

1. Título del proyecto de investigación.

Caracterización de vías de señalización pro-tumorales en melanoma.

2. Línea de investigación del Cuerpo Académico.

Biología molecular y celular.

3. Responsable del proyecto, participantes y adscripción.

Claudia Haydée González de la Rosa, responsable del proyecto, Departamento de Ciencias Naturales, DCNI, UAM-C.

Elena Aréchaga Ocampo, participante del proyecto, Departamento de Ciencias Naturales, DCNI, UAM-C.

Ernesto Soto Reyes, participante del proyecto, Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología.

Miguel Angel Álvarez Avitia, participante del proyecto, Oncología Médica, Instituto Nacional de Cancerología.

4. Orientación.

Investigación básica.

5. Fecha de inicio y duración.

Inicia el 1 de mayo de 2018 con una duración de cuatro años.

6. Propuesta:

a. Resumen.

El melanoma es responsable del 80% de las muertes por cáncer de piel, aunque solo representa el 4 % de ellos. Para que un melanocito se transforme en melanoma, debe acumular alteraciones genéticas que pueden llevar a la sobreexpresión o subexpresión de genes, que a su vez modifican vías de señalización. Nuestro grupo de trabajo identificó mediante un meta-análisis de microarreglos de expresión, algunos candidatos a biomarcadores, como CTLA-4, CXCR4 y C1QC. La caracterización de sus vías de señalización permitirá su validación como biomarcadores, lo cual podría mejorar la etapificación y el manejo terapéutico de los pacientes con melanoma.

b. Antecedentes.

El melanoma es un cáncer que surge a partir de melanocitos, las células que producen el pigmento melanina. Pese a ser una forma infrecuente de cáncer de piel, el melanoma representa el 80% de las muertes por cáncer de piel. Tanto la incidencia del melanoma como la tasa de mortalidad están en rápido aumento en todo el mundo, lo cual constituye una carga significativa y creciente para el sistema de salud. En los últimos tres decenios el melanoma ha aumentado su frecuencia mundial en 400% y se espera que esta tendencia continúe. Cuando el melanoma se diagnostica después de una metástasis distante, el pronóstico es muy desfavorable. La tasa de supervivencia a 5 años es de 15 % con una mediana de supervivencia de entre 8 y 9 meses. La dacarbazina ha sido el tratamiento farmacológico estándar para la mayoría de los pacientes, pero tiene muy bajas tasas de respuesta.

Ante este panorama, se ha realizado mucha investigación para conocer mejor la biología tumoral del melanoma. Así, se conocen diversas alteraciones genéticas involucradas en su desarrollo y progresión, como mutaciones en BRAF, PTEN, MITF, NRAS, PI3K, AKT, MEK, NF1, entre otros. Con este conocimiento, se han aprobado nuevos medicamentos para el tratamiento del melanoma avanzado, como Vemurafenib y Trametinib, inhibidores de cinasa usados en aquellos con mutaciones en BRAF o MEK, respectivamente. También se utilizan inhibidores de *checkpoints*

inmunológicos, como Ipilimumab (anti-CTLA-4), Pembrolizumab (anti-PD-1) y Nivolumab (anti-PD-1), que han revolucionado el tratamiento de pacientes con melanoma avanzado y muchos otros cánceres. El bloqueo de CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) y PD-1 (*programmed cell death 1*) aumenta las respuestas inmunes antitumorales mediadas por células T. Esto, aunado a que los melanomas tienen cargas mutacionales muy altas (0.5 a 100 mutaciones por megabase) que pueden dar lugar a neoantígenos, explica en parte el que la inmunoterapia sea el primer tratamiento que demostró mejorar la sobrevida global en melanoma avanzado. Sin embargo, sólo una minoría de los pacientes logran una respuesta duradera con estos tratamientos, lo que pone de manifiesto lo mucho que aún falta por develar sobre los mecanismos de acción y evasión de esos blancos moleculares, así como la necesidad de descubrir nuevos biomarcadores pronósticos. Para ello, el melanoma se ha estudiado desde un enfoque molecular para su diagnóstico, abordaje terapéutico y clasificación, detectando sobreexpresión o subexpresión de genes por medio de tecnologías de alto rendimiento, como los microarreglos de expresión. Entre 1996 y el 2006, se realizaron 129 investigaciones sobre melanoma que emplearon microarreglos, pero ni esos ni los realizados en la última década han sido capaces de consensar un panel de biomarcadores pronósticos para esta enfermedad. Afortunadamente, los archivos de microarreglos de diferentes grupos de investigación se pueden re-emplear para realizar un meta-análisis. El poder estadístico y de refinamiento del meta-análisis llega a ser mayor que el de cada uno de los análisis individuales originarios. Además, cuando los estudios originales presentan resultados contradictorios, el meta-análisis permite estimar un efecto promedio o destacar una variación sutil pero importante.

