 1µM, 24h i combinació Vemurafenib+Mibefradil). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu, es van determinar mitjançant el test Two-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni.

Finalment, vam voler determinar si el restabliment o no de la migració cel·lular durant la teràpia combinada es deu a la mecànica intrínseca de les línies cel·lulars parentals, segons tinguin PTEN WT o PTEN KO/mutat, o bé és degut als factors secretats per les línies resistents. Amb aquest objectiu, vam realitzar assajos de migració utilitzant, en aquest cas, diferents medis condicionats de resistents sobre les línies cel·lulars parentals M3 (PTEN KO) o M238 i Mel888 (PTEN WT) (Figura 93).

Els resultats mostren que la línia M3, amb PTEN KO, sempre presentava un manteniment de la migració cel·lular amb la teràpia combinada independentment del medi de cultiu de resistent utilitzat. Ara bé, en les dues línies cel·lulars (M238 i Mel888) amb PTEN WT cultivades amb medi condicionat d'una línia resistent que no té l'expressió de PTEN (M3R), s'observava inclús una sinèrgia amb la teràpia combinada (Vem + Mib) (Figura 93).

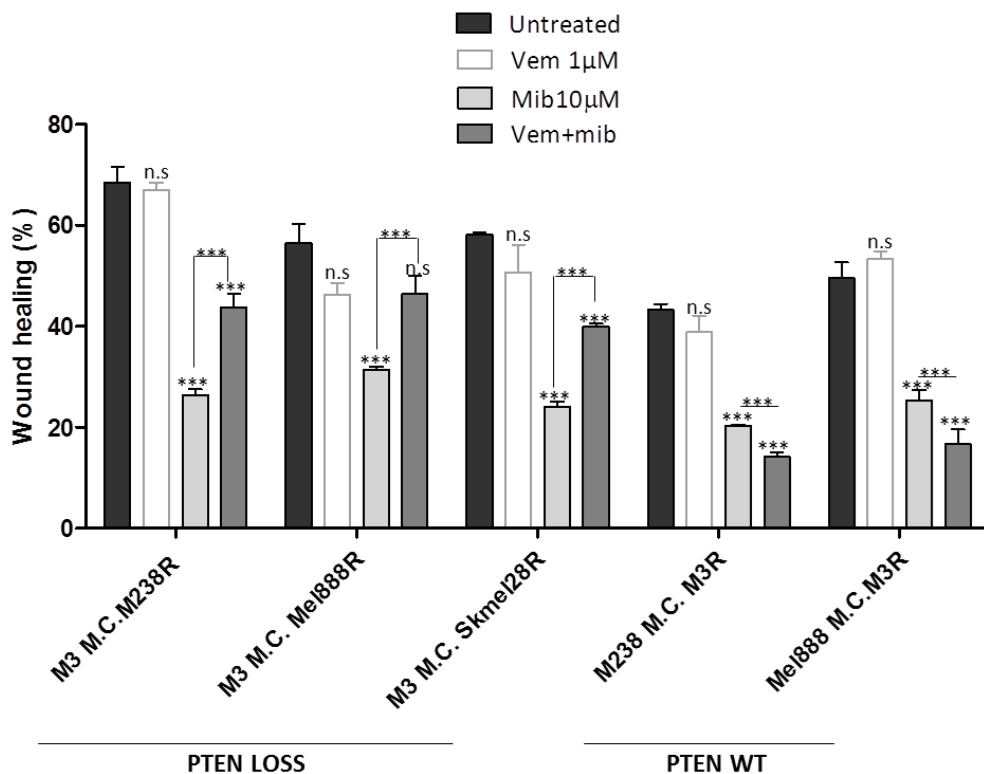


Figura 93. El bloqueig de l'autofàgia en combinació amb Vemurafenib juntament amb medis condicionats de diverses línies resistents recupera la taxa de migració en les línies parentals amb PTEN KO. Assaig de migració (wound healing) en M3, M238 i Mel888 després de cultivar les cel·lulars amb M.C. de diferents línies resistents i els diferents fàrmacs (Vemurafenib 1µM,48h, Mibefradil 1µM,24h i combinació Vemurafenib+Mibefradil). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu, es van determinar mitjançant el test Two-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni.

Aquests resultats indiquen que indistintament del medi condicionat resistent utilitzat per cultivar les línies cel·lulars parentals, l'efecte de la teràpia combinada depèn del mecanisme intrínsec de les cèl·lules i no pas dels factors presents en la secreció cel·lular.

Doncs en conjunt, els factors secretats per les cèl·lules de melanoma resistents és determinant per a l'adquisició de la resistència, però una vegada establerta, la seva modulació sota els inhibidors farmacològics dels TTCCs en combinació amb Vemurafenib és una característica intrínseca de les pròpies cel·lules.

Resultats

El plasma de ratolins amb tumors subcutanis de cèl·lules de melanoma resistent a Vemurafenib induïx un fenotip de resistència a les cèl·lules en cultiu.

Per acabar de validar si l'adquisició de resistència a l'inhibidor de BRAF de les línies cel·lulars sensibles era induïda per la secreció a l'entorn de factors per part de les cèl·lules de melanoma resistent (Koya et al. 2012; Straussman et al. 2012), es va extreure plasma de ratolins SCID amb *xenografts* de línies cel·lulars de melanoma (A375 i A375R; M238 i M238R; i SK-Mel-28R). Es van utilitzar ratolins control sense injecció subcutània de cèl·lules tumorals per comparar. Després de 4 setmanes de creixement dels *xenografts* es va extreure la sang de cada ratolí mitjançant punció cardíaca i es van obtenir els plasmes. Aquests plasmes es van filtrar (filtres 0,22µm) i es van utilitzar al 10% amb el medi de cultiu d'interès per cultivar la línia de melanoma M3 i SK-Mel-28 (sensibles).

Amb l'objectiu d'avaluar el procés de migració cel·lular, la línia M3 o SK-Mel-28 es va cultivar amb el medi + 10% de plasma de ratolí durant 48h amb Vemurafenib i es van realitzar assajos de *wound healing*. Els resultats obtinguts mostraven que el percentatge de migració de les M3, tant amb el plasma control (no tumoral) com amb els plasmes procedents dels ratolins amb *xenografts* de línies cel·lulars parentals, disminuïa amb el tractament amb Vemurafenib. Per contra, i verificant els resultats *in vitro*, la migració de la M3 no es veia afectada sota l'exposició dels plasmes procedents dels models tumorals de línies resistent i sota el tractament amb Vemurafenib (Figura 94). En aquest sentit, la línia cel·lular parental SK-Mel-28 tampoc presentava diferències significatives en la migració cel·lular quan les cèl·lules es cultivaven amb plasma procedent dels *xenografts* SK-Mel-28R en combinació amb Vemurafenib.

Aquests resultats suggereixen, que en el plasma dels ratolins hi ha factors implicats en l'adquisició de la resistència als inhibidors de BRAF que modulen el comportament migratori de les cèl·lules parentals.

A més, es va mesurar la migració cel·lular sota el bloqueig dels TTCCs amb Mibefradil en les línies cel·lulars sensibles (M3 i SK-Mel-28) tractades prèviament amb els plasmes dels ratolins i es va observar que en totes les condicions (amb tots els plasmes procedents dels ratolins amb *xenografts* de cèl·lules de melanoma tant parentals com resistent) el tractament amb el Mibefradil inhibia la migració de les cèl·lules M3 (Figura 94).

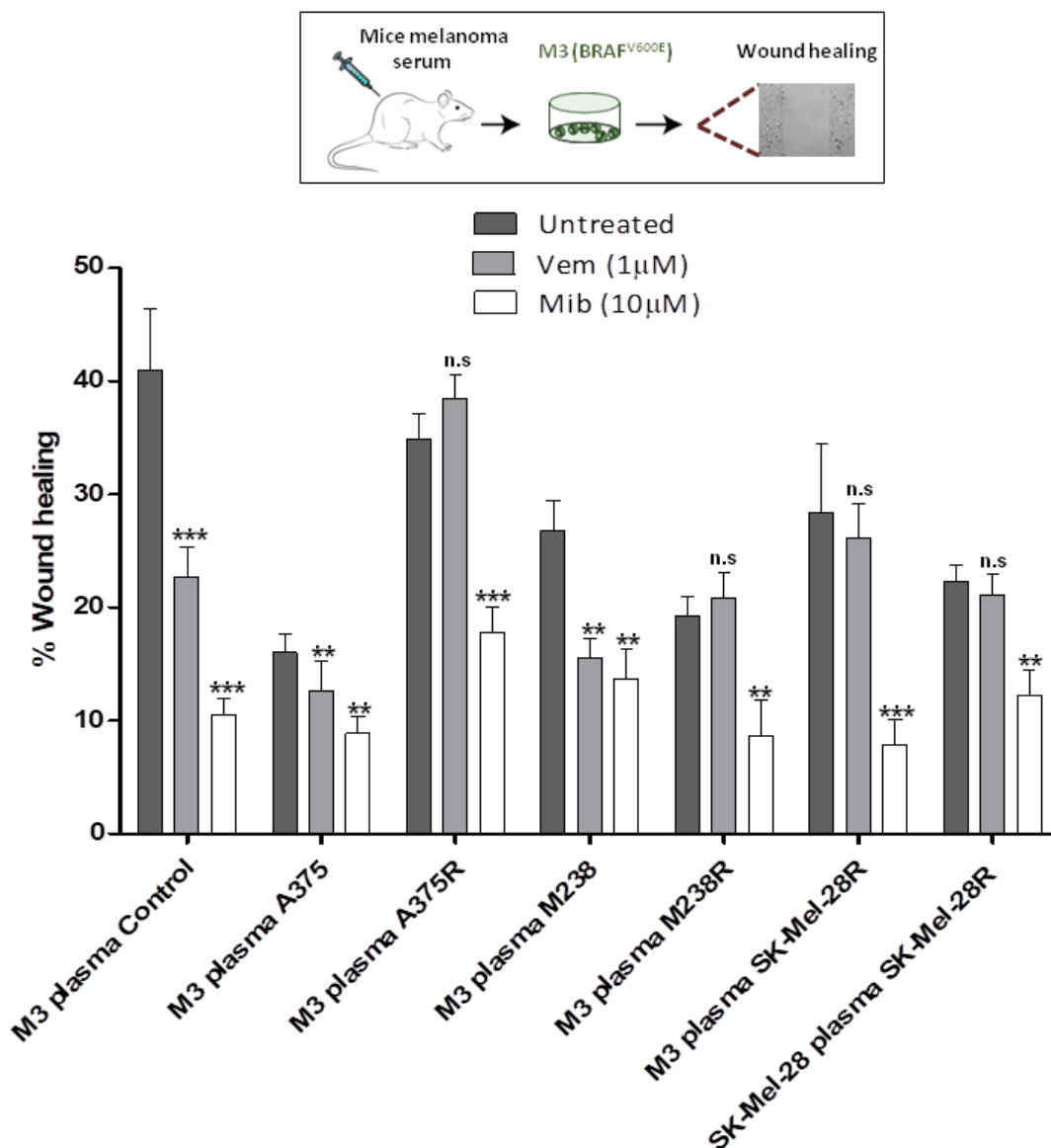


Figura 94. Efecte del plasma procedent de ratolins amb tumors subcutanis de línies resistents sobre la migració de les línies parentals, M3 i SK-Mel-28. Assaig de migració (wound healing) després de cultivar la línia M3 amb 10% de plasma Control, A375, A375R, M238, M238R i Sk-Mel-28R o la línia cel·lular SK-Mel-28 amb 10% de plasma SK-Mel-28R i/o Vemurafenib (1μM,48h) i/o Mibefradil (10μM,24h). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu, es van determinar mitjançant el test Two-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni.

Resultats

La secreció d'exosomes dels melanomes resistents a Vemurafenib no promou l'adquisició de resistència a la teràpia amb l'inhibidor de BRAF.

Per tots els resultats obtinguts fins aleshores, i segons la literatura, les línies cel·lulars resistents a Vemurafenib secreten factors i diversos productes que afecten al fenotip de les línies cel·lulars parentals. En un intent per descobrir algun biomarcador diferencial entre els melanomes resistents i els sensibles, vam dur a terme la tècnica d'aïllament i purificació d'exosomes amb l'ajut de la Dra. Àngels Fabra del laboratori d'Oncologia Molecular del ICO-IDIBELL.

Els exosomes són vesícules derivades de cèl·lules que estan presents en la majoria de fluids, incloent sang, orina i medi dels cultius cel·lulars. Diferents estudis suggereixen que els exosomes derivats de cèl·lules cancerígenes estan implicats en el creixement del tumor, la tumorigènesi, l'angiogènesi, l'evacuació immunitària del tumor, la metàstasi i la resistència a la teràpia (Peinado et al. 2012; Somasundaram and Herlyn 2012; Tucci et al. 2018). Els exosomes també participen en la comunicació intercel·lular tumoral i amb les cèl·lules estromals, especialment amb fibroblasts associats al càncer (CAF) (Pan et al. 2017).

Per tal de determinar si els exosomes estaven involucrats en l'adquisició de resistència a Vemurafenib, vam realitzar l'aïllament i purificació d'exosomes per la tècnica d'ultracentrifuga de la línia cel·lular sensible M3 i la resistent M3R. Una vegada aïllats els exosomes, vam realitzar experiments de migració, però en aquest cas, utilitzant cambres *Transwell*, per veure si eliminant els exosomes dels medis condicionats de les línies resistents observàvem un patró diferencial en la migració cel·lular després del tractament amb Vemurafenib.

En aquest cas com a quimioatraient (en la cambra de baix del *Transwell*), vam utilitzar (Figura 95a):

a) M.C. M3

- Medi M3 amb exosomes +/- Vemurafenib
- Medi M3 deplecionat d'exosomes +/- Vemurafenib

b) M.C M3R

- Medi M3R amb exosomes +/- Vemurafenib
- Medi M3R deplecionat d'exosomes +/- Vemurafenib

No obstant, els resultats no van ser els esperats. Per a ambdues línies cel·lulars (tant la sensible com la resistent) tant el medi amb exosomes com el medi deplecionat dels mateixos no produïen diferències en la migració cel·lular, és a dir, el tractament amb Vemurafenib no disminuïa la taxa de migració de les cèl·lules quan s'utilitzava com a quimioatraient el medi condicionat de la línia resistent sense exosomes (Figura 95b). Aquests resultats ens suggereixen, que els exosomes no són el component secretat implicat en el mecanisme de resistència en les nostres línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E}.

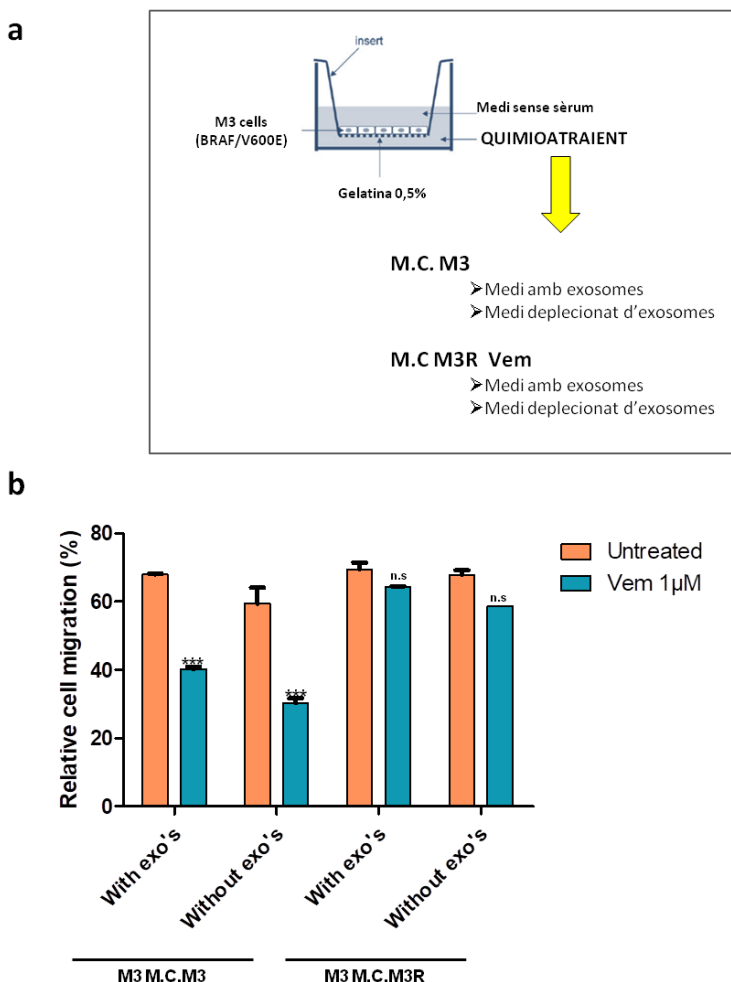


Figura 95. La secreció d'exosomes de les cèl·lules de melanoma resistent a Vemurafenib no tenen un paper important sobre l'adquisició de resistència a la teràpia amb l'inhibidor de BRAF. a) Esquema representatiu de l'experiment de migració Transwell. b) Percentatge (%) de les cèl·lules que van migrar després de cultivar les cèl·lules amb medi condicionat propi (M3) o procedent de la corresponent resistent (M3R) i amb Vemurafenib (1µM,48h). * p <0,05; ** p <0,01; * p <0,001; n.s, no significatiu, es van determinar mitjançant el test Two-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni.**

Resultats

El secretoma de les línies cel·lulars de melanoma resistent a Vemurafenib presenta un increment de citocines pro-tumorals respecte la secreció de les línies parentals.

Per tal de determinar biomarcadors amb aplicabilitat clínica i/o dianes terapèutiques implicades en el mecanisme de resistència en el secretoma del melanoma humà, vam voler estudiar les citocines presents en el medi de cultiu de les diferents línies cel·lulars de melanoma BRAF^{V600E}. Les citocines, àmpliament definides com a proteïnes de senyalització cel·lular, tenen un paper important en la inflamació, la immunitat innata, l'apoptosi, l'angiogènesi, així com en el creixement cel·lular i la diferenciació. A més, estan implicades en nombroses malalties entre les que s'hi inclou el càncer (Duque and Descoteaux 2014; Elias et al. 2010; Quail and Joyce 2013).

Gràcies al citoarray "*Human Cytokine Antibody Array G-Series 3 (AAH-CYT-G3-4)*" vam portar a terme una detecció múltiple i simultània de citocines humanes (n = 42) en els medis condicionats de les línies cel·lulars M3, SK-Mel-28, A375 i M238 i en els procedents de les línies resistent. Primer de tot, com es mostra en la figura 96, vam observar que pràcticament totes les citocines detectades es trobaven incrementades en els medis condicionats procedents de les línies resistent en comparació amb els medis condicionats parentals.

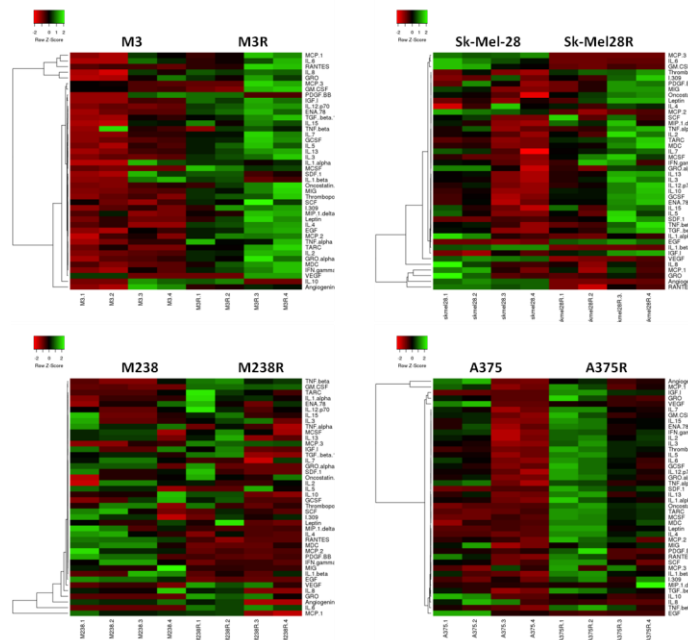
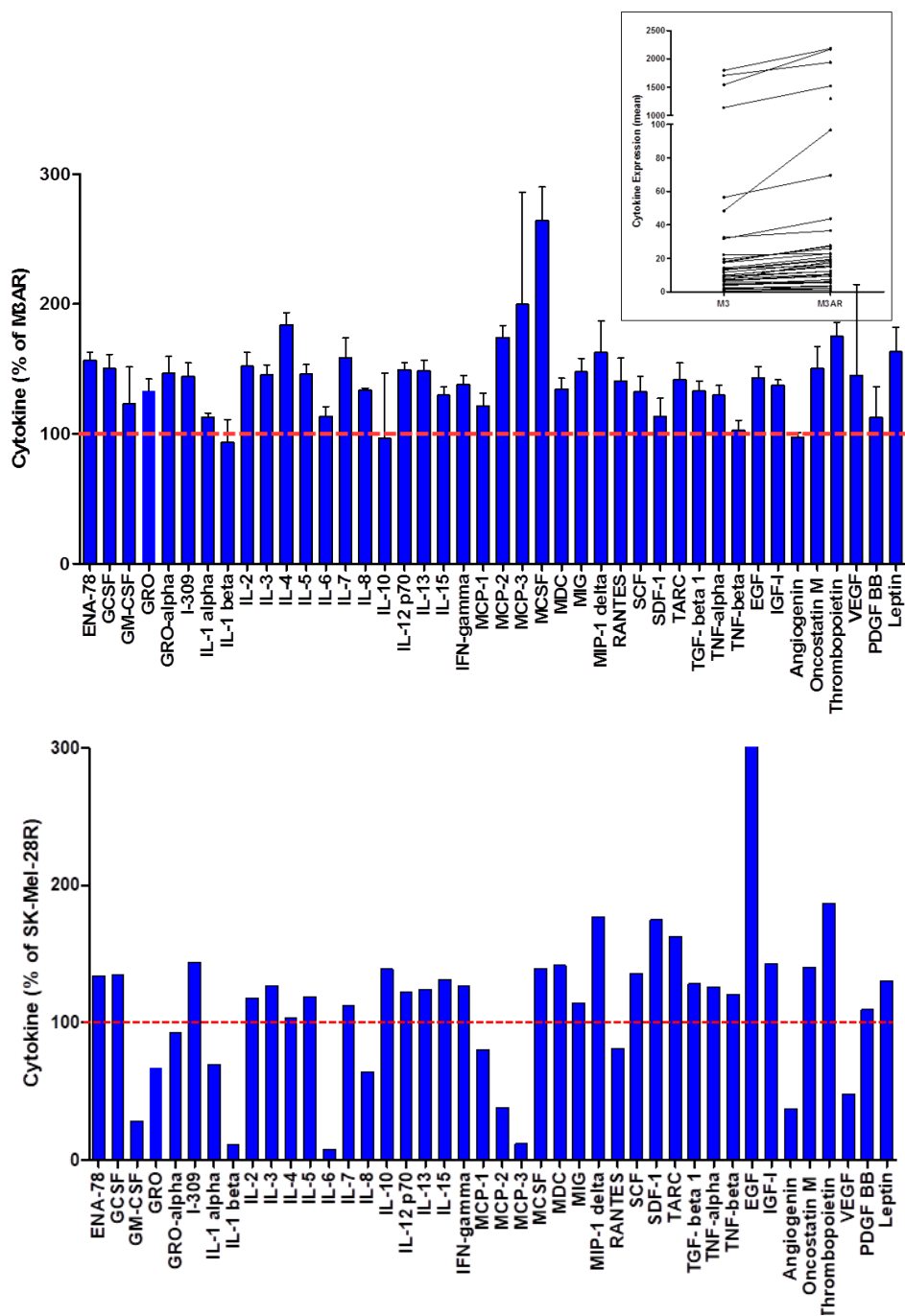


Figura 96. Secreció de citocines pro-tumorals per part de les línies cel·lulars BRAF^{V600E} sensibles i resistent a Vemurafenib. Heatmaps que mostren un resum dels nivells relatius de secreció de les línies sensibles i resistent utilitzades en els citoarrays.