La presente iniciativa de investigación surge de investigadores básicos y clínicos, que hemos venido trabajando en los últimos años con el melanoma. Así, proponemos realizar la validación de biomarcadores, iniciando con CTLA-4, CXCR4 y C1QC, que fueron detectados con un meta-análisis de microarreglos de cultivos primarios de melanocitos, nevos, melanomas en estadios I, II, III y IV, así como de metástasis de melanoma. CTLA4 es una proteína normalmente presente en la superficie de los

linfocitos T que regula negativamente su respuesta. Como se mencionó previamente, es el blanco de ipilimumab. Recientemente, se reportó una correlación significativa entre altos niveles de expresión de CTLA4 y AKT fosforilado en células de melanoma avanzado y la pobre respuesta a ipilimumab. Nuestro meta-análisis detectó su sobreexpresión desde la transformación de melanocito a melanoma, es decir, podría estar implicado en fenómenos de inhibición inmunológica, lo que implicaría un mal pronóstico y pobre respuesta a tratamiento, independientemente de cuál sea. C1QC codifica para una proteína secretada y según nuestro meta-análisis se sobreexpresa en metástasis, siendo sus valores de cambio muy altos, por lo que podría asociarse a un peor pronóstico. Además, según el ProteinAtlas, la cantidad de C1QC en el resto de los tejidos es baja, por lo que podría ser un excelente biomarcador sérico. C1QC no ha sido relacionado previamente a melanoma. CXCR4 da origen a un receptor de quimiocinas que está implicado en metástasis. En el 2017 se reportó su valor pronóstico en estadios II de melanoma.

c.1. Objetivo general.

Generar conocimiento básico sobre posibles biomarcadores pronósticos en biopsias y líneas celulares de melanoma.

c.2. Objetivos particulares.

1. Conocer los niveles de expresión de CTLA-4, C1QC y CXCR4 en 2 líneas celulares de melanoma y en una línea celular de melanocitos no tumorigénica.
2. Caracterizar el efecto de la unión a ligando de CTLA-4 en la activación de la vía PI3K/Akt en líneas celulares de melanoma.
3. Determinar el efecto de la unión a ligando de CTLA-4 solo o en combinación con un inhibidor de PI3K en mecanismos de apoptosis, invasión, migración y proliferación, en células de melanoma.
4. Indagar si la expresión de C1QC en su forma soluble es diferente entre líneas celulares de melanoma y una línea celular de melanocitos no tumorigénica.
5. Describir el efecto del ligando de CXCR4 sobre invasión y migración en líneas celulares de melanoma.

6. Identificar la frecuencia de expresión de CTLA-4, CXCR4 y C1QC en las células tumorales de pacientes con melanoma.
7. Asociar características clínico-patológicas de pacientes con melanoma con los niveles de expresión de CTLA-4, CXCR4 y C1QC.

d. Descripción, incluyendo hipótesis y metodología (máximo 2 cuartillas).

Hipótesis.

En células de melanoma, CTLA-4 modula la activación de la vía PI3K/Akt desencadenando eventos pro-tumorales como la proliferación, la migración, la invasión, la evasión de apoptosis o la inhibición de la respuesta inmune. CTLA-4, CXCR4 y C1QC en biopsias se asociarán a un peor pronóstico en los pacientes.

Metodología.