En la figura 97 es mostren els perfils de secreció de citoquines de la línia resistant respecte la línia parental de cada parella sensible i resistant a Vemurafenib de les diferents línies cel·lulars.



Resultats

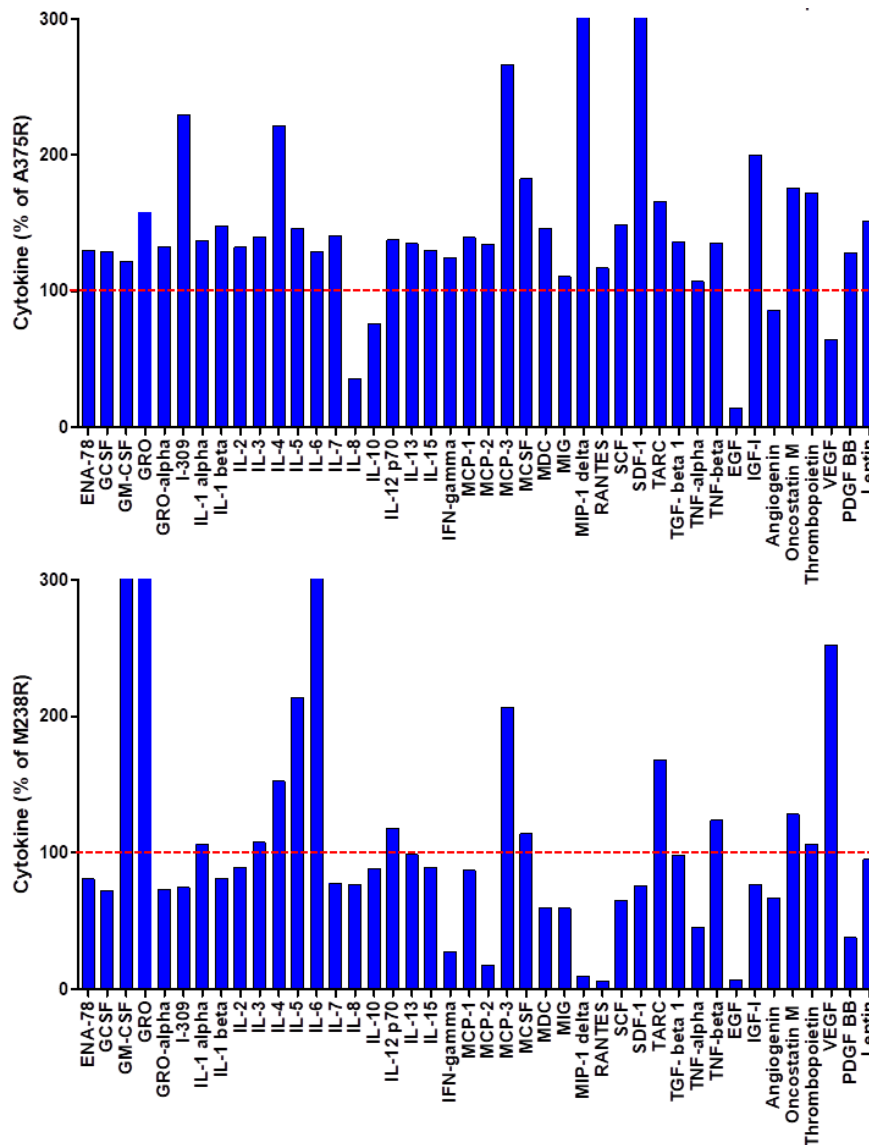
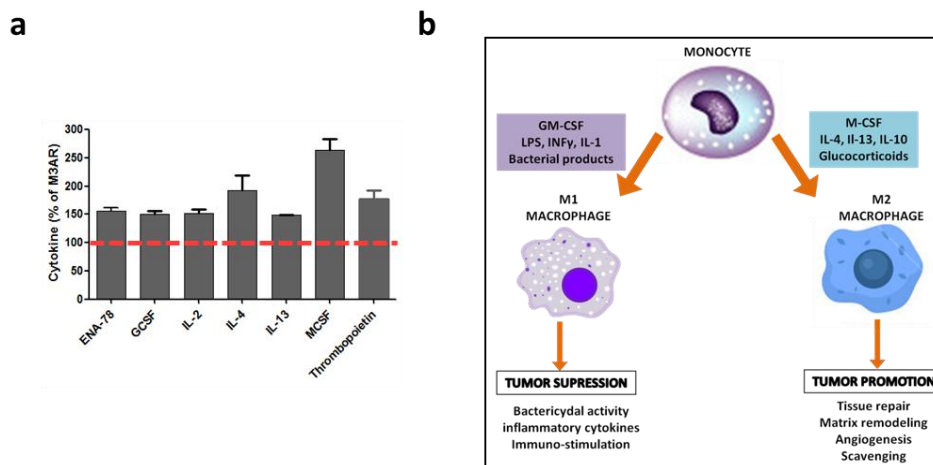


Figura 97. Representació gràfica del perfil de secreció de citoquines de les línies cel·lulars resistents respecte les parentals. En els gràfics, el 100% representa la secreció de les línies parentals M3, SK-Mel-28, A375 i M238.

De totes les citoquines secretades per part de les línies cel·lulars resistents ens vam centrar en aquelles que es secretaven en més del 50% respecte la línia cel·lular parental (Figura 97).

Curiosament, el perfil de secreció de citoquines obtingut es relaciona amb la infiltració de macròfags associats a tumors (TAM) i específicament amb els macròfags M2, que han estat associats amb l'estimulació del creixement tumoral, l'angiogènesi, la invasió i la metàstasi, així com amb la resistència a la teràpia. Aquest fenotip és conseqüència, en gran part, de la presència de M-CSF, i d'altres factors com de les interleuquines IL 4, IL 13 i IL 10 (Figura 98) (Cannarile et al. 2017).



Cannarile et al. 2017

Figura 98. Regulació de la supressió o estimulació immunitària dependent del subtipus de macròfags associats a tumors.

M-CSF promou l'adquisició de resistència a Vemurafenib en els melanomes BRAF^{V600E} amb pèrdua de PTEN.

Inicialment, vam aprofundir en l'estudi sobre el factor M-CSF, perquè va resultar ser una de les citoquines més representada i predominant en el medi condicionat procedent de les línies resistents a Vemurafenib (M3, Sk-Mel-28 i A375). El *factor estimulant de la colònia de macròfags* també conegut com M-CSF o CSF-1, és una citoquina secretada que es sobreexpressa en molts tumors (Chockalingam and Ghosh 2014) i està involucrada en diversos efectes pro-tumorals com en la promoció i la progressió tumoral, en l'angiogènesi associada a tumors durant la migració i la invasió, així com en la supressió de respostes immunitàries antitumorals (Dwyer et al. 2017).

Per començar, vam avaluar l'efecte de la proteïna recombinant de M-CSF (*rhM-CSF*) a diferents dosis sobre la viabilitat cel·lular de la línia parental M3 i després la vàrem combinar amb Vemurafenib per tal d'estudiar els seus efectes durant l'adquisició de resistència farmacològica. Els resultats indiquen que l'exposició de la línia cel·lular parental M3 a *rhM-CSF* en el rang de concentracions entre 100 i 800ng/mL no va mostrar variacions en la viabilitat cel·lular. Per tant, la proteïna recombinant de M-CSF no induïa canvis en la proliferació o en la mort d'aquesta línia cel·lular (Figura 99a). A banda, la combinació de *rhM-CSF* tant a 100 com a 200ng/mL amb l'inhibidor de BRAF (Vem) en la línia sensible M3 revertia la viabilitat cel·lular respecte el tractament amb Vemurafenib sol, comportant-se com una línia cel·lular resistent (Figura 99b).

Resultats

Una vegada optimitzada la concentració de *rhM-CSF* a 200ng/mL, es va avaluar la viabilitat cel·lular de totes les línies *BRAF*^{V600E} després de l'estimulació amb la proteïna recombinant amb combinació amb Vemurafenib (Figura 99c-d). Els resultats van mostrar que amb el tractament amb Vemurafenib es produïa una disminució de la viabilitat cel·lular en totes les línies cel·lulars, tal i com s'esperava, mentre que amb la condició *rhM-CSF* no hi havia diferències significatives respecte el control no tractat. No obstant, només aquelles línies cel·lulars amb *PTEN* KO/mutat no responien en termes de viabilitat cel·lular al tractament conjunt de *rhM-CSF* i Vemurafenib, mantenint doncs el percentatge de cèl·lules viables (Figura 99c). En canvi, les línies *PTEN* WT reduïen el percentatge de cèl·lules viables amb la doble combinació (*rhM-CSF* + Vem) (Figura 99d), suggerint que el *M-CSF* és determinant per a l'adquisició de resistència a Vemurafenib en el melanoma quan *PTEN* no és funcional.

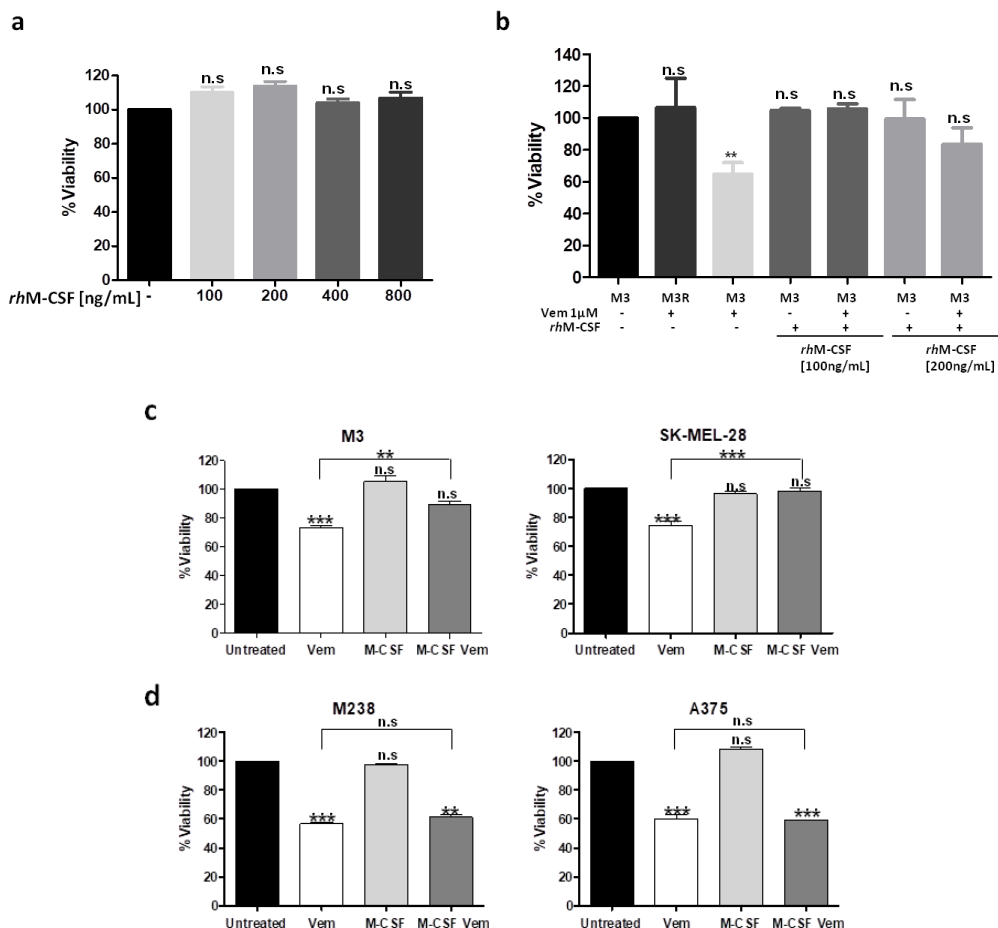


Figura 99. M-CSF en combinació amb Vemurafenib restableix la viabilitat cel·lular en els melanomes *BRAF*^{V600E} amb pèrdua de *PTEN*. a) Assaig de dosi-resposta de *rhM-CSF* en la línia M3 parental després de 48h

d'estimulació amb la citoquina. b) Assaig de viabilitat cel·lular de les cèl·lules M3 estimulades durant 48h amb M-CSF (100ng/mL i 200ng/mL) i/o Vemurafenib (1 μ M, 48h). Com a controls es va utilitzar la M3 i M3R tractada amb només Vemurafenib. MTT a les 48h de tractament amb Vemurafenib (1 μ M, 48h), rhM-CSF (200ng/mL, 48h) i rhM-CSF+Vemurafenib en les línies parentals (c) amb PTEN no funcional (M3 i SK-Mel-28) i (d) amb PTEN WT (M238 i A375). L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant el test One-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu).

Per avaluar doncs, si l'adquisició de resistència produïda per l'estimulació amb M-CSF també tenia el seu efecte en la migració cel·lular, es va mesurar la taxa de migració en totes les línies cel·lulars sensibles sota el tractament amb rhM-CSF i en combinació amb Vemurafenib. De nou, els resultats demostraven que els melanomes amb pèrdua de PTEN (M3 i SK-Mel-28) recuperaven la migració amb la doble combinació (rhM-CSF + Vemurafenib) respecte la monoteràpia amb Vemurafenib (Figura 100a), mentre que s'observava una disminució de la migració en les línies cel·lulars amb PTEN funcional (M238 i A375) (Figura 100b).

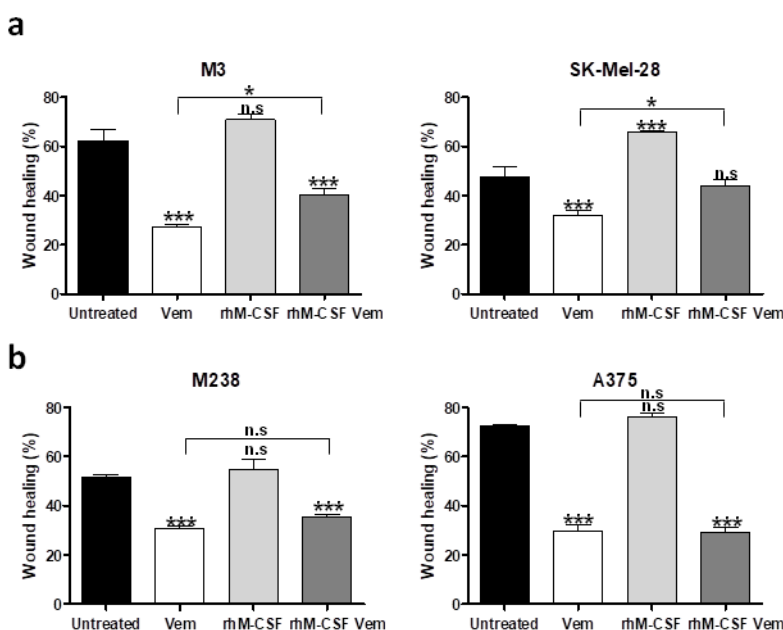


Figura 100. M-CSF en combinació amb Vemurafenib restaura la migració cel·lular en els melanomes BRAF^{V600E} amb pèrdua de PTEN. Assaig de Wound healing a les 48h de tractament amb Vemurafenib (1 μ M, 48h), rhM-CSF (200ng/mL, 48h) i rhM-CSF+Vemurafenib en les línies parentals (a) amb PTEN no funcional (M3 i SK-Mel-28) i (b) amb PTEN WT (M238 i A375). L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant el test One-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu).

Resultats

Llavors, amb l'objectiu de validar els resultats previs i investigar si efectivament PTEN participava en la viabilitat cel·lular i en el procés de migració durant l'adquisició de resistència a causa de M-CSF, vam sobreexpressar PTEN, mitjançant infecció lentiviral, en una línia cel·lular KO per PTEN, la M3. Les cèl·lules sobreexpressades amb PTEN (M3 OE PTEN) reduïen la viabilitat cel·lular (Figura 101a) i la migració cel·lular (Figura 101b) quan s'estimulaven amb *rhM-CSF* en combinació amb l'inhibidor de BRAF (Vem), mimetitzant el que succeïa en les línies cel·lulars amb PTEN funcional (M238 i A375) (Figures 99 i 100).

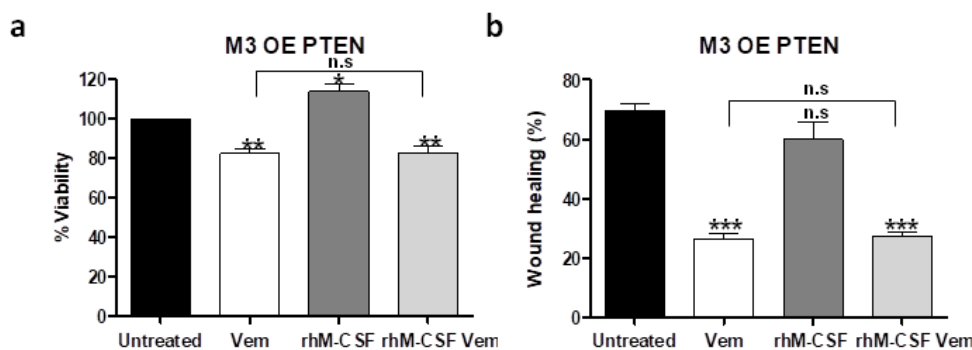


Figura 101. M-CSF està implicat en la viabilitat i la migració cel·lular durant l'adquisició de resistència a Vemurafenib en les cèl·lules KO per PTEN. a) Assaig de viabilitat cel·lular (MTT) i b) Assaig de Wound healing a les 48h de tractament amb Vemurafenib (1µM, 48h), rhM-CSF (200ng/mL, 48h) i rhM-CSF+Vemurafenib en la línia parental M3 sobreexpressada amb PTEN (M3 OE PTEN). L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant el test One-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu).

Aquests resultats suggereixen que M-CSF podria tenir un paper important en el mecanisme de resistència a Vemurafenib en cèl·lules de melanoma que presenten pèrdua de PTEN.

L'anticòs monoclonal de M-CSF inhibeix l'adquisició de resistència a Vemurafenib en els melanomes BRAF^{V600E} amb pèrdua de PTEN.

Atès que s'ha descrit que la secreció de M-CSF s'associa amb la resistència a la teràpia dels inhibidors de BRAF (Hugo et al. 2015; Wang et al. 2015), vam avaluar si la neutralització d'aquesta citoquina, mitjançant l'anticòs monoclonal de M-CSF (mAb M-CSF), inhibiria l'adquisició de resistència en les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E}.

En primer lloc, vàrem voler estudiar la concentració d'anticòs necessària per neutralitzar la secreció de M-CSF. Segons el *datasheet* de l'anticòs, vam tractar la línia sensible M3 amb mAb M-CSF (20ng/mL) en combinació amb la proteïna recombinant *rhM-CSF* (200ng/mL) (Figura 102). Les dades obtingudes van demostrar la funcionalitat del mAb M-CSF a 20ng/mL, ja que en combinació amb la proteïna recombinant (*rhM-CSF*) es produïa una disminució de la viabilitat de les cèl·lules M3 tractades amb Vemurafenib.

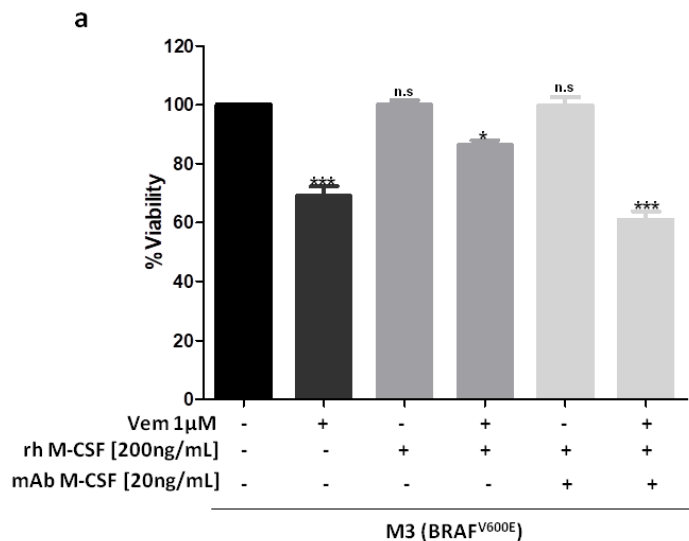


Figura 102. Gràfic representatiu de la funcionalitat de l'anticòs monoclonal de M-CSF. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant el test One-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu).

En segon lloc, es va avaluar si l'anticòs contra M-CSF tenia un efecte en la viabilitat i la migració de les pròpies línies cel·lulars resistents amb pèrdua de PTEN (M3R i SK-Mel-28R). Com es mostra a la figura 103, el tractament amb mAb M-CSF no disminuïa la viabilitat (Figura 103a) ni la migració cel·lular (Figura 103b) quan es combinava amb Vemurafenib, indicant que aquesta combinació no produïa cap efecte en la resistència establerta de les línies de melanoma BRAF^{V600E}.