Cultivo celular. Será utilizada una línea celular de melanocitos no tumorigénica (HEMa) y 2 líneas celulares de melanoma: Sk-Mel-31 (HTB73) y A375 (CRL1619). Sk-Mel-31 proviene de melanoma estadio II y A375 se obtuvo de un melanoma estadio IV (sitio primario). Se utilizarán los medios de cultivo recomendados por la ATCC: medio MEM con 15% SFB para las Sk-Mel-31, DMEM con 10% SFB para las A375 y el medio Dermal Cell Basal (PCS200030) suplementado con el kit *Adult Melanocyte Growth* (PCS200042). Se cultivarán a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

PCR en tiempo real. Con esta técnica se realizará la cuantificación de la expresión del ARNm de CTLA-4, CXCR4 y C1QC en las 3 líneas celulares. Se obtendrá el ARN total de las líneas celulares utilizando el kit Tripure RNA Purification (Roche Applied Science) y siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor. Para evaluar la integridad del ARN se empleará el Bioanalizador 2100 (Agilent) con el kit RNA 6000 Nano LabChip. Se empleará el kit iScript (170-8890) para la obtención del ADNc. La qRT-PCR se llevará a cabo usando el kit iTaq (172-5120) y se empleará el equipo 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems).

Análisis de proteínas mediante Western Blot. Se determinará la presencia de CTLA-4, CXCR4, C1QC y las formas fosforiladas y totales de diferentes cinasas por medio de *Western blot*, utilizando anticuerpos comerciales específicos. Las proteínas totales

serán separadas por electroforesis y se transferirán a una membrana de PVDF. La membrana será bloqueada por 1 h a temperatura ambiente con 5% de leche en TBS-T. Transcurrido ese tiempo, se agregará el anticuerpo primario y se dejará incubando toda una noche a 4°C. La membrana será lavada para posteriormente ser incubada con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente el ensayo se revelará con quimioluminiscencia.

Cuantificación de células apoptóticas (Citometría de flujo). Las células apoptóticas serán identificadas y cuantificadas usando el Apoptosis Assay Kit 6 (Molecular Probes). Brevemente, 1×10^6 células tratadas se lavarán con PBS a 4°C e incubadas con Biotina-X-Anexina V en 100 μ L del *buffer* de unión que contiene 50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM CaCl_2 , pH 7.4, durante 15 min a temperatura ambiente. Después se adiciona 1 μ g de Alexa Fluor 350 estreptavidina y se incuba 30 min a 4°C. Pasado el tiempo de incubación las células se centrifugan y se resuspenden en 1 mL del *buffer* de unión. Se adiciona 1 μ g de yoduro de propidio y se incuba 10 min a 4°C. Las células marcadas se analizarán en un citómetro BD Biosciences FACS Calibur con el software FCS express V3 (De Novo).

Ensayo de invasión. Para determinar si la activación de PI3K/Akt mediada por CTLA-4 tiene repercusiones sobre invasión celular, se realizarán ensayos en cámaras Boyden. En el pozo superior de la cámara de Boyden se colocarán 500 μ L de la suspensión celular con $0.5-1.0 \times 10^6$ células/mL en medio libre de suero, mientras que en el pozo inferior se colocaran 500 μ L de medio de cultivo completo. La cámara se incubará a 37°C por 24-72 h. Se usará el kit de Chemicon QCM™ 24-Well Cell Invasion Assay (Fluorometric), en donde las células que logran invadir el ECMatrix™ son lisadas y detectadas con un marcador fluorescente (CyQuant GR®, Molecular Probes). Una muestra de cada pozo será medida en un lector de fluorescencia para microplacas (λ_{ex} 480nm, λ_{em} 520 nm) de la marca TECAN.

ELISA para C1QC. Para la medición cuantitativa de C1QC en sobrenadante de los cultivos celulares, se utilizará un kit marca Aviva Systems Biology (OKEH04301), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Muestras tumorales. Se incluirán todos los pacientes que acudan a la Clínica de Melanoma del INCan, con diagnóstico histológicamente confirmado de melanoma cutáneo estadio III o IV irresecable, de acuerdo a los criterios de la AJCC 7, que cuenten con bloques con tejido tumoral para su análisis, que sean candidatos a recibir tratamiento sistémico (cualquier tipo), que hayan firmado el consentimiento informado y que tengan enfermedad medible de acuerdo con los criterios RECIST. La historia clínica de los pacientes cuyas muestras tumorales serán analizadas, provendrá de sus expedientes médicos. Las muestras tumorales, fijadas en formalina y embebidas en parafina, que hayan sido utilizadas para el diagnóstico histológico de los pacientes con melanoma incluidos en este estudio, se obtendrán del departamento de patología del INCan. Se realizarán cortes histológicos para determinar la expresión de CTLA4 y CXCR4 por inmunohistoquímica y para la expresión de C1QC se hará la extracción de RNA para ensayos de RT-PCR.

e. Formación de recursos humanos.