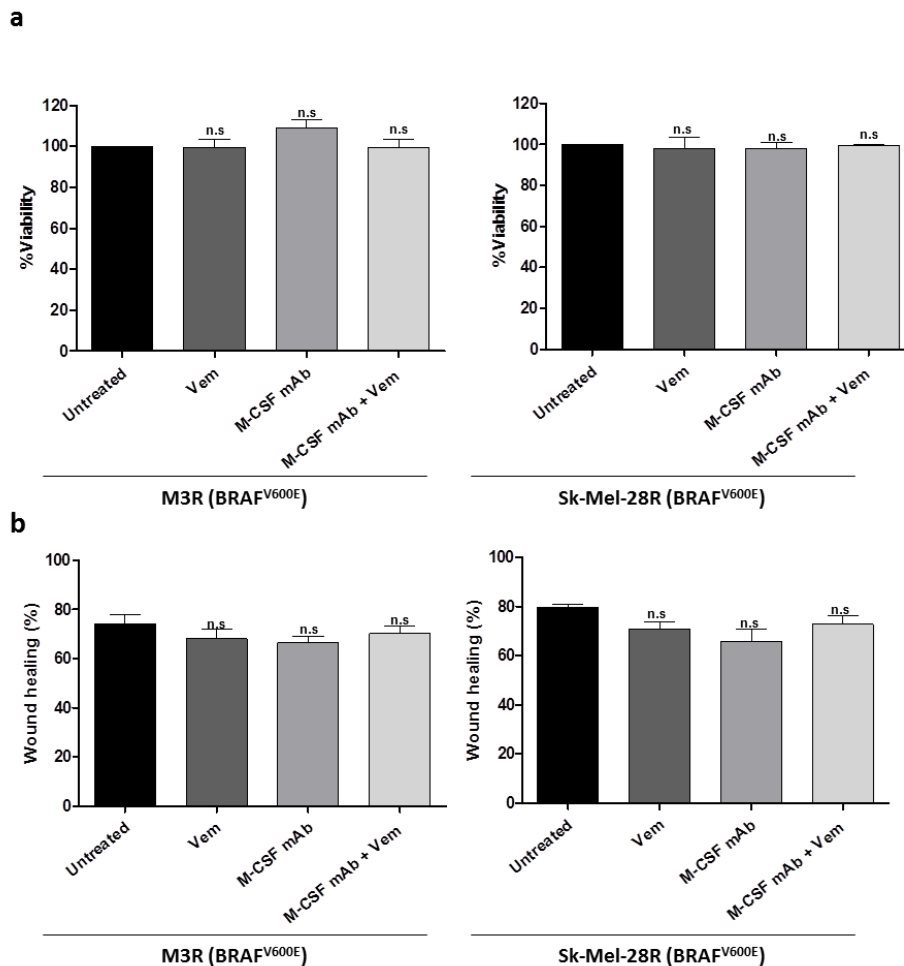


Figura 103. L'anticòs monoclonal de M-CSF no modifica la viabilitat ni la migració de les cèl·lules de melanoma resistent a Vemurafenib. a) Assaig de viabilitat cel·lular (MTT) en M3R i Sk-Mel-28R i (b) Assaig de Wound healing en M3R i Sk-Mel-28R a les 48h de tractament amb Vemurafenib (1 μ M, 48h), mAb hM-CSF (20ng/mL, 48h) i mAb M-CSF+Vemurafenib. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant el test One-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu).

Aquests resultats sobre la viabilitat cel·lular i la migració en les línies resistent amb PTEN KO o mutat (M3R i Sk-Mel-28R, respectivament) suggereixen que el mAb M-CSF no és capaç d'inhibir la viabilitat ni la migració en aquestes línies cel·lulars de melanoma que ja són resistent a Vemurafenib, indicant doncs un efecte nul de l'anticòs monoclonal com a teràpia en les cèl·lules amb una resistència ja adquirida.

Seguidament, vam tractar d'analitzar la implicació del mAb M-CSF durant l'adquisició de resistència al fàrmac Vemurafenib. Per portar a terme aquest anàlisi, vam tractar les dues línies de melanoma parentals amb PTEN KO/mutat (M3 i Sk-Mel-28) amb medi condicionat procedent de la seva resistant i/o Vemurafenib i/o mAb M-CSF i vam determinar la viabilitat cel·lular mitjançant MTT (Figura 104).

Després de 48 hores amb els diferents tractaments els resultats van mostrar, en ambues línies cel·lulars, que la viabilitat cel·lular no es veia alterada quan es tractaven les cèl·lules parentals amb medi condicionat de resistents juntament amb mAb M-CSF sol. No obstant, quan les línies PTEN KO/mutat parentals es van cultivar amb medi condicionat de resistant i a la vegada amb la combinació de mAb M-CSF i Vemurafenib disminuïa significativament la viabilitat cel·lular. Aquests resultats, suggereixen doncs, que el mAb M-CSF neutralitza la citoquina M-CSF secretada al medi condicionat durant l'adquisició de resistència (Figura 104).

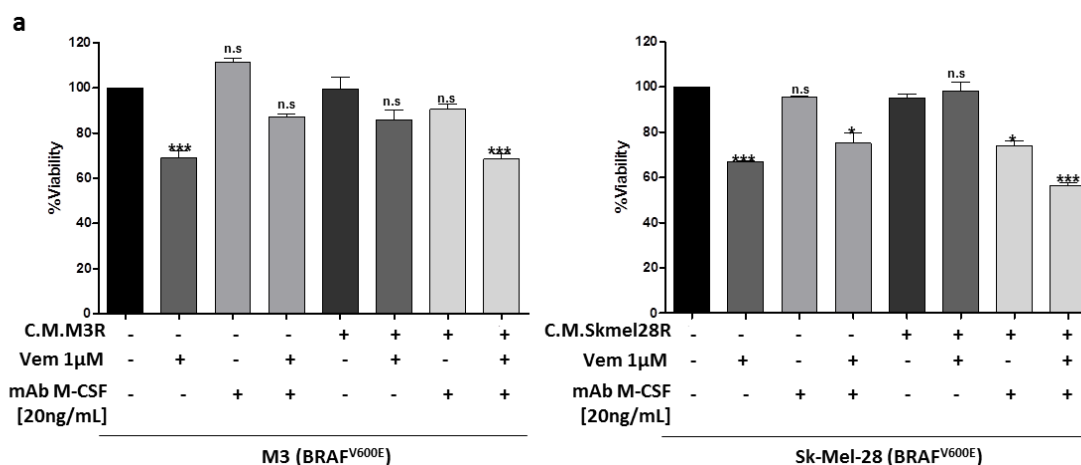


Figura 104. L'anticòs monoclonal de M-CSF inhibeix la viabilitat cel·lular en combinació amb Vemurafenib durant l'adquisició de resistència en els melanomes BRAF^{V600E}. MTT de M3 i SK-Mel-28 parentals després de ser exposades a 48 hores de medi condicionat propi o de la corresponent línia resistents i/o Vemurafenib (1µM, 48h) i/o mAb M-CSF (20ng/mL). L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant el test One-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; n.s, no significatiu).

A continuació, es va determinar l'efecte del mAb M-CSF durant l'adquisició de resistència al fàrmac sobre la migració de les cèl·lules PTEN KO/mutat (M3 i Sk-Mel-28). Per aquest experiment, es va realitzar un assaig de *wound healing* després del tractament amb medi condicionat procedent de les cèl·lules resistents corresponents i/o Vemurafenib i/o mAb M-CSF (Figura 105). En aquest cas, les

Resultats

cèl·lules cultivades amb el medi condicionat de resistents amb l'antiòs mAb M-CSF ja provocava una disminució significativa de la migració cel·lular i es mantenia amb la combinació amb Vemurafenib, però sense produir-se un efecte sinèrgic amb la doble teràpia (BRAFi + mAb M-CSF). Aquestes dades ens demostren que el mAb M-CSF inhibeix la migració durant l'adquisició de resistència a Vemurafenib en els melanomes BRAF^{V600E}.

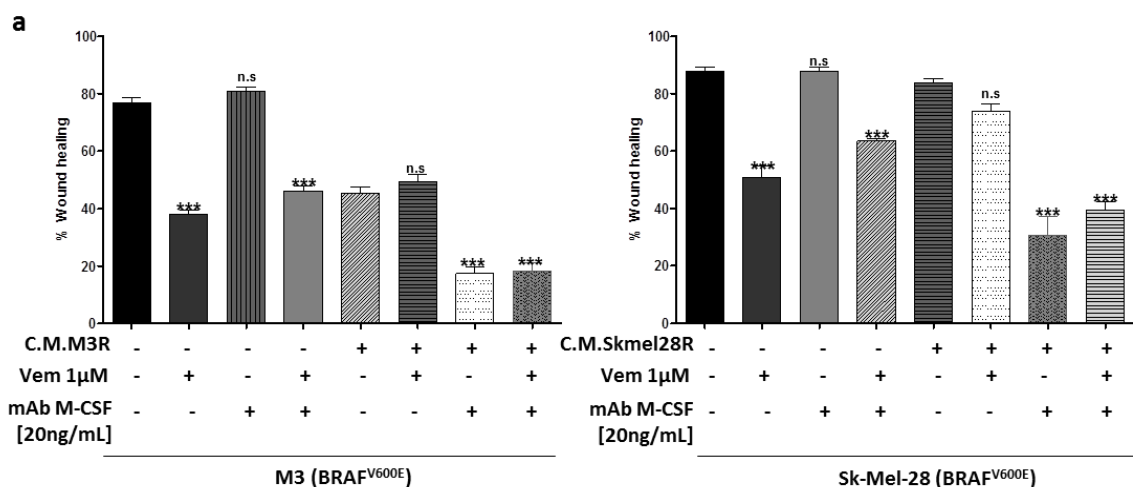


Figura 105. L'anticòs monoclonal de M-CSF inhibeix la migració cel·lular en combinació amb Vemurafenib durant l'adquisició de resistència en els melanomes BRAF^{V600E}. Wound healing de M3 i SK-Mel-28 parents després de ser exposades a 48 hores de medi condicionat propi o de la corresponent línia resistents i/o Vemurafenib (1μM, 48h) i/o mAb M-CSF (20ng/mL). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant el test One-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; n.s., no significatiu).

Finalment, es va avaluar l'efecte del mAb M-CSF en monoteràpia i en combinació amb Vemurafenib sobre cèl·lules cultivades amb medis que contenen 10% de plasma de ratolí que tenien tumors subcutanis de Sk-Mel-28R. Així, les cèl·lules Sk-Mel-28 es van cultivar amb el plasma de ratolí i es van tractar amb l'anticòs mAb M-CSF en monoteràpia i en combinació amb Vemurafenib, observant-se en ambdós tractaments una disminució de la migració cel·lular (Figura 106).

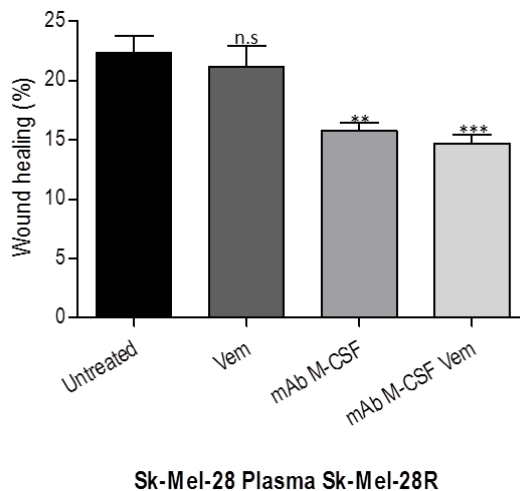


Figura 106. L'anticòs monoclonal de M-CSF inhibeix l'adquisició de resistència a Vemurafenib en els melanomes BRAF^{V600E} tractats amb plasma de ratolí. Wound healing de SK-Mel-28 parental després de ser exposada a 48 hores al 10% de plasma de ratolí amb tumors subcutanis de Sk-Mel-28R i/o Vemurafenib (1 μ M, 48h) i/o mAb M-CSF (20ng/mL). L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant el test One-way ANOVA, seguit de la prova de comparacions múltiples de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s, no significatiu).

En conclusió, podem suggerir que la neutralització del factor M-CSF secretat amb l'anticòs monoclonal disminueix la viabilitat cel·lular i la migració en combinació amb Vemurafenib durant l'adquisició de resistència al fàrmac, fet que podria prevenir la creació de resistència a l'inhibidor de BRAF a les línies de melanoma parental.

Finalment, en aquesta darrera part del treball, vam constatar el potencial terapèutic de l'anticòs neutralitzant de M-CSF en l'aparició de resistència a Vemurafenib de les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} mitjançant l'ús de medis condicionats. Així, vam demostrar que el secretoma dels medis de cultius de cèl·lules resistents a Vemurafenib induïa resistència al tractament i modulava el fenotip de mort cel·lular i de migració de les cèl·lules parentals. Per altra banda, el plasma de ratolins amb tumors subcutanis de cèl·lules resistents, promouien també un fenotip de resistència a les cèl·lules parentals *in vitro*. Doncs en conjunt, vam descriure que els factors secretats per les cèl·lules de melanoma resistents és determinant per a l'adquisició de la resistència, però una vegada establerta, la seva modulació sota els inhibidors farmacològics dels TTCCs en combinació amb Vemurafenib és una característica intrínseca de les pròpies cel·lules.

Resultats

Seguidament, vam observar que el secretoma de les cèl·lules resistents presentava un increment de la secreció de citokines pro-tumorals, entre les que s'inclou M-CSF. La citokina M-CSF va ser determinant per a l'adquisició de resistència a Vemurafenib en melanomes BRAF^{V600E} amb PTEN no funcional, ja que amb l'estimulació de les cèl·lules basals amb la proteïna recombinant (*rh*M-CSF) i Vemurafenib es comportaven com unes cèl·lules resistents a la teràpia (BRAFi). Posteriorment, aquests resultats es van validar mitjançant la sobreexpressió de PTEN en línies de melanomes sensibles (PTEN KO), que mostraven una reducció tant de la viabilitat com de la motilitat una vegada sotmeses a l'estimulació de M-CSF en combinació amb l'inhibidor de BRAF, Vemurafenib. En conseqüència, la neutralització de la citokina secretada M-CSF, mitjançant l'anticòs monoclonal, va inhibir l'adquisició de resistència en les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} amb PTEN no funcional. Aquestes dades posen de manifest que el factor de secreció M-CSF podria tenir un paper rellevant en el mecanisme de resistència als inhibidors de BRAF com Vemurafenib.

DISCUSSIÓ

RESULTATS PREVIS

Estudi de l'autofàgia i els TTCCs sobre la mort cel·lular, la migració i la invasió en el melanoma segons el perfil genètic i mutacional.

El melanoma maligne és una de les neoplàsies cutànies que causa major mortalitat a nivell mundial (Leiter and Garbe 2008; Miller and Mihm 2006). Per això, encara es requereix d'investigació detallada sobre la seva patogènesi i progressió, per tal de ser utilitzada durant la recerca de marcadors pronòstics i/o de noves estratègies terapèutiques.

En treballs anteriors, el nostre grup va demostrar mitjançant tècniques d'IHC en biòpsies de melanoma parafinades (FFPE) que l'expressió dels TTCCs augmentava gradualment des dels melanòcits a melanomes primaris i metastàtics, i aquest increment es relacionava amb un mal pronòstic (Maiques et al. 2016). En el present estudi es descriu (tant en cèl·lules de melanoma com en biòpsies) que la isoforma Cav3.1 dels TTCCs es sobreexpressa especialment en els melanomes amb la mutació BRAF^{V600E}, i aquests estan associats amb un augment dels nivells proteics de LC3II, en comparació amb les cèl·lules de melanoma portadores de mutacions NRAS. A més, s'ha descrit que les cèl·lules amb mutació BRAF^{V600E} mostren un increment de l'autofàgia basal, fet que ens reafirma els resultats obtinguts (Armstrong et al. 2011; Corazzari et al. 2015; Giglio et al. 2015; Maddodi et al. 2010). L'autofàgia és una estratègia adaptativa de supervivència induïble que permet a les cèl·lules fer front a diferents tipus d'estímuls mitjançant l'eliminació de components danyats o nocius a través del catabolisme i el reciclatge per mantenir els nutrients i una homeòstasi energètica (Galluzzi et al. 2015; Kroemer et al. 2010). A més, l'autofàgia té un paper clau en la metastasi del melanoma. Per exemple, Xie et al. van descriure que la inhibició de l'autofàgia mitjançant la deleció d'ATG7 o el tractament amb CQ suprimia el creixement de tumors de melanoma i augmentava la supervivència dels ratolins amb cèl·lules melanocítiques portadores de la mutació BRAF^{V600E} i pèrdua de PTEN (Xie et al. 2015). Un altre estudi va revelar que la CQ reduïa el creixement del melanoma i afectava a la invasió i les metastasis de les cèl·lules tumorals (Maes et al. 2016; Maes and Agostinis 2014). Per altra banda, Sharifi et al. van demostrar que la inhibició de l'autofàgia reduïa la migració i la invasió en cèl·lules de càncer de mama i melanoma, i atenuava la inducció de les metastasis mitjançant el bloqueig del flux autofàgic regulat per les proteïnes d'adhesió (Sharifi et al. 2016). En un altre estudi es va demostrar que la combinació de CQ i 5-FU (5-Fluoracil, primera línia de fàrmacs

Discussió

per al càncer colorectal) causava un bloqueig de l'autofàgia amb la consegüent disminució significativa del creixement cel·lular tant *in vitro* com *in vivo* en cèl·lules de càncer de còlon (Sasaki et al. 2012). Totes aquestes publicacions descriuen el bloqueig de l'autofàgia com un mecanisme important a combatre per inhibir o revertir els processos metastàtics de les cèl·lules tumorals.

El nostre treball s'ha centrat en estudiar el paper de l'autofàgia en la migració i la invasió de les cèl·lules de melanoma amb diferent perfil genètic. Els nostres resultats mostren que tant els inhibidors farmacològics dels TTCCs (Mibefradil i Pimozide) com el silenciament gènic de Cav3.1, afecten a la migració i la invasió de les cèl·lules BRAF^{V600E} mitjançant un bloqueig de l'autofàgia. A més, resultats semblants els observem al bloquejar directament l'autofàgia a través del tractament amb CQ o mitjançant el silenciament gènic d'ATG5. Per contra, la inhibició de l'autofàgia, gràcies a tots els mecanismes comentats anteriorment, no afecta ni a la motilitat ni a la invasió *in vitro* de les cèl·lules de melanoma que presenten la mutació en NRAS. En línia amb aquestes troballes, la sobreexpressió de l'oncogen NRAS^{Q61K} als melanomes BRAF^{V600E} recupera els efectes inhibidors del Mibefradil i la CQ sobre la migració cel·lular en les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E}. En resum, en aquest treball demostrem que en presència de la mutació oncogènica NRAS^{Q61K} la capacitat de migració/invasió cel·lular no es veu afectada (no disminueix) quan inhibim l'autofàgia mitjançant Mibefradil o Cloroquina i a més, l'autofàgia basal és més baixa en comparació amb les cèl·lules BRAF^{V600E}. Al contrari, les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} manifesten un augment de la isoforma Cav3.1 dels TTCCs així com majors nivells d'autofàgia basal, i el tractament amb Mibefradil o Cloroquina inhibeix la migració/invasió d'aquestes cèl·lules mitjançant un bloqueig de l'autofàgia.

Per altra banda, vam avaluar l'expressió de Snail1, un factor de transcripció àmpliament conegut que regula i indueix l'EMT (Hao et al. 2012; Olmeda et al. 2007). Vam observar que les línies de melanoma BRAF^{V600E} presentaven nivells més elevats de Snail1 comparat amb les línies BRAF WT. A més, els nivells de Snail1 disminuïen quan es bloquejava l'autofàgia mitjançant CQ o inhibidors dels TTCCs, impedit d'aquesta manera la migració i la invasió cel·lular. De fet, vàrem sobreexpressar Snail1 a una línia cel·lular de melanoma amb mutació de NRAS, i es va observar una inhibició de les capacitats migratòries/invasives de les cèl·lules quan l'autofàgia estava bloquejada. Per contra, amb el silenciament d'aquest factor de transcripció d'EMT es produïa una disminució de la migració i la invasió de les cèl·lules BRAF^{V600E}, simulant l'efecte dels inhibidors dels TTCCs i la CQ. Per tant, l'autofàgia sembla regular la motilitat cel·lular a través de diferents mecanismes on l'expressió de Snail1 hi pot ser determinant (Kenific et al. 2010).

Les mutacions NRAS i BRAF són mútuament excloents en el melanoma (Davies et al., 2002). No obstant, ambdues mutacions presenten una sobreactivació de la via de senyalització MEK-ERK. La via PI3K està directament activada com a resultat de la mutació de NRAS i sovint també en cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} per pèrdua concomitant de PTEN (Griewank et al. 2014; Vu and Aplin 2016). No obstant això, els nostres estudis indiquen que les mutacions BRAF^{V600E} i NRAS^{Q61K} activen mecanismes cel·lulars diferents relacionats amb la progressió del melanoma. S'ha observat que l'activació d'ERK, la diana principal de la mutació BRAF^{V600E}, és la responsable de la inducció de Snail1 en cèl·lules de melanoma (Massoumi et al. 2009). Concretament *Massoumi et al.*, van demostrar que la inhibició farmacològica d'ERK i per tant, de la cascada de la via de senyalització de les MAPKs mitjançant el tractament amb inhibidors de MEK (PD98059 i UO126), induïa una pèrdua gairebé completa de l'expressió de mRNA de Snail1 en cèl·lules de melanoma acompanyant-se d'un increment significatiu dels nivells de mRNA de CYLD, un supressor tumoral amb un paper predominant en la regulació de NF-kappaB. En conseqüència, la sobreexpressió de BRAF^{V600E} en melanòcits epidèrmics humans va resultar en una sobreexpressió de Snail1 gràcies a una disminució de l'expressió de CYLD (Massoumi et al. 2009). En relació amb els nostres resultats, altres grups d'investigació han descrit que el silenciament de Snail1 provoca una disminució del creixement tumoral i bloqueja la progressió i migració del melanoma (Hao et al. 2012; Massoumi et al. 2009). Per altra banda en melanomes BRAF^{V600E}, la fosforilació de Cortactina i de la subunitat exocyst Exo70 després de l'activació d'ERK, regula la secreció de la metal·loproteasa de matriu (MMP-2), i ha estat descrit com un mecanisme rellevant implicat en la migració cel·lular (Lu et al. 2016; Sandri et al. 2016).

Els nostres resultats revelen una nova relació entre l'expressió de Snail1 i l'autofàgia que regula la migració i la invasió en les línies BRAF^{V600E} de melanoma. A més, s'ha descrit que p62 a través del domini UBA modula l'estabilitat de Snail1 (Bertrand et al. 2015). En la mateixa línia, noves evidències indiquen que l'autofàgia no solament està implicada en la degradació de proteïnes i orgànuls, sinó que també pot tenir un paper important en la secreció de proteïnes afectant al microambient del tumor (Kraya et al. 2015; Narita et al. 2011). Un estudi recent, ha relacionat que la via TGFβ/Snail1 indueix EMT de forma paracrina en cèl·lules de melanoma (Lv et al. 2017). A més, en un model de ratolí amb silenciament de GABARAP, un membre de la família ATG8/LC3 relacionat amb la inducció de l'autofàgia, s'ha descrit una reducció dels nivells de TGFβ en sèrum i la inhibició de la progressió tumoral, mitjançant l'estimulació de la resposta immune anti-tumoral i la senyalització de la mort cel·lular programada (Salah et al. 2016). Per tant, tot i la manca d'estudis en

Discussió

consonància amb el nostre treball, els nostres resultats podrien estar relacionats amb la secreció de TGF- β a través de l'autofàgia, mitjançant un augment de Snail1 durant la migració/invasió de les línies de melanoma BRAF^{V600E}. No obstant, per descriure el mecanisme pel qual els nivells de Snail1 disminueixen a través del bloqueig de l'autofàgia necessitem d'una investigació més extensa. Tot i així, és possible que la disminució de Snail1 sigui per una degradació d'aquest factor de transcripció a través del proteasoma quan l'autofàgia està bloquejada (Muqbil et al. 2014).

En una altra direcció, els membres de la família RalGEF, Rala/B, són efectors de les proteïnes RAS que regulen la migració i la invasió de cèl·lules de melanoma amb mutació de NRAS (Vu and Aplin 2016). A més, l'activació constitutiva de Ras-RalGEF estimula la invasió dels melanòcits (Mishra et al. 2010). Per altra banda, la Rho GTPasa, Rac1, s'activa també com a conseqüència de l'activació de NRAS, i la seva inhibició farmacològica o silenciament gènic causa una supressió del creixement del tumor i de la invasió cel·lular en cèl·lules de melanoma NRAS (Li et al. 2012). Aquests i altres estudis reflecteixen que la presència d'una mutació en BRAF o NRAS, activa una gran diversitat de vies de senyalització implicades en la migració de les cèl·lules de melanoma.

En conclusió, els nostres resultats indiquen que les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} mostren nivells més alts d'autofàgia basal, un increment de l'expressió de la isoforma Cav3.1 dels TTCCs i nivells elevats de la proteïna Snail1, en comparació amb altres cèl·lules de melanoma. A més, la capacitat de migració i invasió de les cèl·lules BRAF^{V600E} és sensible al bloqueig de l'autofàgia tant a nivell farmacològic com per silenciament gènic. Per tant, les estratègies farmacològiques mitjançant el bloqueig dels TTCCs i/o la macroautofàgia poden tenir un paper essencial per fer front al desenvolupament i progressió dels melanomes metastàtics, especialment aquells amb mutacions de BRAF.

1. Creació i caracterització de línies cel·lulars de melanoma humà BRAF^{V600E} resistents a Vemurafenib. Anàlisi de l'efecte dels inhibidors (Mibefradil) dels TTCCs sobre l'autofàgia i la mort cel·lular així com sobre els processos de migració i invasió.

El melanoma maligne és una neoplàsia caracteritzada per presentar un ampli ventall de mutacions en múltiples gens amb un mal pronòstic en estadi avançat i per tant, amb un potencial interès en el desenvolupament de teràpies més especialitzades que les que s'utilitzaven fins fa pocs anys (Hao et al. 2015; Najem et al. 2017). El descobriment de mutacions puntuals en BRAF^{V600E}, una quinasa clau en la ruta de senyalització RAS-RAF-MEK-ERK, va conduir al desenvolupament de teràpies moleculars, com ara Vemurafenib o Dabrafenib, orientades al tractament específic del melanoma metastàtic amb aquesta mutació (Manzano et al. 2016). Tots dos fàrmacs inhibeixen l'activitat de la proteïna BRAF mutada, que s'observa en el 40-60% dels melanomes cutanis (Scholtens et al. 2015). Malgrat que aquests inhibidors selectius de BRAF van mostrar en el seu moment una millora en la supervivència lliure de malaltia (PFS) i en la supervivència global (OS), malauradament més del 50% dels pacients desenvolupen resistència a la neoplàsia durant el tractament (després de 5 a 6 mesos de tractament) (Ribas et al. 2014; Shi et al. 2014; Trunzer et al. 2013). Actualment, el Vemurafenib s'administra en combinació amb inhibidors de MEK en pacients amb melanoma BRAF^{V600E} avançat per tal de millorar les taxes de supervivència lliure de malaltia i de la supervivència global. No obstant, tot i que s'han observat taxes de resposta de fins al 70% amb la teràpia dirigida combinada BRAFi/MEKi de primera línia, la durada de les respostes a causa de la resistència adquirida o de la toxicitat general, segueix sent només al voltant d'un any (Eroglu and Ribas 2016). La comprensió de les rutes moleculars alternatives que s'activen durant la resistència als tractaments milloraria l'aplicació clínica de les teràpies específiques a través d'una selecció de pacients més òptima i l'administració de teràpies més personalitzades (Ahronian and Corcoran 2017).

El melanoma presenta una autofàgia constitutiva que, a més, és més important en els melanomes BRAF^{V600E} (Corazzari et al. 2015; Das et al. 2013; Maddodi et al. 2010; Maiques et al. 2018; Maiques et al. 2016). Més recentment, s'ha descrit que l'augment de l'autofàgia està implicat en el mecanisme de resistència secundària als inhibidors de BRAF en melanomes, precedida per l'activació d'ER (Liu et al. 2018; Ma et al. 2014). Els nostres resultats confirmen les dades prèviament publicades respecte a que el tractament amb Vemurafenib de cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} basals indueix el flux autofàgic, a part d'induir mort cel·lular i de reduir la migració cel·lular. No obstant, l'exposició perllongada a Vemurafenib en cèl·lules de melanoma permet l'aparició emergent de clons resistents al fàrmac. Tot i això, més enllà de la modulació de la mort cel·lular, els

Discussió

mecanismes pels quals les cèl·lules amb fenotip resistent adquireixen un augment de l'autofàgia, és encara un tema candent d'estudi (Li et al. 2016; Ma et al. 2014; Martin et al. 2017). Prèviament hem demostrat que la immunoexpressió de la isoforma Cav3.1 dels TTCCs està subrogada als melanomes BRAF^{V600E}, i que s'acompanya paral·lelament d'un augment de la proteïna LC3II en comparació amb els melanomes amb mutació en NRAS (Maiques et al. 2018). En aquest estudi, es descriu que el TTCC Cav3.1 està altament expressat en totes les línies cel·lulars de melanoma resistents a Vemurafenib en comparació amb les línies parentals. A més, les biòpsies FFPE de melanoma aparellades abans i després de la teràpia amb inhibidors de BRAF, mostren un augment de la immunotinció de LC3 i Cav3.1 en les mostres de melanoma humà resistents a la teràpia, reforçant doncs els resultats *in vitro*. L'estudi *in silico* va confirmar aquest lligam entre la presència de melanomes resistents a Vemurafenib i el perfil d'expressió gènica associat amb la via de l'autofàgia. A banda, el nostre grup ha demostrat que la immunoexpressió dels TTCCs augmenta gradualment des de la pell normal fins a les mostres de nevus i melanoma, i en aquest és més important en els tumors primaris més agressius i en les metàstasis, considerant-se com un potencial marcador pronòstic i de progressió en el melanoma (Maiques et al. 2016). En aquesta tesi, mostrem com l'expressió dels TTCCs s'incrementa també durant el procés d'adquisició de resistència en els melanomes.

En conjunt, en aquest treball proposem per primera vegada que la sobreexpressió del TTCC Cav3.1 podria ser un mecanisme clau per a l'adquisició de resistència a l'inhibidor de BRAF en les cèl·lules de melanoma (Büsselberg et al. 2017). Per això, vam proposar-nos estudiar la modulació dels TTCCs i/o la inhibició de l'autofàgia com una possible teràpia per al melanoma resistent a Vemurafenib. Nosaltres ja hem demostrat que la inhibició dels TTCCs provoca la mort cel·lular i disminueix les capacitats de migració i invasió en línies de melanoma BRAF^{V600E} per inhibició de l'autofàgia (Maiques et al. 2018). En aquest estudi mostrem que el bloqueig dels TTCCs també promou una resposta proapoptòtica i inhibeix la migració i la invasió de les cèl·lules de melanoma resistents a Vemurafenib. D'altra banda, hem pogut demostrar que el Mibefradil inhibeix l'autofàgia basal i redueix el creixement tumoral de *xenografts* de ratolins *in vivo* tant sensibles com resistents a Vemurafenib. Aquests resultats suggereixen que la inhibició de l'autofàgia provocada indirectament a través dels inhibidors dels TTCCs, podria ser una eina terapèutica per tal d'induir apoptosi i reduir les taxes de migració i invasió de les cèl·lules resistents als inhibidors de BRAF.

Per altra banda, en el present treball hem estudiat PTEN com a proteïna rellevant en l'adquisició de la resistència a Vemurafenib. PTEN és un gen supressor tumoral que inhibeix la via PI3K (Wu et al. 2003) i la seva pèrdua funcional es produeix en el 10-35% dels melanomes (Manzano et al. 2016). A més, la pèrdua de PTEN coexisteix amb l'activació de la mutació BRAF i s'associa també amb l'aparició de la neoplàsia en estadis avançats (Haluska et al. 2006; Maiques et al. 2016; Manzano et al. 2016). Així, la pèrdua funcional de PTEN s'ha trobat en diversos tipus de tumors sòlids i juga un paper important en la tumorigènesi i l'angiogènesi (Lin et al. 2010). Molts estudis sostenen que la inactivació de PTEN identifica un subconjunt diferenciat clínicament significatiu de melanomes, el que implica que l'estat de PTEN podria afectar al mecanisme molecular de la resistència adquirida soferta al llarg del temps degut als tractaments amb els inhibidors de BRAF (Spagnolo et al. 2014). En aquest context, en el treball actual mostrem que tot i que l'expressió de la isoforma Cav3.1 dels TTCCs és major en gairebé totes les cèl·lules de melanoma resistents a Vemurafenib, quan PTEN no és funcional a causa de la seva deleció o mutació, l'augment dels nivells de mRNA de Cav3.1 encara és major i de manera significativa. A més, el nostre estudi mostra que les teràpies combinades d'un inhibidor dels TTCCs (Mibefradil) juntament amb un inhibidor de BRAF (Vemurafenib) indueixen la mort cel·lular i redueixen la migració de les cèl·lules resistents a Vemurafenib PTEN WT, però promouen un retard en la seva viabilitat i motilitat quan PTEN no és funcional (*knockout* o mutat). Les nostres dades demostren doncs, que els nivells dels TTCCs podrien jugar un paper rellevant en els canvis de resposta dels melanomes resistents a Vemurafenib segons l'estat funcional de PTEN (Zuo et al. 2018). Per a confirmar-ho, vam sobreexpressar PTEN, mitjançant infecció lentiviral, en la línia cel·lular de melanoma amb PTEN *knockout* (PTEN KO (M3)) i després d'uns mesos vam obtenir la línia resistent a Vemurafenib. En aquesta nova línia resistent creada, tot i que els nivells de mRNA de Cav3.1 augmentaven en comparació amb la seva línia sensible corresponent, l'expressió per mRNA de Cav3.1 es trobava disminuïda respecte a les cèl·lules resistents amb PTEN no funcional (M3R). Pel contrari, el silenciament gènic de PTEN en una línia sensible amb PTEN *wild-type* (PTEN WT (A375)) i després de la generació de la resistència a l'inhibidor de BRAF, conduïa a un augment de l'expressió del TTCC Cav3.1 en comparació tant amb la línia cel·lular sensible com també amb la línia cel·lular resistent amb PTEN funcional (A375R). El paper de PTEN en l'adquisició de resistència a les teràpies s'ha proposat en diversos estudis (Spagnolo et al. 2014; Zuo et al. 2018), però l'expressió dels TTCCs segons l'estat funcional de PTEN mai no s'ha demostrat en la resistència a Vemurafenib. Els nostres resultats revelen un vincle desconegut entre l'expressió diferencial del TTCC Cav3.1

Discussió

segons l'estat funcional de PTEN, que atorga un nou lligam en el mecanisme de resistència adquirida en el melanoma.

Avui en dia, segueix existint una necessitat crítica per entendre els nous mecanismes de resistència amb la finalitat de trobar noves estratègies terapèutiques, ja sigui en monoteràpia com en combinació amb els inhibidors farmacològics utilitzats actualment per al tractament del melanoma metastàtic. Aquestes dades permetran el disseny d'un ampli ventall de teràpies per tal d'ampliar i millorar la supervivència d'aquests pacients (Arozarena and Wellbrock 2017; Kamta et al. 2017). Els nostres resultats aporten nous coneixements respecte a la resistència adquirida als inhibidors de BRAF en el melanoma segons l'estat funcional de PTEN que presenten. Malauradament, la resistència a BRAFi és un obstacle important per aconseguir l'èxit esperat de la teràpia del melanoma (Johnson et al. 2015; Spagnolo et al. 2014). Les dades tant *in vitro* com *in vivo* recolzen la idea que l'autofàgia facilita la resistència de les cèl·lules tumorals al tractament terapèutic i que per tant, la inhibició de l'autofàgia podria potenciar la sensibilització terapèutica de les cèl·lules canceroses a les drogues per tal de combatre la progressió tumoral (Sui et al. 2013; Sun et al. 2015; Zou et al. 2013). Diversos inhibidors de l'autofàgia, com ara la CQ i el seu derivat, la HCQ, s'han descrit com a potencials agents terapèutics en monoteràpia o en combinació amb altres fàrmacs, per reduir el creixement tumoral en models preclínics de càncer (Eritja et al. 2017; Sui et al. 2013; Xu et al. 2016). Per tot el descrit, la inhibició de l'autofàgia podria ser una eina terapèutica per combinar amb l'activitat antitumoral dels inhibidors de BRAF (Vemurafenib, Dabrafenib) i prevenir l'aparició de resistències als tractaments (Ma et al. 2014). En suport a aquesta idea, s'ha demostrat que la combinació del silenciament d'ATG5 i la inhibició de MEK augmenta la mort cel·lular en línies cel·lulars de melanoma amb resistència a Vemurafenib (Martin et al. 2015). Notablement, aquest és el primer estudi que utilitza models *in vivo* de *xenografts* de melanoma adreçats a estudiar un bloquejant dels TTCCs (Mibefradil) com a teràpia en combinació amb Vemurafenib en línies de melanoma resistents al fàrmac. No obstant, no hem pogut demostrar que la inhibició dels TTCCs en combinació amb Vemurafenib sigui capaç de millorar l'efecte del Mibefradil en monoteràpia en els melanomes resistents al inhibidor de BRAF. Els nostres resultats descriuen que el tractament combinat pot mostrar una sinèrgia discreta (reducció de viabilitat i migració) en algunes línies cel·lulars resistents, però en canvi, en altres línies la teràpia combinada pot retardar els efectes desitjats de reducció tumoral o viabilitat cel·lular, tot i que a exposicions més llargues del doble tractament s'observen resultats semblants al tractament amb Mibefradil en monoteràpia. Coherentment amb els estudis *in vitro*, amb la teràpia combinada, durant la primera setmana de

tractament, s'observava un creixement tumoral en els tumors subcutanis de ratolins, en canvi, en la segona setmana la teràpia combinada produïa una reducció de la proliferació tumoral de forma similar a la produïda amb el tractament amb Mibefradil en monoteràpia. En aquest sentit, el present estudi aporta una visió molecular de la diferent resposta de les línies de melanoma resistents a Vemurafenib davant l'exposició de la teràpia combinada (inhibidors de l'autofàgia (com els inhibidors dels TTCCs) + Vemurafenib) segons l'estat funcional de PTEN.

Finalment, amb els últims resultats, demostrem que la combinació dels inhibidors de BRAF amb els bloquejants dels TTCCs, com a inhibidors de l'autofàgia, evita l'aparició de resistència a Vemurafenib en les cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E}. Per totes aquestes dades, el nostre estudi suggereix per primera vegada, que potser la inhibició dels TTCCs es podria emprar per evadir el desenvolupament de resistències en pacients amb melanoma BRAF^{V600E} tractats amb Vemurafenib.

Tenint en compte les dades fins a la data, considerem Cav3.1 no només com a biomarcador potencial de la progressió del melanoma (Maiques et al. 2016), sinó també com a diana en el melanoma (Das et al. 2013; Das et al. 2012), especialment en el melanoma BRAF^{V600E} (Maiques et al. 2018), fins i tot en el mecanisme d'adquisició de resistència a Vemurafenib. La manca de tractaments terapèutics efectius contra la progressió del melanoma avançat ha obstaculitzat la capacitat de millorar el pronòstic dels pacients diagnosticats amb aquesta neoplàsia. Segons els nostres resultats, nous composts bioquímics destinats a bloquejar els TTCCs podrien ser una nova i prometedora teràpia vàlida en melanomes ja resistents a Vemurafenib i potser inclús es podrien utilitzar per evadir el mecanisme d'aparició de resistències als inhibidor de BRAF utilitzats actualment en teràpia clínica.

2. Estudi del secretoma de les línies cel·lulars de melanoma metastàtic BRAF^{V600E} resistents a Vemurafenib.

Una de les característiques emergents del càncer és la seva descripció com a masses tumorals complexes i compostes no només per les pròpies cèl·lules canceroses sinó també per cèl·lules immunitàries tant malignes com no malignes que recolzen el creixement tumoral i eviten la seva destrucció per part del sistema immunològic (Hanahan and Weinberg 2011). La comprensió i descripció dels components cel·lulars del microambient tumoral ha ajudat a guiar el disseny de potents teràpies cel·lulars capaces de provocar la regressió de grans càrregues tumorals. Malauradament, un dels principals obstacles és la necessitat de trobar dianes terapèutiques tumorals adequades per aconseguir l'èxit esperat (Chinnasamy et al. 2010). De manera similar a altres tipus de tumors, el melanoma representa un ecosistema complicat, on els queratinòcits, els CAFs i els leucòcits infiltrats es comuniquen amb les cèl·lules tumorals. Aquesta interacció és capaç d'influir substancialment en les propietats biològiques del tumor, inclòs el seu potencial metastàtic i la resistència a la teràpia. La manipulació específica del microambient del melanoma sembla, per tant, una perspectiva terapèutica prometedora, per exemple, en la reversió de la resistència terapèutica adquirida a Vemurafenib en tumors portadors de la mutació en el gen BRAF (Dvořánková et al. 2017; Kodet et al. 2018).

L'ús de medis condicionats a partir de cèl·lules tumorals és un bon mètode (Kim et al. 2015; Su et al. 2012) per diferenciar i descriure el secretoma de cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E} sensibles *versus* el secretoma de cèl·lules resistents. Al nostre laboratori, hem cultivat línies cel·lulars de melanoma sensibles a Vemurafenib amb medis condicionats procedents de línies cel·lulars resistents al fàrmac o amb medis de cultiu que contenen un 10% de plasma de ratolins amb *xenografts* de cèl·lules de melanoma resistents. Després de 2 dies de cultiu, les cèl·lules sensibles modulen el seu comportament i promouen un fenotip d'adquisició de resistència. La interacció entre l'autofàgia i el microambient tumoral pot tenir un paper crucial en la modulació del desenvolupament del tumor, la metastasi i la resistència terapèutica (Yang et al. 2015). En aquest treball, hem demostrat que la inhibició de l'autofàgia mitjançant el bloqueig dels TTCCs amb Mibefradil en cèl·lules de melanoma pre-tractades amb medis condicionats de línies resistents, provoquen la disminució de la viabilitat i de la migració/invasió cel·lular. A més, nosaltres hem descrit per primera vegada que l'efecte de la teràpia combinada (Vem + Mib) juntament amb el microambient tumoral depèn de la mecànica intrínseca (estat funcional de PTEN) de cada línia cel·lular de melanoma. Doncs, les línies de

melanoma amb PTEN funcional pre-tractades amb medis condicionats de resistents, i sota l'exposició dels inhibidors farmacològics (Vem + Mib), redueixen la viabilitat i la migració cel·lular. En canvi, les cèl·lules amb PTEN KO o mutat recuperen la viabilitat cel·lular i les taxes de migració després de l'exposició amb el tractament combinat (Vem + Mib) en combinació amb medis condicionats de resistents. Per tant, tot i que el microambient tumoral (secretoma) influeix en el l'adquisició del fenotip resistent de les cèl·lules sensibles, el mecanisme de resposta davant el tractament combinat dels fàrmacs esmentats, és intrínsec de cada línia cel·lular, indicant una forta interacció entre l'entorn i el mecanisme primari de resistència als BRAFi.

Amb l'objectiu de determinar biomarcadors o dianes diferencials implicades en la resistència terapèutica modulada pel microambient tumoral, en aquest treball hem avaluat el secretoma de les cèl·lules de melanoma tant resistents com sensibles a Vemurafenib mitjançant *arrays* de citoquines. En aquestes condicions, el nostre estudi demostra que les línies de melanoma BRAF^{V600E} resistents a Vemurafenib secreten citoquines al medi de cultiu que promouen la resistència terapèutica a les cèl·lules veïnes, és a dir, a les cèl·lules sensibles al fàrmac. El secretoma conté citoquines associades als macròfags associats a tumors (TAM), els quals poden controlar o afavorir el creixement tumoral. Concretament els TAM amb fenotip M2, són macròfags que es detecten en abundància i són crucials pel desenvolupament del microambient tumoral per tal de fer front a la resposta de les cèl·lules tumorals davant de tractaments citotòxics com la quimioteràpia (Solinas et al. 2009). Els TAM/M2 també juguen un paper rellevant en l'estimulació i promoció de l'angiogènesi, de la immunosupressió, de la migració i invasió cel·lular, i alhora de potenciar l'adquisició de resistències (Qian and Pollard 2010). Així, hem mostrat que les línies resistents a Vemurafenib produeixen, en general, major secreció de citoquines pro-tumorals en comparació amb les cèl·lules parentals, entre les que s'inclou M-CSF, un factor associat als TAM amb fenotip M2. Nombrosos són els estudis que descriuen que les cèl·lules tumorals expressen nivells elevats de M-CSF implicat tant en la progressió tumoral com en la metàstasi, a més, s'ha associat aquesta expressió amb un pitjor pronòstic en diferents càncers com el de pròstata, el de mama o en el carcinoma renal, possiblement a través d'un efecte sobre els macròfags associats a tumors (TAMs) (Giricz et al. 2018; Yagiz and Rittling 2009). Per exemple, *Neubert et al.* van determinar un increment de M-CSF en la sang de pacients amb melanoma en comparació amb els casos sans i aquest augment es correlacionava positivament amb un increment de Lactat Deshidrogenasa (LDH), un marcador de càrrega tumoral, en la sang d'aquests pacients. A més, en aquest mateix estudi es va demostrar que la concentració de M-CSF en sang encara era superior en els pacients de melanoma en estadi IV respecte els pacients en

Discussió

estadi IIIB, indicant que la producció de M-CSF es troba elevada en pacients amb melanoma i que a més s'incrementa la seva secreció durant la progressió tumoral (Neubert et al. 2014). Les nostres dades indiquen que la citoquina M-CSF és secretada per les cèl·lules de melanoma i que a més es troba incrementada en el medi de cultiu de les línies resistents a BRAFi. En aquest sentit, es planteja la hipòtesi que la secreció de M-CSF en cèl·lules tumorals metastàtiques de melanoma no només és important per activar la propagació tumoral sinó que és clau per la seva capacitat per estimular l'adquisició de resistència a la teràpia convencional (Dwyer et al. 2017).