Se tiene contemplada la realización de Proyectos Terminales de la Licenciatura en Biología Molecular y programas afines. Se recibirán también alumnos para realizar su Servicio Social como apoyo a las labores de este proyecto. Asimismo, también se considera la participación de alumnos de posgrado.

f. Impacto esperado del proyecto.

Se producirá conocimiento relevante, pertinente y competitivo, sobre biomarcadores candidatos en melanoma. Este conocimiento básico puede permear a los alumnos de nivel licenciatura, a través de conferencias, de la impartición de cursos optativos en los últimos trimestres de sus licenciaturas, o bien, invitándoles a participar en la redacción de artículos de divulgación científica. Además, los resultados de este proyecto permitirán que el cuerpo académico al que pertenecemos 2 participantes, continúe en su estado de consolidación.

7. Recursos necesarios para el proyecto

a. Financiamiento e infraestructura física y humana actual en el proyecto.

Contamos con financiamiento por parte del Departamento de Ciencias Naturales. Además, Rectoría de la Unidad nos otorgó apoyo presupuestal para llevar a cabo el análisis de las muestras tumorales.

Con respecto a los recursos humanos, se sometió a PRODEP una solicitud de apoyo para la realización de una estancia posdoctoral, a través del Cuerpo Académico Fisiología Tisular y Celular.

Se cuenta con la infraestructura del laboratorio de Biología Celular y del equipo divisional compartido. Por ejemplo, un micrótopo de corte semimotorizado marca Leica modelo RM2245 y un procesador automático de tejidos marca Leica modelo TP1020. También se tiene 1 citómetro BD FACSCalibur, 3 campanas de bioseguridad A2 tipo II, 2 incubadoras de CO₂, una ultracentrífuga Sorval, 2 centrífugas clínicas y una microcentrífuga refrigerada. También se cuenta con 2 microscopios invertidos y un microscopio de epifluorescencia invertido modelo Axiovert 40 CFL (Zeiss). Hay micropipetas, refrigeradores, congeladores, un termociclador Applied, un equipo digitalizador de imágenes de geles de proteínas y de ácidos nucleicos, un transiluminador de luz ultravioleta y de luz visible, microfugas de mesa, 2 estufas de incubación para bacterias, un potenciómetro, cámaras para electroforesis de proteínas y de ácidos nucleicos, fuentes de poder para desarrollar las electroforesis. Adicionalmente, se cuenta con laboratorios comunes específicos para el trabajo con bacterias, cromatografías, cuarto frío, cuarto oscuro y esterilización de medios en autoclaves. Los equipos comunes incluyen balanzas analíticas, un ultracongelador, un lector de placas de ELISA (marca TECAN), espectrofotómetros, un electroporador (marca Eppendorf), un bioanalizador y un termociclador en tiempo real (marca Applied).

b. Presupuesto calendarizado.

Se considera un gasto anual de 500,000 pesos aproximadamente. El gasto se realizará principalmente en los meses de febrero a junio y de septiembre y noviembre de cada uno de los cuatro años de duración del proyecto.

c. Fuentes de financiamiento externas.

Se cuenta con una fuente de financiamiento externo (Programa de Estímulos a la Innovación del CONACYT, proyecto 250768). Se sometieron 2 proyectos a 2 convocatorias de CONACYT (Ciencia Básica 2018 y FOSISS 2018).

8. Calendario de actividades en períodos trimestrales.

Actividad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Detección de biomarcadores en líneas celulares	X	X	X									
Sometimiento del proyecto al comité de ética e investigación del Instituto Nacional de Cancerología	X											
Reclutamiento de pacientes y análisis de historias clínicas		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Detección de biomarcadores en muestras tisulares			X	X	X	X	X	X				
Ensayos de actividad biológica y funcional.		X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Presentación de resultado en congresos					X				X		X	
Publicación de resultados							X				X	
Formación de recursos humanos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

9. Información para el seguimiento del proyecto.

Producto	1er año	2º año	3er año	4º año
Servicio Social		1	1	
Proyectos Terminales	1	1	1	
Alumno de posgrado				1
Presentaciones en congresos y eventos		1	1	1
Publicaciones			1	1