El nostre estudi descriu que una estimulació exògena de M-CSF, mitjançant la proteïna recombinant *rhM-CSF*, produeix una falta de resposta a Vemurafenib sobre la viabilitat i la migració, i per tant, una possible adquisició de resistència al fàrmac en les línies cel·lulars sensibles. Per altra banda, els resultats ens demostren que aquesta adquisició de resistència només s'observa en les línies cel·lulars de melanoma que presenten pèrdua o mutació de PTEN. De fet, quan estimulem amb *rhM-CSF* i Vemurafenib una línia cel·lular amb PTEN funcional, les cèl·lules perden viabilitat i migració/invasió igual que les tractades amb l'inhibidor de BRAF en monoteràpia. En la mateixa línia, quan sobreexpressem PTEN en la línia cel·lular M3 (PTEN KO) i s'estimula amb *rhM-CSF* en combinació amb Vemurafenib no s'aconsegueix un fenotip resistent a la teràpia. Aquest fet suggereix que la citoquina M-CSF podria ser determinant per a l'aparició de recurrències al tractament amb BRAFi en els melanomes amb PTEN no funcional. En aquest context, diversos estudis han analitzat el paper dels macròfags en la mediació de la resistència terapèutica en diferents models tumorals (De Palma and Lewis 2013; Ruffell et al. 2016; Ruffell et al. 2014). De fet, estudis amb co-cultius que utilitzen línies cel·lulars de carcinoma de mama i macròfags derivats de medul·la òssia van revelar una resistència mediada per macròfags a potents quimioterapèutics com ara Paclitaxel, Doxorubicina, i Etopòsid (Ruffell et al. 2016) i a Gemcitabina en cèl·lules murines d'adenocarcinoma pancreàtic (Mitchem et al. 2013).

Els mecanismes observats després de l'adquisició de resistència cel·lular als inhibidors de BRAF resulta en l'augment de l'expressió de diversos receptors tirosina quinasa, com poden ser: el receptor del factor de creixement derivat de plaquetes (PDGFR), el receptor del factor de creixement d'insulina tipus 1 (IGF1R), el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR), el receptor del factor estimulant de la colònia de macròfags (CSF1-R) (Sandri et al. 2016), a més de l'activació d'altres receptors no tirosina quinasa com els receptors transmembrana (G-CSFR) o receptors heterodímers (GM-CSFR) (Hong 2016; Phan et al. 2013). *Giricz O et al.*, van observar una

sobreexpressió de CSF1-R, IL34 i RUNX1 en mostres de melanoma resistents a diferents inhibidors de BRAF en comparació amb els tumors no tractats. Després, van determinar l'eficàcia de la teràpia combinada amb PLX3397 (Pexidartinib, inhibidor de CSF1-R) i PLX4720 (Vemurafenib, inhibidor de BRAF) en cèl·lules de melanoma en cultiu cel·lular, en cultius de cèl·lules 3D, i en un model de *xenograft* murí, i es va trobar que l'efecte combinat era sinèrgic en diverses línies cel·lulars de melanoma (Giricz et al. 2018).

Els inhibidors de CSF1-R o els anticossos contra M-CSF representen una nova i revolucionària classe de fàrmacs immune-moduladors. El bloqueig de CSF1-R o l'ús d'anticossos neutralitzats de M-CSF i la conseqüent inhibició dels TAM, redueix el creixement tumoral en diferents models de tumors com ara en el càncer de pròstata (Hume and Macdonald 2018), en ratolins amb retinopatia isquèmica i osteosarcoma (Kubota et al. 2009) o en glioblastoma i melanoma (Cannarile et al. 2017). En aquest treball es suggereix l'ús de l'anticòs contra M-CSF (mAb M-CSF) com a possible teràpia antitumoral del melanoma per evitar l'adquisició de la resistència farmacològica als inhibidors de BRAF. El nostre estudi revela que l'anticòs neutralitzant de M-CSF no modula ni la viabilitat ni la migració/invasió de les cèl·lules que ja són resistents a Vemurafenib, ni en les cèl·lules de melanoma sensibles. No obstant això, l'anticòs anti-M-CSF és capaç de neutralitzar l'efecte d'aquesta citoquina present en els medis condicionats de línies resistents reduint la migració de les cèl·lules parentals i evitant que les cèl·lules sensibles desenvolupin la recidiva a Vemurafenib. En concordança amb els nostres resultats, *Pyonteck et al.* van demostrar que la intervenció primerenca amb un inhibidor de CSF-1R, BLZ945, va impedir l'inici de la progressió del glioblastoma, mentre que la intervenció tardana va causar un desenvolupament ràpid i robust del tumor després de només una setmana de tractament (Quail and Joyce 2013). En conjunt, les nostres dades suggereixen, que la citoquina M-CSF és determinant durant l'adquisició de resistència als BRAFi de les cèl·lules de melanoma amb PTEN no funcional i que per tant, el seu bloqueig, podria ser clau per evitar l'aparició de la resistència a Vemurafenib.

Mentre que els inhibidors de BRAF han mostrat una taxa de resposta ràpida en pacients amb melanoma que presenten la mutació BRAF^{V600E}, la majoria d'aquests pacients eventualment desenvolupen recidives. En canvi, s'ha demostrat que la immunoteràpia indueix resposta a llarg termini en aquests pacients (Najem et al. 2017; Zuo et al. 2018). De fet, diversos grups han demostrat l'ús d'inhibidors de BRAF en combinació amb agents bloquejants del sistema immunitari, basats en macròfags associats a tumors, com una possible teràpia antitumoral o com a estratègia

Discussió

potencial per a superar l'aparició de resistència als inhibidors de BRAF (Acquavella et al. 2015; Cooper et al. 2014; Koya et al. 2012; Liu et al. 2013). En aquest sentit, *Acquavella et al.* van observar *in vitro* que la combinació de Vemurafenib + Citoquines efectores de cèl·lules T (IFN γ /TNF α) era més efectiva en la inhibició de la proliferació i creixement tumoral que la monoteràpia amb un únic agent en un model de ratolí mutant per BRAF^{V600E} i en línies cel·lulars humanes de melanoma BRAF^{V600E} (Acquavella et al. 2015). En un altre estudi van demostrar que els inhibidors de BRAF poden sincronitzar-se amb el bloqueig de la via PD-1 per estimular la immunitat antitumoral en el melanoma. Doncs, l'administració d'anti-PD-1 o anti-PD-L1 juntament amb un inhibidor de BRAF va prolongar de forma significativa la supervivència dels pacients i va disminuir el creixement tumoral del melanoma, així com també, va provocar un increment del nombre i de l'activitat dels limfòcits tumorals (Cooper et al. 2014). En aquest estudi hem descrit que l'anticòs anti-M-CSF en combinació amb Vemurafenib en medis de cultius de línies resistents indueix mort cel·lular i redueix la migració cel·lular de les línies parentals i evita l'aparició d'un fenotip resistent. En relació amb els nostres resultats, un estudi en fase I, va demostrar un increment de l'efecte antitumoral en pacients amb melanoma avançat amb la mutació BRAF^{V600E} (NCT01826448) que es tractaven amb un inhibidor de CSF1-R, PLX3397, en combinació amb Vemurafenib (PLX4720) (Ngiow et al. 2016).

Malauradament, tot i que la inhibició de CSF-1R/M-CSF pot millorar l'eficàcia del Vemurafenib reduint la infiltració de cèl·lules mieloides immunosupressores, les quals juguen un paper important durant la immunosupressió tumoral (Holmgaard et al. 2016; Mok et al. 2015; Quail and Joyce 2016), el mecanisme basat en la inhibició de CSF1-R/M-CSF mitjançant el qual s'evita la resistència a l'inhibidor de BRAF encara no roman clar. Els limfòcits CD8 infiltrant de tumors suposen un component clau en la resposta immunitària adaptativa contra antígens associats al melanoma (després del tractament amb inhibidors de BRAF). Les cèl·lules CD8 circulants mantenen una forta resposta inflamatòria amb efectes citotòxics. En aquest context, s'estan realitzant assaigs clínics per determinar l'activitat clínica i les vies de senyalització implicades després de la combinació simultània o seqüencial d'inhibidors de BRAF amb immunoterapèutics anti-CTLA4 (Ipilimumab) o anti-PD1/PDL1 (Lambrolizumab, Nivolumab, MPDL3280) (Amin et al. 2014; Jiang et al. 2013; Manzano et al. 2016; Sullivan et al. 2013), o també anti-M-CSF (Emactuzumab, AMG820, IMC-CS4, Cabiralizumab, MCS110, i PD-0360324) (Cannarile et al. 2017).

D'acord amb la literatura, després de l'aparició de la resistència a Vemurafenib, les nostres línies cel·lulars mostren una reactivació de la ruta de les MAPKs, ja que augmenten els nivells de la

proteïna p-ERK. Els nostres resultats estan en concordança amb estudis previs que demostren que la resistència a Vemurafenib està associada a la reactivació de l'eix MEK-ERK (Kwong et al. 2015). S'ha descrit que la unió del lligand a CSF1-R indueix la seva dimerització i promou l'activació de les vies de senyalització de les MAPKs i la via PI3K/AKT (Achkova and Maher 2016), fet que podria associar-se amb un increment de la secreció de M-CSF observat durant la resistència (Gircz et al. 2018). *Gircz et al.* van mostrar una correlació entre els nivells de CSF1-R i una major expressió de RUNX1 i IL-34 i ho van associar amb un augment de la fosforilació d'ERK. Sembla que l'administració d'inhibidors de CSF1-R/M-CSF bloqueja completament la fosforilació d'ERK evitant el mecanisme de resistència. Per contra, l'addició de M-CSF accelera el mecanisme de rebot (hiperactivació de noves vies de senyalització) causat per la inhibició de BRAF a les cèl·lules, el qual pot atenuar-se mitjançant la combinació d'inhibidors de BRAF^{V600E} i de CSF1-R. Les vies de senyalització hiperactivades per la inhibició de BRAF (mecanisme de rebot de la via ERK), està àmpliament descrit que s'associa amb la hiperactivació de la via PI3K/AKT (Gircz et al. 2018; Shi et al. 2014). Per tot això, en aquest treball es suggereix que la inhibició dual de BRAF (Vemurafenib) i M-CSF (mAb anti M-CSF) pot ser una diana estratègica per evitar la resistència terapèutica en melanomes BRAF^{V600E}, i conseqüentment, evitar l'activació de la via de senyalització PI3K/AKT. Altres estudis proposen que M-CSF estimula la via NF-κB i per tant, la supervivència cel·lular tant dels macròfags derivats de monòcits humans com de macròfags murins (Wang et al. 2011) i en cèl·lules murines de càncer de mama (Yang et al. 2014). El bloqueig de M-CSF s'associa amb una reducció de la fosforilació de p65 en la Ser276 induïda per M-CSF (Wang et al. 2011), el que explicaria una altra via de senyalització per la qual es podria evitar la resistència adquirida i conseqüentment, millorar la supervivència dels pacients amb melanoma tractats amb l'anticòs monoclonal contra M-CSF.

En conclusió, l'administració d'anticossos monoclonals anti-M-CSF evita la unió de M-CSF al seu receptor CSF1-R, que s'expressa en diverses cèl·lules immunes, com monòcits i macròfags, i en les cèl·lules tumorals. Aquest esdeveniment impedeix l'activació de CSF1-R i la seva senyalització en aquestes cèl·lules, que condueix a la inhibició de l'activitat i la proliferació de macròfags associats a tumors (TAM) dependents de CSF1-R, i per tant repercuteix en el microambient tumoral reduint la immunosupressió creada pels TAM. A més, amb la teràpia anti-M-CSF s'aconsegueix disminuir les cèl·lules T reguladores (Tregs) o activar el sistema immunològic per tal de millorar les respostes antitumorals de les cèl·lules de melanoma (Chaudhary and Elkord 2016; Takeuchi and Nishikawa 2016).

Discussió

En conjunt, els nostres resultats preliminars indiquen un paper rellevant de l'anticòs anti-M-CSF com una estratègia terapèutica prometedora en combinació amb Vemurafenib per millorar la resposta antitumoral dels inhibidors de BRAF.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- PRIMERA.** La isoforma Cav3.1 dels TTCCs s'expressa a nivells més alts en les línies cel·lulars i biòpsies de melanoma amb la mutació BRAF^{V600E}, i es correlaciona amb un increment dels nivells d'autofàgia basals.
- SEGONA.** Els inhibidors farmacològics dels TTCCs, el silenciament gènic o la Cloroquina, inhibeixen els processos de migració i invasió només en les cèl·lules portadores de la mutació BRAF^{V600E} gràcies a la inhibició del flux autofàgic.
- TERCERA.** Les línies cel·lulars i les mostres de melanoma metastàtic BRAF^{V600E} presenten nivells d'expressió més elevats de Snail1, que és essencial en l'activació dels processos de migració i de l'autofàgia basal. La immunoexpressió de Snail1 nuclear és més intensa en biòpsies humanes de melanoma metastàtic amb la mutació BRAF^{V600E} que en les biòpsies *wild-type*.
- QUARTA.** Les línies cel·lulars i les biòpsies de melanoma BRAF^{V600E} resistents als inhibidors de BRAF presenten una sobreexpressió de la isoforma Cav3.1 dels TTCCs en comparació amb la línia o biòpsia parental corresponent, així com un increment dels marcadors d'autofàgia basal.
- CINQUENA.** L'inhibidor dels TTCCs, Mibefradil, indueix apoptosi i redueix la proliferació cel·lular i les taxes de migració i invasió, mitjançant un bloqueig de l'autofàgia, en cèl·lules de melanoma resistents a Vemurafenib tant *in vitro* com en *xenografts* de ratolins SCID *in vivo*.
- SISENA.** La teràpia combinada (Vemurafenib + Mibefradil) no ofereix avantatges sobre la monoteràpia amb Mibefradil en melanomes BRAF^{V600E} resistents, ni *in vitro* ni *in vivo*; i redueix o retarda la viabilitat cel·lular i les taxes de migració i invasió segons l'estat funcional de PTEN.
- SETENA.** L'inhibidor dels TTCCs, Mibefradil, impedeix l'adquisició d'un fenotip de resistència cel·lular al co-tractar amb Vemurafenib cèl·lules de melanoma BRAF^{V600E}.

Conclusions

- VUITENA.** El secretoma de cèl·lules en cultiu (medis condicionats) de melanomes resistents a Vemurafenib, indueix i modula el fenotip de resistència al inhibidor de BRAF^{V600E} (Vemurafenib) en les cèl·lules parentals.
- NOVENA.** El secretoma de les línies cel·lulars de melanoma resistents a Vemurafenib presenta un increment de citoquines pro-tumorals entre les que s'inclou M-CSF, la qual és determinant per a l'adquisició de resistència en els melanomes BRAF^{V600E} amb PTEN no funcional (*knockout* o mutació).
- DESENA.** La neutralització de M-CSF amb l'anticòs monoclonal, inhibeix l'adquisició de resistència a Vemurafenib en els melanomes BRAF^{V600E} amb PTEN no funcional.
- ONZENA.** El plasma de ratolins procedent de *xenografts* de línies de melanoma resistents a Vemurafenib, indueix un fenotip de resistència en les cèl·lules parentals en cultiu. La neutralització de la citoquina M-CSF del plasma reverteix aquest fenotip de resistència.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Abbasi NR, Shaw HM, Rigel DS, Friedman RJ, McCarthy WH, Osman I, et al. Early Diagnosis of Cutaneous Melanoma. *JAMA*. 2004;292(22):2771

Achkova D, Maher J. Role of the colony-stimulating factor (CSF)/CSF-1 receptor axis in cancer. *Biochemical Society Transactions*. 2016;44(2):333–41

Acquavella N, Clever D, Yu Z, Roelke-Parker M, Palmer DC, Xi L, et al. Type I Cytokines Synergize with Oncogene Inhibition to Induce Tumor Growth Arrest. *Cancer Immunology Research*. 2015;3(1):37–47 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25358764>

Ahronian LG, Corcoran RB. Strategies for monitoring and combating resistance to combination kinase inhibitors for cancer therapy. *Genome Medicine*; 2017;1–12

Amann VC, Ramelyte E, Thurneysen S, Pitocco R, Bentele-Jaberg N, Goldinger SM, et al. Developments in targeted therapy in melanoma. *European Journal of Surgical Oncology*. 2017;43(3):581–93

Amaral T, Sinnberg T, Meier F, Krepler C, Levesque M, Niessner H, et al. MAPK pathway in melanoma part II—secondary and adaptive resistance mechanisms to BRAF inhibition. *European Journal of Cancer*. Elsevier Ltd; 2017;73:93–101

Amin A, Plimack ER, Infante JR, Ernstoff MS, Rini BI, McDermott DF, et al. Nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558, ONO-4538) in combination with sunitinib or pazopanib in patients (pts) with metastatic renal cell carcinoma (mRCC). *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology ; 2014;32(15_suppl):5010–5010 Available from: http://ascopubs.org/doi/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.5010

Apel A, Herr I, Schwarz H, Rodemann HP, Mayer A. Blocked Autophagy Sensitizes Resistant Carcinoma Cells to Radiation Therapy. 2008;(7):1485–95

Apelo SIA, Lamming DW. Rapamycin : An InhibiTOR of Aging Emerges From the Soil of Easter Island. 2016;71(7):841–9

Arico S, Petiot A, Bauvy C, Dubbelhuis PF, Meijer AJ, Codogno P, et al. The Tumor Suppressor PTEN Positively Regulates Macroautophagy by Inhibiting the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(38):35243–6

Aris M, Mordoh J, Barrio MM. Immunomodulatory monoclonal antibodies in combined immunotherapy trials for cutaneous melanoma. *Frontiers in Immunology*. 2017;8(AUG):1–15

Armstrong JL, Corazzari M, Martin S, Pagliarini V, Falasca L, Hill DS, et al. Cancer Therapy : Preclinical Oncogenic B-RAF Signaling in Melanoma Impairs the Therapeutic Advantage of Autophagy Inhibition. 2011;17(8):2216–27

Arozarena I, Wellbrock C. Overcoming resistance to BRAF inhibitors. 2017;5(4):1–12

Arrington JH, Reed RJ, Ichinose H, Kremetz ET. Plantar lentiginous melanoma: a distinctive variant of human cutaneous malignant melanoma. *The American journal of surgical pathology*. 1977;1(2):131–43

Ascierto PA, Eggermont AMM. Neoadjuvant therapy in melanoma: the next step? *The Lancet Oncology*. Elsevier Ltd; 2018;2045(18):30015–6

Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob J, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. 2012;1–9

Ávalos Y, Canales J, Bravo-Sagua R, Criollo A, Lavandero S, Quest AFG, et al. Tumor Suppression and Promotion by Autophagy. *BioMed Research International*. 2014;2014:1–15

Aya F, Fernandez-Martinez A, Gaba L, Victoria I, Tosca M, Pineda E, et al. Sequential treatment with immunotherapy and BRAF inhibitors in BRAF-mutant advanced melanoma. *Clinical and Translational Oncology*. Springer Milan; 2017;19(1):119–24

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(36):6199–206

Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath:

Bibliografia

- Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*. 2017;7(1):16878 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29203879>
- Banzi M, De Blasio S, Lallas A, Longo C, Moscarella E, Alfano R, et al. Dabrafenib: a new opportunity for the treatment of BRAF V600-positive melanoma. *OncoTargets and therapy*. Dove Press; 2016;9:2725–33
- Berger A, Quast SA, Plötz M, Kuhn NF, Trefzer U, Eberle J. RAF inhibition overcomes resistance to TRAIL-induced apoptosis in melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014;134(2):430–40
- Bernal M, Souza DLB, Gomez G, Gomez FJ. Projections of Incidence, Prevalence and Mortality from Melanoma in Spain. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*. 2013;3(2):1–6
- Bertrand M, Petit V, Jain A, Amsellem R, Johansen T, Larue L, et al. SQSTM1/p62 regulates the expression of junctional proteins through epithelial-mesenchymal transition factors. *Cell Cycle*. 2015;14(3):364–74
- Berwick M, Buller DB, Cust A, Gallagher R, Lee TK, Meyskens F, et al. *Melanoma*. 2015.
- Bhutia SK, Mukhopadhyay S, Sinha N, Das DN, Panda PK, Patra SK, et al. Autophagy. *Advances in cancer research*. 2013 [cited 2019 Jan 22]. p. 61–95 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23768510>
- Blake P, Swart AM, Orton J, Kitchener H, Whelan T, Lukka H, et al. Adjuvant external beam radiotherapy in the treatment of endometrial cancer (MRC ASTEC and NCIC CTG EN.5 randomised trials): pooled trial results, systematic review, and meta-analysis. *The Lancet*. 2009;373(9658):137–46 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19070891>
- Boone B, Jacobs K, Ferdinande L, Lambert J, Bracke M, Pauwels P, et al. EGFR in melanoma : clinical significance and potential therapeutic target. 2011;492–502
- Boya P, González-Polo R-A, Casares N, Perfettini J-L, Dessen P, Larochette N, et al. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(3):1025–40
- Bracher A, Cardona AS, Tauber S, Fink AM, Steiner A, Pehamberger H, et al. Epidermal Growth Factor Facilitates Melanoma Lymph Node Metastasis by Influencing Tumor Lymphangiogenesis. 2013;133
- Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of surgery*. 1970;172(5):902–8
- Büsselberg D, Florea A-M, Büsselberg D, Florea A-M. Targeting Intracellular Calcium Signaling ([Ca²⁺]_i) to Overcome Acquired Multidrug Resistance of Cancer Cells: A Mini-Overview. *Cancers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2017;9(12):48 Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6694/9/5/48>
- Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg AM, Ries CH, Rüttinger D. Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*; 2017;5(1):1–13
- Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, Del Barrio MG, et al. The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology*. 2000;2(2):76–83
- Capiod T. The need for calcium channels in cell proliferation. Recent patents on anti-cancer drug discovery. 2013;8(1):4–17 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22519598>
- Carlino MS, Haydu LE, Kakavand H, Menzies AM, Hamilton AL, Yu B, et al. Correlation of BRAF and NRAS mutation status with outcome, site of distant metastasis and response to chemotherapy in metastatic melanoma. *British Journal of Cancer*. 2014;111(2):292–9
- Carlomagno F, Anaganti S, Guida T, Salvatore G, Troncione G, Wilhelm SM, et al. BAY 43-9006 Inhibition of Oncogenic RET Mutants. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(5):326–34 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16507829>
- Carlson JA, Ross JS, Slominski A, Linette G, Mysliborski J, Hill J, et al. Molecular diagnostics in melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2005;52(5):743–75

- Catterall WA. Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2000;16(1):521–55 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11031246>
- cBioPortal(<http://cancergenome.nih.gov/>). Home - The Cancer Genome Atlas - Cancer Genome - TCGA [Internet]. [cited 2019 Jan 25]. Available from: <https://cancergenome.nih.gov/>
- Chaudhary B, Elkord E. Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting. *Vaccines*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2016;4(3) Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27509527>
- Chemin J, Monteil A, Perez-Reyes E, Nargeot J, Lory P. Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization; 2001;20(24):7033–40 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742980>
- Chen J-J, Cai N, Chen G-Z, Jia C-C, Qiu D-B, Du C, et al. The neuroleptic drug pimozide inhibits stem-like cell maintenance and tumorigenicity in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(11):17593–609
- Chen CF, Corbley MJ, Roberts TM, Hess P. Voltage-sensitive calcium channels in normal and transformed 3T3 fibroblasts. *Science (New York, N.Y.)*. 1988;239(4843):1024–6
- Chen DL, Engle JT, Griffin EA, Miller JP, Chu W, Zhou D, et al. Imaging Caspase-3 Activation as a Marker of Apoptosis-Targeted Treatment Response in Cancer. *Molecular Imaging and Biology*. 2015;17(3):384–93 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25344147>
- Chen Y, Klionsky DJ. The regulation of autophagy - unanswered questions. *Journal of Cell Science*. 2011;124(2):161–70 Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.064576>
- Chen S, Wang C, Yeo S, Liang CC, Okamoto T, Sun S, et al. Distinct roles of autophagy-dependent and -independent functions of FIP200 revealed by generation and analysis of a mutant knock-in mouse model. *Genes and Development*. 2016;30(7):856–69
- Chin L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2003;3(8):559–70
- Chinnasamy D, Yu Z, Theoret MR, Zhao Y, Shrimali RK, Morgan RA, et al. Gene therapy using genetically modified lymphocytes targeting VEGFR-2 inhibits the growth of vascularized syngenic tumors in mice. 2010;120(11):3953–68
- Chockalingam S, Ghosh SS. Macrophage colony-stimulating factor and cancer: a review. *Tumor Biology*. 2014;35(11):10635–44 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25238879>
- Chude CI, Amaravadi RK. Targeting autophagy in cancer: Update on clinical trials and novel inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(6)
- Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(October):813–24
- Cicchini M, Karantza V, Xia B. Molecular pathways: Autophagy in cancer-A matter of timing and context. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(3):498–504
- Clark WH, Ainsworth AM, Bernardino EA, Yang CH, Mihm CM, Reed RJ. The developmental biology of primary human malignant melanomas. *Seminars in oncology*. 1975;2(2):83–103
- Clark WH. J, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. *Cancer Res*. 1969;29(3):705–27
- clinicaltrials.gov. Search of: mibefradil - List Results - ClinicalTrials.gov.
- Cooper ZA, Juneja VR, Sage PT, Frederick DT, Piris A, Mitra D, et al. Response to BRAF Inhibition in Melanoma Is Enhanced When Combined with Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Immunology Research*. 2014;2(7):643–54 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24903021>
- Corazzari M, Rapino F, Ciccocanti F, Giglio P, Antonioli M, Conti B, et al. Oncogenic BRAF induces chronic ER stress condition resulting in increased

Bibliografia

- basal autophagy and apoptotic resistance of cutaneous melanoma. *Cell Death & Differentiation*. 2015;22(6):946–58 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25361077>
- Cui J, Gong Z, Shen H-M. The role of autophagy in liver cancer: Molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2013;1836(1):15–26 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23428608>
- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(20):2135–47 Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa050092>
- Damian D, Gorfine M. Statistical concerns about the GSEA procedure. *Nature Genetics*. 2004;36(7):663–663
- Dankort D, Curley DP, Carlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky Jr WE, et al. BrafV600E cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nature Genetics*. 2009;41(5):544–52 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19282848>
- Das A, Pushparaj C, Bahí N, Sorolla A, Herreros J, Pamplona R, et al. Functional expression of voltage-gated calcium channels in human melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Research*. 2012;25(2):200–12
- Das A, Pushparaj C, Herreros J, Nager M, Vilella R, Portero M, et al. T-type calcium channel blockers inhibit autophagy and promote apoptosis of malignant melanoma cells. *Pigment cell & melanoma research*. 2013;26(6):874–85
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. Nature Publishing Group; 2002;417(6892):949–54
- De Palma M, Lewis CE. Macrophage Regulation of Tumor Responses to Anticancer Therapies. *Cancer Cell*. 2013;23(3):277–86 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23518347>
- Deegan S, Saveljeva S, Gorman AM, Samali A. Stress-induced self-cannibalism: On the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013;70(14):2425–41
- Delbaldo C, Faivre S, Dreyer C, Raymond E. Sunitinib in advanced pancreatic neuroendocrine tumors: latest evidence and clinical potential. 2011;9–18
- Delou JMA, Biasoli D, Borges HL. The complex link between apoptosis and autophagy: A promising new role for RB. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2016;88(4):2257–75
- Dervisis N, Klahn S. Therapeutic Innovations: Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer. *Veterinary Sciences*. 2016;3(1):4
- Dewaele M, Rubio N, Habraken Y, Coupienne I, Fulda S, Agostinis P, et al. NF-kappaB inhibition improves the sensitivity of human glioblastoma cells to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. 2011;81:606–16
- Dewing D, Emmett M, Pritchard Jones R, Dewing D, Emmett M, Jones RP. The Roles of Angiogenesis in Malignant Melanoma: Trends in Basic Science Research over the Last 100 Years. *ISRN oncology*. 2012;2012:546927
- Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, Hayward R, Savage K, Delmas V, et al. Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice. *Cancer Cell*. Elsevier Ltd; 2009;15(4):294–303 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.02.022>
- Ding W-X, Ni H-M, Gao W, Chen X, Kang JH, Stolz DB, et al. Oncogenic transformation confers a selective susceptibility to the combined suppression of the proteasome and autophagy. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2009;8(7):2036–45 Available from: <http://mct.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1535-7163.MCT-08-1169>
- Disis ML. Clinical use of subcutaneous G-CSF or GM-CSF in malignancy. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. 2005;19(4 Suppl 2):5–9 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15934493>
- Dolphin AC. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. *The Journal of*

- physiology. Wiley-Blackwell; 2016;594(19):5369–90 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27273705>
- Dummer R, Flaherty KT. Resistance patterns with tyrosine kinase inhibitors in melanoma: New insights. *Current Opinion in Oncology*. 2012;24(2):150–4
- Dummer R, Siano M, Hunger RE, Lindenblatt N, Braun R, Michielin O, et al. The updated Swiss guidelines 2016 for the treatment and follow-up of cutaneous melanoma. 2016;(February):1–9
- Duque GA, Descoteaux A. Macrophage cytokines : involvement in immunity and infectious diseases. 2014;5(October):1–12
- Dvořánková B, Szabo P, Kodet O, Strnad H, Kolář M, Lacina L, et al. Intercellular crosstalk in human malignant melanoma. *Protoplasma*. 2017;254(3):1143–50
- Dwyer AR, Greenland EL, Pixley FJ. Promotion of tumor invasion by tumor-associated macrophages: The role of CSF-1-activated phosphatidylinositol 3 kinase and Src family kinase motility signaling. *Cancers*. 2017;9(6):1–15
- Ekwueme DU, Guy GP, Li C, Rim SH, Parelkar P, Chen SC. The health burden and economic costs of cutaneous melanoma mortality by race/ethnicity-United States, 2000 to 2006. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Elsevier Inc; 2011;65(5 SUPPL. 1):S133.e1-S133.e12 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2011.04.036>
- Elder DE, Gimotty PA, Guerry D. Cutaneous melanoma: Estimating survival and recurrence risk based on histopathologic features. *Dermatologic Therapy*. 2005;18(5):369–85
- Elias EG, Hasskamp JH, Sharma BK. Cytokines and Growth Factors Expressed by Human Cutaneous Melanoma. 2010;794–808
- Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: Opportunities, challenges and limitations. *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2009;9(8):550–62 Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2664>
- Eritja N, Chen BJ, Rodríguez-Barrueco R, Santacana M, Gatus S, Vidal A, et al. Autophagy orchestrates adaptive responses to targeted therapy in endometrial cancer. *Autophagy*. 2017;13(3):608–24
- Eroglu Z, Ribas A. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma : latest evidence and place in therapy. 2016;48–56
- European Cancer Observatory (EUCAN) <http://eco.iarc.fr>. Cancer burden statistics and trends across Europe | ECIS [Internet]. [cited 2019 Feb 13]. Available from: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>
- Fabo EC De, Noonan FP, Fears T, Merlino G. Advances in Brief Ultraviolet B but not Ultraviolet A Radiation Initiates Melanoma. *Geophysical Research Letters*. 2004;6372–6
- Faião-Flores F, Alves-Fernandes DK, Pennacchi PC, Sandri S, Vicente ALSA, Scapulatempo-Neto C, et al. Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2017;36(13):1849–61 Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2016.348>
- Faries M Thompson J Cochran A Andtbacka R Mozzillo N et. al. Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(23):2211–22
- Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(23):8204–9
- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Reprint of: Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*. 2015;51(9):1201–2 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>
- Filippi-Chiela EC, Viegas MS, Thomé MP, Buffon A, Wink MR, Lenz G. Modulation of Autophagy by Calcium Signalosome in Human Disease. *Molecular Pharmacology*. 2016;90(3)
- Foong S, Meeth KM, Stannard K, Barkauskas DS, Bollag G. Co-inhibition of colony stimulating factor-1 receptor and BRAF oncogene in mouse models of

Bibliografia

- BRAF V600E melanoma. *Oncolmmunology*. Taylor & Francis; 2016;5(3):1–11 Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2015.1089381>
- Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: Modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2015;16(6):329–44 Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3999>
- Fulda S. Autophagy in Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*. 2017;7(June):1–4 Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2017.00128/full>
- Galizzi JP, Fosset M, Romey G, Laduron P, Lazdunski M. Neuroleptics of the diphenylbutylpiperidine series are potent calcium channel inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(19):7513–7
- Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*. 2017;36(13):1811–36 Available from: <http://emboj.embopress.org/lookup/doi/10.15252/emboj.201796697>
- Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *The EMBO journal*. 2015;34(7):856–80
- Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling*. 2013;6(269):p11
- Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long G V., Ross MI, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2017;67(6):472–92 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29028110>
- Geserick P, Herlyn M, Leverkus M. On the TRAIL to Overcome BRAF-Inhibitor Resistance. *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier Masson SAS; 2014;134(2):315–8 Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2013.348>
- Gibney GT, Smalley KSM. An Unholy Alliance: Cooperation between BRAF and NF1 in Melanoma Development and BRAF Inhibitor Resistance. *Cancer Discovery*. 2013;3(3):260–3 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23475878>
- Giglio P, Fimia GM, Lovat PE, Piacentini M, Corazzari M. Fateful music from a talented orchestra with a wicked conductor: Connection between oncogenic BRAF, ER stress, and autophagy in human melanoma. 2015;(September):2–4
- Gircz O, Mo Y, Dahlman KB, Cotto-rios XM, Vardabasso C, Nguyen H, et al. The RUNX1 / IL-34 / CSF-1R axis is an autocrinally regulated modulator of resistance to BRAF-V600E inhibition in melanoma. 2018;3(14):1–21
- Gonzalez A. Sentinel Lymph Node Biopsy : Past and Present Implications for the Management of Cutaneous Melanoma with Nodal Metastasis. *American Journal of Clinical Dermatology*. Springer International Publishing; 2018;19(s1):24–30 Available from: <https://doi.org/10.1007/s40257-018-0379-0>
- Gonzalez-Polo R-A, Boya P, Pauleau A-L, Jalil A, Larochette N, Souquère S, et al. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *Journal of Cell Science*. 2005;118(14):3091–102 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15985464>
- Gordon MS. Interferon Alpha Adjuvant Therapy in Patients With High-Risk Melanoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *Yearbook of Medicine*. Elsevier Ltd; 2010;2010:175–6
- Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*. 2004;23(16 REV. ISS. 2):2891–906
- Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. 2007;445(7130):851–7
- Griewank KG, Murali R, Puig-Butille JA, Schilling B, Livingstone E, Potrony M, et al. TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous melanoma. *Journal of the*

- National Cancer Institute. 2014a;106(9)
- Griewank KG, Scolyer RA, Thompson JF, Flaherty KT, Schadendorf D, Murali R. Genetic alterations and personalized medicine in melanoma: progress and future prospects. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014b;106(2):djt435
- Groblewska M, Mroczko B. Serum levels of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in pancreatic cancer patients. 2007;45(1):30–4
- Gugnoni M, Sancisi V, Manzotti G, Gandolfi G, Ciarrocchi A. Autophagy and epithelial-mesenchymal transition: an intricate interplay in cancer. *Cell death & disease*. Nature Publishing Group; 2016;7(12):e2520 Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2016.415>
- Gump JM, Thorburn A. Autophagy and apoptosis-what's the connection? *Jacob. Trends Cell Biology*. 2013;21(7):387–92
- Gurkoff G, Shahlaie K, Lyeth B, Berman R. Voltage-Gated Calcium Channel Antagonists and Traumatic Brain Injury. 2013;788–812
- Haluska FG, Tsao H, Wu H, Haluska FS, Lazar A, Goel V. Genetic Alterations in Signaling Pathways in Melanoma. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(7):2301s–2307s Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16609049>
- Hanahan D, Weinberg RA. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*. Elsevier Inc.; 2011;144(5):646–74 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Springer US; 2018;19(9):579–93
- Hao L, Ha JR, Kuzel P, Garcia E, Persad S. Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. *British Journal of Dermatology*. 2012;166(6):1184–97 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22332917>
- Hao M, Song F, Du X, Wang G, Yang Y, Chen K, et al. Advances in targeted therapy for unresectable melanoma: New drugs and combinations. *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2015;359(1):1–8 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.050>
- Hardy KM, Booth BW, Hendrix MJC, Salomon DS, Strizzi L. ErbB/EGF signaling and EMT in mammary development and breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. NIH Public Access; 2010;15(2):191–9 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20369376>
- He C, Klionsky DJ. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual Review of Genetics*. 2009;43(1):67–93
- Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, Nourry A, Niculescu-Duvas I, Dhomen N, et al. Kinase-Dead BRAF and Oncogenic RAS Cooperate to Drive Tumor Progression through CRAF. *Cell*. Elsevier Ltd; 2010;140(2):209–21 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.040>
- Herraiz C, Jiménez-Cervantes C, Sánchez-Laorden B, García-Borrón JC. Functional interplay between secreted ligands and receptors in melanoma. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd; 2018;78:73–84
- Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. *Cellular Signalling*. Elsevier Inc.; 2011;23(10):1515–27 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.004>
- Hirooka K, Bertolesi GE, Kelly MEM, Denovan-Wright EM, Sun X, Hamid J, et al. T-Type calcium channel alpha1G and alpha1H subunits in human retinoblastoma cells and their loss after differentiation. *Journal of neurophysiology*. 2002;88(1):196–205
- Højberg L, Bastholt L, Schmidt H. Interleukin-6 and melanoma. 2012;6:327–33
- Hoeller C, Michielin O, Ascierto PA, Szabo Z, Blank CU. Systematic review of the use of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2016;65(9):1015–34 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27372293>
- Holmgaard RB, Brachfeld A, Gasmí B, Jones DR, Mattar M, Doman T. Timing of CSF-1 / CSF-1R signaling blockade is critical to improving responses

Bibliografia

- to CTLA-4 based immunotherapy. *Oncolmmunology*. Taylor & Francis; 2016;5(7):1–15 Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2016.1151595>
- Hong IS. Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types. *Experimental and Molecular Medicine*. Nature Publishing Group; 2016;48(7):e242-8
- Huang J-B, Kindzelskii AL, Clark AJ, Petty HR. Identification of channels promoting calcium spikes and waves in HT1080 tumor cells: their apparent roles in cell motility and invasion. *Cancer research*. 2004;64(7):2482–9
- Huang Y, Lin M, Chen X, Huang C, Zhang X, Chen L, et al. Evaluation of the prognostic and physiological functions of death associated protein kinase 1 in breast cancer. *Oncology Letters*. 2018;8261–8 Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.8439>
- Huang W, Lu C, Wu Y, Ouyang S, Chen Y. T-type calcium channel antagonists, mibefradil and NNC-55-0396 inhibit cell proliferation and induce cell apoptosis in leukemia cell lines. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2015;34(1):54 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25989794>
- Huc S, Monteil A, Bidaud I, Barbara G, Chemin J, Lory P. *Biochimica et Biophysica Acta* Regulation of T-type calcium channels: Signalling pathways and functional implications. *BBA - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V.; 2009;1793(6):947–52 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.11.003>
- Hügel R, Muendlein A, Volbeding L, Drexel H, Richtig E, Wehkamp U, et al. Serum levels of hepatocyte growth factor as a potential tumor marker in patients with malignant melanoma. 2016;354–60
- Hugo W, Shi H, Sun L, Piva M, Song C, Kong X, et al. Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. *Cell*. 2015;162(6):1271–85 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26359985>
- Hume DA, Macdonald KPA. Review article Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. 2018;119(8):1810–21
- Hurley JH, Young LN. Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annual Review of Biochemistry*. 2017;86(1):225–44 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28301741>
- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*. 2002;4(9):648–57
- Inoue S, Hartman A, Branch CD, Bucana CD, Bekele BN, Stephens LC, et al. mda-7 in Combination with Bevacizumab Treatment Produces a Synergistic and Complete Inhibitory Effect on Lung Tumor Xenograft. *Molecular Therapy. The American Society of Gene Therapy*; 2007;15(2):287–94 Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mt.6300035>
- Instituto Nacional del Cancer. Cáncer en español - National Cancer Institute [Internet]. [cited 2019 Jan 25]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol>
- Jakob JA, Bassett RL, Ng CS, Curry JL, Joseph RW, Alvarado GC, et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer*. NIH Public Access; 2012;118(16):4014–23
- Jenkins MH, Brinckerhoff CE, Mullins DW. CXCR3 Signaling in BRAFWT melanoma increases IL-8 expression and tumorigenicity. *PLoS ONE*. 2015;10(3):1–17
- Jeong WJ, Cha PH, Choi KY. Strategies to overcome resistance to epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy in metastatic colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(29):9862–71
- Jia H, Ren W, Feng Y, Wei T, Guo M, Guo J, et al. The enhanced antitumour response of pimozone combined with the IDO inhibitor L - MT in melanoma. 2018;949–60
- Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, Wargo J, Hodi FS. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clinical*

- Cancer Research. 2013;19(3):598–609
- Johnson A. Atlas de dermatología clínica. 2013.
- Johnson DB, Menzies AM, Zimmer L, Eroglu Z, Ye F, Zhao S, et al. Acquired BRAF inhibitor resistance: A multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms. *European Journal of Cancer*. 2015;51(18):2792–9 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26608120>
- Johnston AN, Bu W, Hein S, Garcia S, Camacho L, Xue L, et al. Hyperprolactinemia-inducing antipsychotics increase breast cancer risk by activating JAK-STAT5 in precancerous lesions. 2018;1–13
- Kamta J, Chaar M, Ande A, Altomare DA, Ait-Oudhia S. Advancing Cancer Therapy with Present and Emerging Immuno-Oncology Approaches. *Frontiers in Oncology*. 2017;7:64 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28459041>
- Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group; 2011;18(4):571–80 Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2010.191>
- Karagiannis GS, Pavlou MP, Diamandis EP. Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology. *Molecular Oncology*. 2010;4(6):496–510 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20934395>
- Kaur A, Sharma S. Mammalian target of rapamycin (mTOR) as a potential therapeutic target in various diseases. *Inflammopharmacology*. Springer International Publishing; 2017;25(3):293–312
- Kenific CM, Thorburn A, Debnath J. Autophagy and metastasis: another double-edged sword. *Current Opinion in Cell Biology*. 2010;22(2):241–5
- Kenific CM, Wittmann T, Debnath J. Autophagy in adhesion and migration. *Journal of Cell Science*. 2016;129(20):3685–93 Available from: <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.188490>
- Keren Z, Braun-moscovici Y, Markovits D, Rozin A, Nahir M, Balbir-gurman A, et al. Depletion of B lymphocytes in rheumatoid arthritis patients modifies IL-8-anti-IL-8 autoantibody network. *Clinical Immunology*. Elsevier Inc.; 2009;133(1):108–16 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2009.07.001>
- Kerkar SP, Restifo NP. Cellular Constituents of Immune Escape within the Tumor Microenvironment. 2012;3125–31
- Khanafer N, Duru G, Dalle S, Thomas L. Ineffective anti PD-1 therapy after BRAF inhibitor failure in advanced melanoma. *BMC Cancer*; 2018;1–7
- Khan AQ, Travers JB, Kemp MG. Roles of UVA radiation and DNA damage responses in melanoma pathogenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2018;59(5):438–60
- Kim SG, Buel GR, Blenis J. Nutrient regulation of the mTOR complex 1 signaling pathway. *Molecules and cells*. 2013;35(6):463–73
- Kim A, Cohen MS. The discovery of vemurafenib for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2016;11(9):907–16
- Kim YC, Guan KL. MTOR: A pharmacologic target for autophagy regulation. *Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(1):25–32
- Kim CH, Kim WK, Li C. ScienceDirect Antifibrogenic effects of B16 melanoma-conditioned medium. *Journal of Surgical Research*. Elsevier Inc; 2015;194(2):688–95 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2014.10.041>
- Kimura S, Fujita N, Noda T. Monitoring Autophagy in Mammalian Cultured Cells through the Dynamics of LC3 [Internet]. 1st ed. *Autophagy in Mammalian Systems, Part B*. Elsevier Inc.; 2009. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03601-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03601-X)
- Kiuru M, Busam KJ. The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. NIH Public Access; 2017;97(2):146–57 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28067895>
- Klionsky D, Abdalla F, Abeliovich H, Abraham R, Acevedo-Arozena A, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring

Bibliografia

- autophagy. *Autophagy*. 2012;(April):445–544
- Knævelsrud H, Carlsson SR, Simonsen A. SNX18 tubulates recycling endosomes for autophagosome biogenesis. 2013;8627
- Kodet O, Dvořánková B, Bendlová B, Sýkorová V, Krajsová I, Štork J, et al. Microenvironment-driven resistance to B-Raf inhibition in a melanoma patient is accompanied by broad changes of gene methylation and expression in distal fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine*. 2018;41(5):2687–703
- Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. THE ROLE OF AUTOPHAGY IN CANCER DEVELOPMENT AND RESPONSE TO THERAPY. 2005;5(September):726–34
- Koya RC, Mok S, Otte N, Blacketer KJ, Comin-Anduix B, Tumeh PC, et al. BRAF Inhibitor Vemurafenib Improves the Antitumor Activity of Adoptive Cell Immunotherapy. *Cancer Research*. 2012;72(16):3928–37 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22693252>
- Kraya AA, Piao S, Xu X, Zhang G, Herlyn M, Gimotty P, et al. Identification of secreted proteins that reflect autophagy dynamics within tumor cells. *Autophagy*. 2015a;11(1):60–74 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25484078>
- Kraya AA, Piao S, Xu X, Zhang G, Herlyn M, Gimotty P, et al. Identification of secreted proteins that reflect autophagy dynamics within tumor cells. *Autophagy*. Taylor & Francis; 2015b;11(1):60–74
- Krepler C, Xiao M, Sproesser K, Brafford PA, Shannan B, Beqiri M, et al. Personalized preclinical trials in BRAF Inhibitor-resistant patient-derived xenograft models identify second-line combination therapies. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(7):1592–602
- Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the Integrated Stress Response. *Molecular Cell*. 2010;40(2):280–93
- Kubica AW, Brewer JD. Melanoma in Immunosuppressed Patients. *JMCP*. Elsevier Inc.; 2012;87(10):991–1003 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmayocp.2012.04.018>
- Kubota Y, Takubo K, Shimizu T, Ohno H, Kishi K, Shibuya M, et al. M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. 2009;206(5):1089–102
- Kung C-P, Murphy ME. The role of the p53 tumor suppressor in metabolism and diabetes. *The Journal of endocrinology*. NIH Public Access; 2016;231(2):R61–75 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27613337>
- Kupcova Skalnikova H, Cizkova J, Cervenka J, Vodicka P. Advances in Proteomic Techniques for Cytokine Analysis: Focus on Melanoma Research. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(12)
- Kuphal S, Palm HG, Poser I, Bosserhoff AK. Snail-regulated genes in malignant melanoma. :305–13
- Kwong LN, Wargo JA, Chin L, Kwong LN, Boland GM, Frederick DT, et al. Co-clinical assessment identifies patterns of BRAF inhibitor resistance in melanoma Find the latest version : Co-clinical assessment identifies patterns of BRAF inhibitor resistance in melanoma. 2015;125(4):1459–70
- Ladányi A. Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2015;28(5):490–500 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25818762>
- Lafky JM, Wilken JA, Baron AT, Maihle NJ. Clinical implications of the ErbB / epidermal growth factor (EGF) receptor family and its ligands in ovarian cancer. 2008;1785:232–65
- Lamming DW, Sabatini DM. Regulation of TOR signaling in mammals. 1st ed. *Enzymes*. Elsevier Inc.; 2010.
- Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, et al. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in *BRAF* -Mutated Melanoma. *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society ; 2014;371(20):1867–76 Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1408868>
- Latour I, Louw DF, Beedle AM, Hamid J, Sutherland GR, Zamponi GW. Expression of T-type calcium channel splice variants in human glioma. *Glia*. 2004;48(2):112–9 Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15378657>

Lazova R, Camp RL, Klump V, Siddiqui SF, Amaravadi RK, Pawelek JM. Punctate LC3B expression is a common feature of solid tumors and associated with proliferation, metastasis, and poor outcome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(2):370–9

Lazova R, Klump V, Pawelek J. Autophagy in cutaneous malignant melanoma. 2010;256–68

Leiter U, Garbe C. Epidemiology of Melanoma and Nonmelanoma Skin Cancer—The Role of Sunlight. Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer. New York, NY: Springer New York; 2008 [cited 2019 Jan 22]. p. 89–103 Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-77574-6_8

Leiter U, Stadler R, Mauch C, Hohenberger W, Brockmeyer N, Berking C, et al. Complete lymph node dissection versus no dissection in patients with sentinel lymph node biopsy positive melanoma (DeCOG-SLT): a multicentre, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(6):757–67

Levy JMM, Towers CG, Thorburn A, Foundation A, Brain P, States U. Targeting Autophagy in Cancer. 2018;17(9):528–42

Levy JMM, Zahedi S, Griesinger AM, Morin A, Davies KD, Aisner DL, et al. Autophagy inhibition overcomes multiple mechanisms of resistance to BRAF inhibition in brain tumors. 2017;1–24

Li Y yuan, Lam S kwan, Mak JC wo, Zheng C yan, Ho JCM. Erlotinib-induced autophagy in epidermal growth factor receptor mutated non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. Elsevier Ireland Ltd; 2013;81(3):354–61

Li A, Ma Y, Jin M, Mason S, Mort RL, Blyth K, et al. Activated Mutant NRas Q61K Drives Aberrant Melanocyte Signaling, Survival, and Invasiveness via a Rac1-Dependent Mechanism. *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier Masson SAS; 2012a;132(11):2610–21

Li Y-Y, Wu C, Chen S-M, Shah SS, Wangpaichitr M, Feun LG, et al. BRAF inhibitor resistance enhances vulnerability to arginine deprivation in melanoma.

Oncotarget. 2016;7(14):17665–80 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26771234>

Li X, Wu D, Shen J, Zhou M, Lu Y. Rapamycin induces autophagy in the melanoma cell line M14 via regulation of the expression levels of Bcl-2 and Bax. *Oncology Letters*. 2012b;5(1):167–72

Liberato T, Pessotti DS, Fukushima I, Kitano ES, Serrano SMT, Zelanis A. Signatures of protein expression revealed by secretome analyses of cancer associated fibroblasts and melanoma cell lines. *Journal of Proteomics*. Elsevier; 2018;174(August 2017):1–8

Lidsky M, Antoun G, Speicher P, Adams B, Turley R, Augustine C, et al. Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Hyperactivation and Enhanced NRAS Expression Drive Acquired Vemurafenib Resistance in V600E BRAF Melanoma Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2014;289(40):27714 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25063807>

Lijnen P, Fagard R, Petrov V. Mibefradil-induced inhibition of proliferation of human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1999;33(4):595–604 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10218730>

Lin K, Baritaki S, Militello L, Malaponte G, Bevelacqua Y, Bonavida B. The Role of B-RAF Mutations in Melanoma and the Induction of EMT via Dysregulation of the NF- κ B / Snail / RKIP / PTEN Circuit. 2010;

Liu C, Peng W, Xu C, Lou Y, Zhang M, Wargo JA, et al. BRAF Inhibition Increases Tumor Infiltration by T cells and Enhances the Antitumor Activity of Adoptive Immunotherapy in Mice. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(2):393–403 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23204132>

Liu EY, Ryan KM. Autophagy and cancer – issues we need to digest. 2012;3(3)

Liu X, Wu J, Qin H, Xu J. The Role of Autophagy in the Resistance to BRAF Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma. *Targeted Oncology*. Targeted Oncology; 2018a;13(4):437–46

Liu X, Wu J, Qin H, Xu J. The Role of Autophagy in the Resistance to BRAF Inhibition in BRAF -Mutated

Bibliografia

Melanoma. Targeted Oncology; 2018b;

Liu R, Zhi X, Zhong Q. ATG14 controls SNARE-mediated autophagosome fusion with a lysosome. 2015;(May):847–9

Lock R, Kenific CM, Leidal AM, Salas E, Debnath J. Autophagy-Dependent Production of Secreted Factors Facilitates Oncogenic RAS-Driven Invasion. *Cancer Discovery*. 2014;4(4):466–79

Long G V., Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(10):1239–46

Loops IS, Adamcic U, Skowronski K, Peters C, Morrison J, Coomber BL. The Effect of Bevacizumab on Human Malignant Melanoma Cells with Functional VEGF / VEGFR2 Autocrine and. 2012;14(7):612–23

Lozy F, Karantza V. Autophagy and cancer cell metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2012;23(4):395–401 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22281437>

Lu H, Liu S, Zhang G, Kwong LN, Zhu Y, Miller JP, et al. Oncogenic BRAF-Mediated Melanoma Cell Invasion. *Cell reports*. NIH Public Access; 2016;15(9):2012–24

Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long G V. Targeted agents and immunotherapies: Optimizing outcomes in melanoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2017;14(8):463–82 Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.43>

Luo H, Umebayashi M, Doi K, Morisaki T, Shirasawa S, Tsunoda T. Resveratrol Overcomes Cellular Resistance to Vemurafenib Through Dephosphorylation of AKT in BRAF-mutated Melanoma Cells. *Anticancer research*. 2016;36(7):3585–9 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27354627>

Lv C, Dai H, Sun M, Zhao H, Wu K, Zhu J, et al. Mesenchymal stem cells induce epithelial mesenchymal transition in melanoma by paracrine secretion of transforming growth factor- β . *Melanoma Research*. 2017;27(2):74–84

Ma XH, Piao SF, Dey S, McAfee Q, Karakousis G, Villanueva J, et al. Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(3):1406–17

Ma X-H, Piao S, Wang D, McAfee QW, Nathanson KL, Lum JJ, et al. Measurements of tumor cell autophagy predict invasiveness, resistance to chemotherapy, and survival in melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. NIH Public Access; 2011;17(10):3478–89

Macià A, Herreros J, Martí RM, Cantí C. Calcium channel expression and applicability as targeted therapies in melanoma. *BioMed Research International*. 2015;2015(February)

Maddodi N, Huang W, Havighurst T, Kim K, Jack Longley B, Setaluri V. Induction of Autophagy and Inhibition of Melanoma Growth In Vitro and In Vivo by Hyperactivation of Oncogenic BRAF. *Journal of Investigative Dermatology*. 2010;130(6):1657–67 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20182446>

Maes H, Agostinis P. Autophagy and mitophagy interplay in melanoma progression. *Mitochondrion*. 2014;19 Pt A:58–68

Maes H, Kuchnio A, Carmeliet P, Agostinis P. Chloroquine anticancer activity is mediated by autophagy-independent effects on the tumor vasculature. *Molecular & cellular oncology*. Taylor & Francis; 2016;3(1):e970097 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27308577>

Maiques O, Barceló C, Panosa A, Pijuan J, Orgaz JL, Rodriguez-Hernandez I, et al. T-type calcium channels drive migration/invasion in BRAFV600E melanoma cells through Snail1. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2018;31 (4):484–95

Maiques O, Macià A, Moreno S, Barceló C, Santacana M, Veà A, et al. Immunohistochemical analysis of T-type calcium channels in acquired melanocytic nevi and melanoma. *The British journal of dermatology*. 2016;176 (5):1247–58

Malas S, Harrasser M, Lacy KE, Karagiannis SN. Antibody therapies for melanoma: New and emerging opportunities to activate immunity (Review). 2014;875–86

- Malley CO, Pidgeon GP. The mTOR pathway in obesity driven gastrointestinal cancers: Potential targets and clinical trials. *BBA Clinical*. The Authors; 2016;5:29–40 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.11.003>
- Mangana J, Levesque MP, Karpova MB, Dummer R. Sorafenib in melanoma. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2012;21(4):557–68
- Manzano JL, Layos L, Bugés C, de los Llanos Gil M, Vila L, Martínez-Balibrea E, et al. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Annals of Translational Medicine*. 2016;4(12):237–237
- Marcos-Gragera R, Vilar-Coromina N, Galceran J, Borràs J, Clèries R, Ribes J, et al. Rising trends in incidence of cutaneous malignant melanoma and their future projections in Catalonia, Spain: Increasing impact or future epidemic? *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2010;24(9):1083–8
- Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: The interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2014;15(2):81–94
- Martín-Gorgojo A, Nagore E. Melanoma Arising in a Melanocytic Nevus. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. Elsevier España, S.L.U. and AEDV; 2018;109(2):123–32
- Martin S, Dudek-peric AM, Garg AD, Roose H, Demirsoy S, Eygen V. An autophagy-driven pathway of ATP secretion supports the aggressive phenotype of BRAF V600E inhibitor-resistant metastatic melanoma cells. 2017a;13(9):1512–27
- Martin S, Dudek-Peric AM, Garg AD, Roose H, Demirsoy S, Van Eygen S, et al. An autophagy-driven pathway of ATP secretion supports the aggressive phenotype of BRAFV600E inhibitor-resistant metastatic melanoma cells. *Autophagy*. 2017b;13(9):1512–27
- Martin S, Dudek-Perić AM, Maes H, Garg AD, Gabrysiak M, Demirsoy S, et al. Concurrent MEK and autophagy inhibition is required to restore cell death associated danger-signalling in Vemurafenib-resistant melanoma cells. *Biochemical Pharmacology*. 2015;93(3):290–304 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25529535>
- Massoumi R, Kuphal S, Hellerbrand C, Haas B, Wild P, Spruss T, et al. Down-regulation of CYLD expression by Snail promotes tumor progression in malignant melanoma. 2009;206(1):221–32
- Maurer G, Tarkowski B, Baccharini M. Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2011;30(32):3477–88
- Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema KJ, et al. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*. Taylor & Francis; 2018;14(8):1435–55
- Medscape. Latest Medical News, Clinical Trials, Guidelines – Today on Medscape [Internet]. [cited 2019 Jan 25]. Available from: <https://www.medscape.com/>
- Menon DR, Schaidler H. Microenvironment-Driven Resistance to BRAF Inhibition Comes of Age. *Elsevier Masson SAS*; 2015;2923–5
- Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*. 2011;7(7):673–82
- Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2006;355(1):51–65
- Mingot J-M, Vega S, Maestro B, Sanz JM, Nieto MA. Characterization of Snail nuclear import pathways as representatives of C2H2 zinc finger transcription factors. *Journal of Cell Science*. 2009;122(9):1452–60
- Mirshafiey A, Ghalamfarsa G, Asghari B, Azizi G. Receptor tyrosine kinase and tyrosine kinase inhibitors: New hope for success in multiple sclerosis therapy. *Innovations in Clinical Neuroscience*. 2014;11(7–8):23–36
- Mishra PJ, Ha L, Rieker J, Sviderskaya E V, Bennett DC, Oberst MD, et al. Dissection of RAS downstream pathways in melanomagenesis: a role for Ral in transformation. *Oncogene*. 2010;29(16):2449–56
- Mitchem JB, Brennan DJ, Knolhoff BL, Belt BA, Zhu Y, Sanford DE, et al. Targeting Tumor-Infiltrating

Bibliografia

- Macrophages Decreases Tumor-Initiating Cells, Relieves Immunosuppression, and Improves Chemotherapeutic Responses. *Cancer Research*. 2013;73(3):1128–41 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23221383>
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell*. Elsevier Inc.; 2011;147(4):728–41 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>
- Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. NIH Public Access; 2010;140(3):313–26
- Mok S, Koya RC, Tsui C, Xu J, Robert L, Wu L, et al. Inhibition of CSF-1 Receptor Improves the Antitumor Efficacy of Adoptive Cell Transfer Immunotherapy. 2014;153–62
- Mok S, Tsoi J, Koya RC, Hu-Lieskovan S, West BL, Bollag G, et al. Inhibition of colony stimulating factor-1 receptor improves antitumor efficacy of BRAF inhibition. *???*; 2015;1–10
- Molina VLD, Castellanos AP, Arias LF, Olivera RMP. La inmunoterapia en el melanoma maligno: Revisión. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*. 2012;10(2):123–38
- Monteith GR, Davis FM, Roberts-Thomson SJ. Calcium Channels and Pumps in Cancer: Changes and. 2012;287(38):31666–73
- Morton DL, Cochran AJ, Thompson JF, Elashoff R, Essner R, Glass EC, et al. Sentinel node biopsy for early-stage melanoma: Accuracy and morbidity in MSLT-I, an international multicenter trial. *Annals of Surgery*. 2005;242(3):302–13
- Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Elashoff R, Essner R, et al. Sentinel-Node Biopsy or Nodal Observation in Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(13):1307–17 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17005948>
- Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(22):3584–90
- Mroczo B, Groblewska M, Wereszczy U, Andrzej D, Szmikowski M. Serum macrophage-colony stimulating factor levels in colorectal cancer patients correlate with lymph node metastasis and poor prognosis. 2007;380:208–12
- Mukhopadhyay P, Rajesh M, Haskó G, Hawkins BJ, Madesh M, Pacher P. Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nature Protocols*. 2007;2(9):2295–301 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17853886>
- Mullins ME, Horowitz BZ, Linden DHJ, Smith GW, Norton RL, Stump J. Life-Threatening Interaction of Mibefradil and β -Blockers With Dihydropyridine Calcium Channel Blockers. *JAMA*. American Medical Association; 1998;280(2):157 Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.280.2.157>
- Muñoz-Couselo E, Adelantado EZ, Ortiz C, García JS, Perez-García J. NRAS-mutant melanoma: Current challenges and future prospect. *OncoTargets and Therapy*. 2017;10:3941–7
- Muqbil I, Wu J, Aboukameel A, Mohammad RM, Azmi AS. Snail nuclear transport: the gateways regulating epithelial-to-mesenchymal transition? *Seminars in cancer biology*. 2014;27:39–45
- Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14–20 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25035950>
- Najem A, Krayem M, Perdrix A, Kerger J, Awada A, Journe F, et al. New Drug Combination Strategies in Melanoma: Current Status and Future Directions. *Anticancer Research*. 2017;37(11):5941–53
- Narita M, Young ARJ, Arakawa S, Samarajiwa SA, Nakashima T, Yoshida S, et al. Spatial Coupling of mTOR and Autophagy Augments Secretory Phenotypes. *Science*. 2011;332(6032):966–70
- Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*. Nature Publishing Group;

- 2010;468(7326):973–7 Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09626>
- Ndoye A, Weeraratna AT. Autophagy- An emerging target for melanoma therapy. *F1000Research*. 2016;5(0):1–9
- Neubert NJ, Schmittnaegel M, Bordry N, Nassiri S, Wald N, Martignier C, et al. T cell – induced CSF1 promotes melanoma resistance to PD1 blockade. 2014;4
- Ngiow SF, Meeth KM, Stannard K, Barkauskas DS, Bollag G, Bosenberg M, et al. Co-inhibition of colony stimulating factor-1 receptor and BRAF oncogene in mouse models of BRAF^{V600E} melanoma. *Oncolmunology*. 2016;5(3):e1089381 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27141346>
- Ni CS, Sun BC, Dong XY, Sun T, Zhao N, Liu YR, et al. Promoting melanoma growth and metastasis by enhancing VEGF expression. *Wspolczesna Onkologia*. 2012;16(6):526–31
- Obenauf AC, Zou Y, Ji AL, Vanharanta S, Shu W, Shi H, et al. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature*. 2015;520(7547):368–72 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25807485>
- Olmeda D, Jordá M, Peinado H, Fabra Á, Cano A. Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene*. 2007;26(13):1862–74
- Paluncic J, Kovacevic Z, Jansson PJ, Kalinowski D, Merlot AM, Huang ML-H, et al. Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Elsevier; 2016;1863(4):770–84 Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488916300155>
- Pan J, Ding M, Xu K, Yang C, Mao L. Exosomes in diagnosis and therapy of prostate cancer. 2017;8(57):97693–700
- PathologyOutlines. Pathology Outlines - PathologyOutlines.com [Internet]. [cited 2019 Jan 25]. Available from: <http://www.pathologyoutlines.com/>
- Patravale V, Dandekar P, Jain R. Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles. *Nanoparticulate Drug Delivery*. 2012;123–55
- Pearlman RL, Montes de Oca MK, Pal HC, Afaq F. Potential therapeutic targets of epithelial–mesenchymal transition in melanoma. *Cancer Letters*. 2017;391:125–40
- Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine*. NIH Public Access; 2012;18(6):883–91 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22635005>
- Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(6):415–28 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17508028>
- Peinado H, Zhang H, Matei IR, Costa-silva B, Hoshino A, Rodrigues G, et al. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group; 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2017.6>
- Peng H-H, Liang S, Henderson AJ, Dong C. Regulation of interleukin-8 expression in melanoma-stimulated neutrophil inflammatory response. *Experimental cell research*. NIH Public Access; 2007;313(3):551–9 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17141217>
- Perez-Reyes E. Molecular Physiology of Low-Voltage-Activated T-type Calcium Channels. *Physiological Reviews*. 2003;83(1):117–61
- Phan VT, Wu X, Cheng JH, Sheng RX, Chung AS, Zhuang G, et al. Oncogenic RAS pathway activation promotes resistance to anti-VEGF therapy through G-CSF – induced neutrophil recruitment. 2013;
- Pollack LA, Li J, Berkowitz Z, Weir HK, Wu XC, Ajani UA, et al. Melanoma survival in the United States, 1992 to 2005. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2011;65(5 SUPPL. 1):1–17
- Potrony M, Badenas C, Aguilera P, Puig-butlle JA, Carrera C, Malvehy J, et al. Update in genetic susceptibility in melanoma. 2015;3(15):1–12

Bibliografia

- Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature*. 2011;480(7377):387–90 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22113612>
- Pozarowski P, Grabarek J, Darzynkiewicz Z. Flow Cytometry of Apoptosis. *Current Protocols in Cytometry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2003 [cited 2019 Jan 23]. p. Unit 7.19 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18770781>
- Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nature Publishing Group*; 2011;11(August):609–18 Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3105>
- Profiles A, Gaustad J, Simonsen TG, Andersen LMK, Rofstad EK. Translational Oncology The Effect of Sunitinib Treatment in Human Melanoma Xenografts: Associations with. *Translational Oncology*. The Authors; 2017;10(2):158–67 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2016.12.007>
- Pyo JO, Jang MH, Kwon YK, Lee HJ, Jun J II, Woo HN, et al. Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: Dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(21):20722–9
- Qian B-Z, Pollard JW. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39–51 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371344>
- Qiang L, Zhao B, Ming M, Wang N, He T-C, Hwang S, et al. Regulation of cell proliferation and migration by p62 through stabilization of Twist1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(25):9241–6
- Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*. 2013;19(11):1423–37 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24202395>
- Quail DF, Joyce JA. Molecular Pathways: Deciphering Mechanisms of Resistance to Macrophage-Targeted Therapies. 2016;(12):1–10
- Quan W, Lee M. Role of Autophagy in the Control of Body Metabolism. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*. 2013;28(1):6–11 Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3811796&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature*. 2009;457(7229):599–602
- Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. 2014;28(6):1005–11
- Reslan L, Dalle S, Dumontet C. Understanding and circumventing resistance to anticancer monoclonal antibodies. *mAbs*. Taylor & Francis; 2009;1(3):222 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2726592/>
- Ribas A, Gonzalez R, Pavlick A, Hamid O, Gajewski TF, Daud A, et al. Combination of vemurafenib and cobimetinib in patients with advanced BRAFV600-mutated melanoma: a phase 1b study. *The Lancet Oncology*. 2014;15(9):954–65 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25037139>
- Ribatti D. Mast cells and macrophages exert beneficial and detrimental effects on tumor progression and angiogenesis. *Immunology Letters*. Elsevier B.V.; 2013;152(2):83–8 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2013.05.003>
- Ríos L, Nagore E, López JL, Redondo P, Martí RM, Fernández-de-Misa R, et al. Melanoma characteristics at diagnosis from the Spanish National Cutaneous Melanoma Registry: 15 years of experience. *Actas dermo-sifiliográficas. AEDV*; 2013;104(9):789–99 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23622931>
- Rizos H, Menzies AM, Pupo GM, Carlino MS, Fung C, Hyman J, et al. BRAF Inhibitor Resistance Mechanisms in Metastatic Melanoma: Spectrum and Clinical Impact. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(7):1965–77 Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-13-3122>

- Rocco M, Malorni L, Cozzolino R, Palmieri G, Rozzo C, Manca A, et al. Proteomic Profiling of Human Melanoma Metastatic Cell Line Secretomes. 2011;4703–14
- Rodrigues AL, Brescia M, Kolshinski A, Moreira TH, Cameron R, Bailley G, et al. Increase in Ca²⁺ current by sustained cAMP levels enhances proliferation rate in GH3 cells. *Life Sciences*. Elsevier; 2018;192(November 2017):144–50
- Rosenfeld MR, Ye X, Supko JG, Desideri S, Grossman SA, Brem S, et al. A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Autophagy*. 2014;10(8):1359–68 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24991840>
- Rosenkranz AA, Slastnikova TA, Durymanov MO, Sobolev AS. Malignant melanoma and melanocortin 1 receptor. *Biochemistry. Biokhimiia*. NIH Public Access; 2013;78(11):1228–37 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24460937>
- Roskoski R. Sunitinib : A VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. 2007;356:323–8
- Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V, Rosenbusch A, Ho CMT, Pryer N, et al. Macrophage IL-10 Blocks CD8+ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells. *Cancer Cell*. 2014;26(5):623–37 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25446896>
- Ruffell B, Coussens LM, Biology C. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. 2016;27(4):462–72
- S.M. W, C. C, L. T, D. W, A. M, H. R, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Research*. 2004;64(19):7099–109
- Sadasivan S, Wang K, Zhang Z. Necrosis, Apoptosis and Autophagy in Acute Brain Injury: The Utilities of Biomarkers. *Biomarkers of Brain Injury and Neurological Disorders*. 2014;(January 2015):116–33
- Sahani MH, Itakura E, Mizushima N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1 / p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. 2014;(March):431–41
- Salah FS, Ebbinghaus M, Muley VY, Zhou Z, Al-Saadi KR, Pacyna-Gengelbach M, et al. Tumor suppression in mice lacking GABARAP, an Atg8/LC3 family member implicated in autophagy, is associated with alterations in cytokine secretion and cell death. *Cell Death and Disease*. 2016;7(4):e2205
- Sandri S, Faião-flores F, Tiago M, Comune P, Ramos R, Alves-fernandes DK, et al. Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation. *Pharmacological Research*. Elsevier Ltd; 2016;111:523–33 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.017>
- Santoni M, Massari F, Amantini C, Nabissi M, Maines F, Burattini L, et al. Emerging role of tumor-associated macrophages as therapeutic targets in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2013;62(12):1757–68
- Santoni G, Santoni M, Nabissi M. Functional role of T-type calcium channels in tumour growth and progression: prospective in cancer therapy. *British Journal of Pharmacology*. 2012;166(4):1244–6 Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2012.01908.x>
- Sapi E, Kacinski BM. The role of CSF-1 in normal and neoplastic breast physiology. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.). 1999;220(1):1–8 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9893162>
- Sasaki K, Tsuno NH, Sunami E, Kawai K, Hongo K, Hiyoshi M, et al. Resistance of colon cancer to 5-fluorouracil may be overcome by combination with chloroquine , an in vivo study. :675–82
- Sasaki K, Tsuno NH, Sunami E, Kawai K, Hongo K, Hiyoshi M, et al. Resistance of colon cancer to 5-fluorouracil may be overcome by combination with

Bibliografía

- chloroquine, an in vivo study. *Anti-Cancer Drugs*. 2012;23(7):675–82 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561420>
- Schadendorf D, Kochs C, Livingstone E. *Handbook of Cutaneous Melanoma*. 2013;13–28 Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-908517-98-2>
- Schlegel J, Sambade MJ, Sather S, Moschos SJ, Tan A, Wings A, et al. MERTK receptor tyrosine kinase is a therapeutic target in melanoma. *2013;123(5):2257–67*
- Schmitt R, Kleinbloesem CH, Belz GG, Schroeter V, Feifel U, Pozenel H, et al. Hemodynamic and humoral effects of the novel calcium antagonist Ro 40-5967 in patients with hypertension. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 1992;52(3):314–23 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1526090>
- Scholtens A, Foppen MHG, Blank CU, Thienen JV Van, Tinteren H Van, Haanen JB. Vemurafenib for BRAF V600 mutated advanced melanoma : Results of treatment beyond progression. *European Journal of Cancer*. Elsevier Ltd; 2015;51(5):642–52 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2015.01.009>
- Scolyer RA, Long G V, Thompson JF. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Molecular oncology*. Wiley-Blackwell; 2011;5(2):124–36 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21482206>
- SEER Training. SEER Training Modules. National Cancer Institute [Internet]. [cited 2019 Jan 25]. Available from: <https://training.seer.cancer.gov/>
- Shacka JJ, Klocke BJ, Roth KA. Autophagy, bafilomycin and cell death: the “a-B-cs” of plecomacrolide-induced neuroprotection. *Autophagy*. 2(3):228–30
- Shapovalov G, Lehen V, Skryma R, Prevarskaya N. Cell Calcium TRP channels in cell survival and cell death in normal and transformed cells. *Cell Calcium*. Elsevier Ltd; 2011;50(3):295–302 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2011.05.006>
- Sharifi MN, Mowers EE, Drake LE, Collier C, Chen H, Zamora M, et al. Autophagy Promotes Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility of Metastatic Tumor Cells through the Direct Interaction of Paxillin with LC3. *Cell Reports*. 2016;15(8):1660–72 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27184837>
- Shi H, Hugo W, Kong X, Hong A, Koya RC, Moriceau G, et al. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discovery*. 2014;4(1)
- Sica A, Mantovani A. *Science in medicine Macrophage plasticity and polarization : in vivo veritas*. 2012;122(3):787–95
- Sigall DA, Donis AA, Ávalos VF, Cherit JD. Melanoma cutáneo primario. Actualización y énfasis en la importancia de dermatólogo en la detección temprana y su tratamiento oportuno (Segunda parte). *Dermatologia Cosmetica, Medica y Quirurgica*. 2010;8(4):258–61
- Silva JH, de Sá B, Ávila ALR de, Landman G, Duprat Neto JP. Atypical mole syndrome and dysplastic nevi: identification of populations at risk for developing melanoma - review article. *Clinics*. 2011;66(3):493–9
- Singh K, Sharma A, Mir MC, Drazba JA, Heston WD, Magi-galluzzi C, et al. Autophagic flux determines cell death and survival in response to Apo2L / TRAIL (dulanermin). *Molecular Cancer*. Molecular Cancer; 2014;13(1):1–11 Available from: *Molecular Cancer*
- Smalley KSM, Lioni M, Palma MD, Xiao M, Desai B, Egyhazi S, et al. UPM technology to boost padi yield in Terengganu _ *Berita Daily*. 2009;7(9):2876–83
- Smith WB, Guida L, Sun Q, Korpelainen EI, van den Heuvel C, Gillis D, et al. Neutrophils activated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor express receptors for interleukin-3 which mediate class II expression. *Blood*. 1995;86(10):3938–44 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7579364>
- Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J. Leukoc. Biol*. 2009;86:0–000 Available from: www.jleukbio.org

- Somasundaram R, Herlyn M. Melanoma exosomes: messengers of metastasis. *Nature Medicine*. Nature Publishing Group; 2012;18(6):853–4 Available from: <http://www.nature.com/articles/nm.2775>
- Son B, Lee S, Youn H, Kim E, Kim W, Youn B. The role of tumor microenvironment in therapeutic resistance. 2017;8(3):3933–45
- Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nature Reviews Cancer*. 2014;14(9):611–22 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25118602>
- Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, et al. Survival in BRAF V600–Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(8):707–14 Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1112302>
- Spagnolo F, Ghorzo P, Queirolo P. Overcoming resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutated metastatic melanoma. 2014;5(21)
- Stambolic V, Suzuki A, De la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*. 1998;95(1):29–39
- Straussman R, Morikawa T, Shee K. Tumor microenvironment induces innate RAF-inhibitor resistance through HGF secretion. *Nature*. 2012;487(7408):500–4
- Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. 2015;(November):3–5
- Su F, Bradley WD, Wang Q, Yang H, Xu L, Higgins B, et al. Resistance to Selective BRAF Inhibition Can Be Mediated by Modest Upstream Pathway Activation. *Cancer Research*. 2012;72(4):969–78 Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-11-1875>
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(43):15545–50 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16199517>
- Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, et al. Autophagy and chemotherapy resistance : a promising therapeutic target for cancer treatment. 2013;1–12
- Sullivan RJ, LoRusso PM, Flaherty KT. The intersection of immune-directed and molecularly targeted therapy in advanced melanoma: Where we have been, are, and will be. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(19):5283–91
- Sun WL, Lan D, Gan TQ, Cai ZW. Autophagy facilitates multidrug resistance development through inhibition of apoptosis in breast cancer cells. 2015;
- Swartz MA, Iida N, Roberts EW, Sangaletti S, Wong MH, Yull FE, et al. Tumor Microenvironment Complexity: Emerging Roles in Cancer Therapy. *Cancer Research*. 2012;72(10):2473–80 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22414581>
- Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *International immunology*. Oxford University Press; 2016;28(8):401–9 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27160722>
- Tan W. Malignant Melanoma. *Medscape Drugs & Diseases*. 2018;(34):18–31
- Tarca AL, Romero R, Draghici S. Analysis of microarray experiments of gene expression profiling. *American journal of obstetrics and gynecology*. NIH Public Access; 2006;195(2):373–88 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16890548>
- Taylor JT, Huang L, Pottle JE, Liu K, Yang Y, Zeng X, et al. Selective blockade of T-type Ca²⁺ channels suppresses human breast cancer cell proliferation. *Cancer letters*. 2008;267(1):116–24
- Das Thakur M, Salangsang F, Landman AS, Sellers WR, Pryer NK, Levesque MP, et al. Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature*. 2013;494(7436):251–5 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23302800>

Bibliografia

- The European Cancer Observatory (ECO). Cancer burden statistics and trends across Europe | ECIS [Internet]. [cited 2019 Jan 25]. Available from: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>
- Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(6):442–54
- Thorburn A, Morgan MJ. Autophagy and cancer therapy. *Autophagy and Cancer*. 2013;(June):191–204
- Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature Reviews Cancer*. 2015;15(1):7–24 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25533673>
- Towers CG, Thorburn A. EBioMedicine Therapeutic Targeting of Autophagy ☆. *EBIOM. The Authors*; 2016;14:15–23 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.10.034>
- Trunzer K, Pavlick AC, Schuchter L, Gonzalez R, McArthur GA, Hutson TE, et al. Pharmacodynamic Effects and Mechanisms of Resistance to Vemurafenib in Patients With Metastatic Melanoma. 2013;
- Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die : autophagic programmed cell death. 2005;1528–34
- Tucci M, Mannavola F, Passarelli A, Stucci LS, Cives M, Silvestris F. Exosomes in melanoma: a role in tumor progression, metastasis and impaired immune system activity. *Oncotarget*. 2018;9(29):20826–37 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29755693>
- Ueki T, Toyota M, Sohn T, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, et al. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer research*. 2000;60(7):1835–9
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science (New York, N.Y.)*. 2000;287(5453):664–6 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10650002>
- Vera-Ramirez L, Vodnala SK, Nini R, Hunter KW, Green JE. Autophagy promotes the survival of dormant breast cancer cells and metastatic tumour recurrence. *Nature Communications*. Nature Publishing Group; 2018;9(1):1944 Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-04070-6>
- Villanueva J, Herlyn M. Melanoma and the tumor microenvironment. *Current oncology reports*. NIH Public Access; 2008;10(5):439–46 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18706274>
- Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, et al. Acquired Resistance to BRAF Inhibitors Mediated by a RAF Kinase Switch in Melanoma Can Be Overcome by Cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell*. 2010;18(6):683–95 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21156289>
- Vu HL, Aplin AE. Targeting mutant NRAS signaling pathways in melanoma. *Pharmacological Research*. Elsevier Ltd; 2016;107:111–6
- Waldner M, Fantus D, Solari M, Thomson AW. New perspectives on mTOR inhibitors (rapamycin, rapalogs and TORKinibs) in transplantation. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2016;82(5):1158–70 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26810941>
- Walter FM, Prevost AT, Vasconcelos J, Hall PN, Burrows NP, Morris HC, et al. Using the 7-point checklist as a diagnostic aid for pigmented skin lesions in general practice: A diagnostic validation study. *British Journal of General Practice*. 2013;63(610):345–53
- Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. 2004;116:855–67
- Wang J, Guo R, Yang Y, Jacobs B, Chen S, Iwuchukwu I, et al. The Novel Methods for Analysis of Exosomes Released from Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells. *Stem Cells International*. 2016;2016:1–12 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27118976>
- Wang Y, Mo X, Piper MG, Wang H, Parinandi NL, Marsh CB. M-CSF Induces Monocyte Survival by Activating NF- κ B p65 Phosphorylation at Ser276 via Protein Kinase C. 2011;6(12)

- Wang T, Xiao M, Ge Y, Krepler C, Belser E, Lopez-Coral A, et al. BRAF Inhibition Stimulates Melanoma-Associated Macrophages to Drive Tumor Growth. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(7):1652–64 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25617424>
- Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*. 2017;8(5):761–73
- Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, Gogas HJ, Arance AM, Cowey CL, et al. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2017;NEJMoa1709030
- Wedam SB, Low JA, Yang SX, Chow CK, Choyke P, Danforth D, et al. Antiangiogenic and Antitumor Effects of Bevacizumab in Patients With Inflammatory and Locally Advanced Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(5):769–77 Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2005.03.4645>
- Wei M, Chen M, Chen K, Lou P, Lin SY, Hung S, et al. Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells. 2014;(July):1179–92
- Whipple CA, Brinckerhoff CE. BRAF V600E melanoma cells secrete factors that activate stromal fibroblasts and enhance tumourigenicity. *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group; 2014;111(8):1625–33 Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2014.452>
- White E. The role for autophagy in cancer. *The Journal of clinical investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2015;125(1):42–6 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25654549>
- Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2008;7(10):3129–40 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852116>
- Winder M, Virós A. Mechanisms of Drug Resistance in Melanoma. *Handbook of experimental pharmacology*. 2017 [cited 2019 Jan 22]. p. 91–108 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28275910>
- Wojtkowiak JW, Rothberg JM, Kumar V, Schramm KJ, Haller E, Proemsey JB, et al. Chronic Autophagy Is a Cellular Adaptation to Tumor Acidic pH Microenvironments. *Cancer Research*. 2012;72(16):3938–47 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22719070>
- Wolchok JD, Saenger Y. The Mechanism of Anti-CTLA-4 Activity and the Negative Regulation of T-Cell Activation. *The Oncologist*. 2008;13(Supplement 4):2–9
- Wolf JA, Moreau JF, Akilov O, Patton T, English JC, Ho J, et al. Diagnostic Inaccuracy of Smartphone Applications for Melanoma Detection. *JAMA Dermatology*. 2013;149(4):422 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23325302>
- Wood K, Luke J. The Biology and Therapeutic Approach to BRAF-Mutant Cutaneous Melanoma. *the American Journal of Hematology/Oncology*. 2017;13(1):4–10 Available from: http://gotoper.com.s3.amazonaws.com/_media/_pdf/AJHO_JAN_melanoma.pdf
- Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene*. 2003;22(20):3113–22
- Xie X, Koh JY, Price S, White E, Mehnert JM. Atg7 Overcomes Senescence and Promotes Growth of BrafV600E-Driven Melanoma. *Cancer Discov*. 2015;5(4):410–23
- Xing F, Persaud Y, Pratilas CA, Taylor BS, Janakiraman M, She Q-B, et al. Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring (V600E)BRAF. *Oncogene*. NIH Public Access; 2012;31(4):446–57 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21725359>
- Xu YZ, Kanagaratham C, Youssef M, Radzioch D. New Frontiers in Cancer Chemotherapy — Targeting Cell Death Pathways. *Cell Biology - New Insights*. InTech; 2016 [cited 2019 Jan 24]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/cell-biology-new-insights/new-frontiers-in-cancer-chemotherapy-targeting-cell-death-pathways>
- Xue G, Kohler R, Tang F, Hynx D, Wang Y, Orso F, et

Bibliografia

- al. mTORC1 / autophagy-regulated MerTK in mutant BRAFV600 melanoma with acquired resistance to BRAF inhibition. 2017;8(41):69204–18
- Yagiz K, Rittling SR. Both cell-surface and secreted CSF-1 expressed by tumor cells metastatic to bone can contribute to osteoclast activation. *Experimental Cell Research*. 2009;315(14):2442–52 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19427849>
- Yamaguchi Y, Hearing VJ. Melanocytes and their diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014;4(5)
- Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell structure and function*. 1998;23(1):33–42 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9639028>
- Yaman B, Akalin T. Clinicopathological Characteristics and Mutation Profiling in Primary Cutaneous Melanoma. 2015;37(5):389–97
- Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2011;10(9):1533–41 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21878654>
- Yang Z, Lei Z, Li B, Zhou Y, Zhang GM, Feng ZH, et al. Rapamycin inhibits lung metastasis of B16 melanoma cells through down-regulating α v integrin expression and up-regulating apoptosis signaling. *Cancer Science*. 2010;101(2):494–500
- Yang Y, Qin J, Lan L, Li N, Wang C, He P, et al. M-CSF cooperating with NF κ B induces macrophage transformation from M1 to M2 by upregulating c-Jun. 2014;4047
- Yang X, Yu DD, Yan F, Jing YY, Han ZP, Sun K, et al. The role of autophagy induced by tumor microenvironment in different cells and stages of cancer. *Cell and Bioscience*. 2015;5(1):1–11
- Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and Measuring Autophagy. 2017;1–13
- Young MM, Kester M, Wang H-G. Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *Journal of Lipid Research*. 2013;54(1):5–19 Available from: <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.R031278>
- Young HL, Rowling EJ, Bugatti M, Giurisato E, Luheshi N, Arozarena I, et al. An adaptive signaling network in melanoma inflammatory niches confers tolerance to MAPK signaling inhibition. 2017;1–20
- Zhang Y, Cruickshanks N, Yuan F, Wang B, Pahuski M, Wulfkühle J, et al. Targetable T-type Calcium Channels Drive Glioblastoma. *Cancer Research*. 2017;77(13):3479–90 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28512247>
- Zhou W, Chen MK, Yu HT, Zhong ZH, Cai N, Chen GZ, et al. The antipsychotic drug pimozide inhibits cell growth in prostate cancer through suppression of STAT3 activation. *International Journal of Oncology*. 2016;48(1):322–8
- Zhu S, Chen M, Jongstra-bilen J, Cybulsky MI. GM-CSF regulates intimal cell proliferation in nascent atherosclerotic lesions. 2009;206(10):2141–9
- Zou Y, Ling Y-H, Sironi J, Schwartz EL, Perez-Soler R, Piperdi B. The Autophagy Inhibitor Chloroquine Overcomes the Innate Resistance of Wild-Type EGFR Non-Small-Cell Lung Cancer Cells to Erlotinib. *Journal of Thoracic Oncology*. 2013;8(6):693–702 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23575415>
- Zuo Q, Liu J, Huang L, Qin Y, Hawley T, Seo C, et al. AXL/AKT axis mediated-resistance to BRAF inhibitor depends on PTEN status in melanoma. *Oncogene*. 2018;37(24):3275–89
- Zuo JH, Zhu W, Li MY, Li XH, Yi H, Zeng GQ, et al. Activation of EGFR promotes squamous carcinoma SCC10A cell migration and invasion via inducing EMT-like phenotype change and MMP-9-mediated degradation of E-cadherin. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011;112(9):2508–17
- National Cancer Institute. [Internet]. Surveillance Epidemiology and End Results Cancer Statistics review. 2009. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl>

ANNEX

 PUBLICACIONS

1. ***T-Type calcium channels as a therapeutic target to overcome acquired resistance in BRAF^{V600E} melanomas.***
Barceló C, Sisó P*, Maiques O*, García-Mulero S, Sanz-Pamplona R, Navaridas R, Megino C, Felip I, Urdanibia I, Eritja N, Soria X, Piulats JM, Dolcet X, Matías-Guiu X, Martí RM**, Macià A**. *Pigment Cell and Melanoma Research Undereview*. *Aquests autors han contribuït per igual al treball. ** co-seniors.

2. ***Differential immunoexpression of BRAF/V600E, senescence markers, PTEN, and T-type calcium channels in acquired nevi according to their histopathological and dermoscopic classification.***
 Moreno S*, Maiques O*, Romero, Santacana M, Gomez I, Cuevas D, Velasco A, Veà A, Macia A, **Barceló C**, Boix R, Valls J, Gatus S, Canti C, Matias-Guiu X, Soria X**, Marti RM**. *Undereview*. *Aquests autors han contribuït per igual al treball. ** co-seniors.

3. ***In vitro cell migration, invasion and adhesion assays: from cell imaging to data analysis.***
 Jordi Pijuan, **Carla Barceló**, Oscar Maiques, David F. Moreno, Pol Sisó, Rosa M. Martí, Anna Macià**, Anais Panosa**. *Undereview*. ** co-seniors.

4. ***Tumor suppressive function of E2F-1 on PTEN-induced serrated colorectal carcinogenesis.***
 Dosil MA, Navaridas R, Mirantes C, Tarragona J, Eritja N, Felip I, Urdanibia I, Megino C, Domingo M, Santacana M, Gatus S, Piñol C, **Barceló C**, Maiques O, Macià A, Velasco A, Vaquero M, Matias-Guiu X, Dolcet X. *J Pathol*. 2019 Jan;247(1):72-85. doi: 10.1002/path.5168. Epub 2018 Nov 27.

5. ***T-type calcium channels drive migration/invasion in BRAFV600E melanoma cells through Snail1.***
 Maiques O*, **Barceló C***, Panosa A, Pijuan J, Orgaz JL, Rodriguez-Hernandez I, Matas-Nadal C, Tell G, Vilella R, Fabra A, Puig S, Sanz-Moreno V, Matias-Guiu X, Canti C, Herreros J, Martí RM**, Macià** A. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2018 Jul;31(4):484-495. doi: 10.1111/pcmr.12690. Epub 2018 Feb 18. *Aquests autors han contribuït per igual al treball. ** co-seniors.

6. ***Immunohistochemical analysis of T-type calcium channels in acquired melanocytic naevi and melanoma.***
 Maiques O*, Macià A*, Moreno S, **Barceló C**, Santacana M, Veà A, Herreros J, Gatus S, Ortega E, Valls J, Chen BJ, Llobet-Navas D, Matias-Guiu X, Cantí C**, Martí RM**. *Br J Dermatol*. 2017 May;176(5):1247-1258. doi: 10.1111/bjd.15121. Epub 2017 Mar 20. *Aquests autors han contribuït per igual al treball. ** co-seniors.

