

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR

IDENTIFICACIÓN DE GENES COMO NUEVOS BLANCO EN MELANOMA
RESISTENTE A INHIBIDORES DE BRAF

CARMEN I. MELA SÁNCHEZ

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

Dr. Edgardo Castro Pérez, Asesor Principal

Dr. Rolando Gittens, Jurado

Dr. Julio Castillo, Jurado

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2023

DEDICATORIA

Principalmente a Dios por sostenerme y darme las fuerzas necesarias para seguir adelante en todo momento. A mis padres Abraham Mela y Carmen Sánchez por su apoyo y aliento para seguir mis sueños. A mi Esposo Olmedo González por su apoyo incondicional durante todo este proceso y a nuestro Hijo Jayden Jesús por ser el motor y la inspiración para culminar esta meta. A mis hermanos Aramis Abraham y Aramis Arantes por su ejemplo y ayuda durante toda mi vida. Y a mi abuelo Jeremías Mela por su apoyo durante toda mi vida.

Carmen Mela

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios por permitirnos culminar esta importante meta de nuestra vida. A la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) por otorgarme una beca para dedicarme tiempo completo a mis estudios. Además, agradezco a la SENACYT por los fondos otorgados a mi asesor principal de tesis para culminar este proyecto. Muy agradecida del Departamento de Genética y Biología Molecular y al Programa de Maestría en Biología Molecular por la oportunidad de realizar mis estudios y todo el apoyo brindado. La culminación de este logro hubiera sido imposible sin el apoyo de INDICASAT-AIP, por lo que agradezco mucho el apoyo en facilidades y fondos de para el proyecto. Agradecimiento especial al Dr. Vijay Setaluri de la Universidad de Wisconsin por su apoyo en las colaboraciones de publicaciones, así como por la donación de las líneas celulares utilizadas en la investigación de tesis. Agradezco al Dr. Rolando Gittens por el apoyo en facilidades, equipos y algunos insumos, y por su dedicación como co-asesor y los momentos compartidos en el congreso IESTEC-UTP 2022 y las reuniones de laboratorio con su grupo. Agradezco al Dr. Julio Castillo por su dedicación como co-asesor y ayuda con algunos análisis estadísticos, por sus recomendaciones y sugerencias en la revisión del documento de la tesis. Agradezco la asistencia del Licenciado Dilan Moreno, técnico de laboratorio de INDICASAT por su asistencia en la toma de las fotografías con el microscopio confocal. Al Dr. Germán Espino, médico oncólogo-hematólogo del Hospital Santo Tomás y del Centro Hemato Oncológico Panamá, por su apoyo en diferentes actividades y fases de la investigación. A mi asesor principal, el Dr. Edgardo Castro Pérez, por su guía y apoyo en toda la realización del proyecto, no hay palabras para agradecerle todo su apoyo.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----|
| DEDICATORIA | II |
| AGRADECIMIENTOS | III |
| ÍNDICE GENERAL | IV |
| ÍNDICE DE CUADROS..... | VI |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | VII |
| ABREVIATURAS UTILIZADAS | IX |
| RESUMEN | X |
| SUMMARY | XI |
| CAPITULO I | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| OBJETIVO GENERAL: | 6 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS:..... | 6 |
| Objetivo específico 1: | 6 |
| Objetivo específico 2: | 6 |
| Objetivo específico 3: | 6 |
| CAPÍTULO II..... | 7 |
| MARCO TEÓRICO..... | 7 |
| Origen y desarrollo del melanoma..... | 8 |
| Diversidad de mutaciones conductoras de melanoma..... | 12 |
| Vías de señalización clave en el inicio y progresión del melanoma | 15 |
| Plasticidad celular, resistencia a fármacos y metástasis agresiva en melanoma | 16 |
| CAPÍTULO III..... | 21 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| Líneas celulares, cultivo y preparación para secuenciación del transcriptoma | 22 |
| Secuenciación de RNA-total y análisis bioinformáticos preliminares | 22 |
| Análisis para selección de genes candidatos | 23 |

| | |
|--|----|
| Transducción lentiviral y silenciamiento molecular con shRNA | 25 |
| Bioensayos de proliferación/sobrevivencia celular MTT | 25 |
| Bioensayos de clonogenicidad celular..... | 26 |
| Detección de expresión del gen reportero EGFP por microscopía confocal | 26 |
| Tratamientos con BRAFi y con shRNA para extracción de proteínas. | 27 |
| Análisis de expresión de proteínas mediante Western blot | 28 |
| Análisis estadísticos..... | 28 |
| CAPÍTULO IV | 29 |
| RESULTADOS | 29 |
| CAPÍTULO V | 46 |
| DISCUSIÓN..... | 46 |
| CAPÍTULO VI..... | 50 |
| CONCLUSIONES | 51 |
| RECOMENDACIONES | 52 |
| REFERENCIAS..... | 53 |
| ANEXOS | 61 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| TABLA 1. Lista preliminar de “Top100” genes expresados en células MRA5 y MRA6 .. | 32 |
| TABLA 2. Lista de genes diferencialmente expresados en líneas celulares MRA5 y MRA6 determinado mediante análisis de Diagramas de Venn..... | 34 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Tipos de melanoma CSD y no-CSD..... | 11 |
| Figura 2. Mapa de calor que resume los análisis preliminares de expresión diferencial en líneas celulares MRA5 y MRA6..... | 31 |
| Figura 3. Diagramas de Venn analizados donde se muestran el número de genes expresados por ambas células (66 genes) y el número de genes expresados sólo en MRA5 y sólo en MRA6 (34 genes en cada célula) | 33 |
| Figura 4. Clasificación funcional de los 34 genes expresados sólo por MRA6, determinado mediante la herramienta Panther..... | 34 |
| Figura 5. Patrones de expresión genética de los seis genes más expresados en células MRA6 y clasificados en “Procesos de desarrollo” (G.O.:0032502) en diferentes tipos de cánceres analizados en GEPIA2 donde se compara tejido normal y tumor. TPM= Transcriptos por millón de kilo base..... | 36 |
| Figura 6. Patrones de expresión genética de los seis genes más expresados en las células MRA6 y clasificados en “Procesos de desarrollo” (G.O.:0032502) en melanoma (SKCM) analizados en la base de datos GEPIA2. TPM= Transcriptos por millón de kilo base..... | 37 |
| Figura 7. Supervivencia promedio de los pacientes de melanoma según el nivel de expresión de los seis candidatos seleccionados, analizados en GEPIA2..... | 39 |
| Figura 8. Experimentos de Western blot donde se muestra que la expresión de SOX10 es inducida por el inhibidor de BRAF..... | 41 |

Figura 9. Tratamiento de células MRA6 con shRNA anti-SOX10 silencia molecularmente la expresión de SOX10 significativamente ($p < 0.05$)43

Figura 10. La inhibición de la expresión de SOX10 mata las células de melanoma.....44

ABREVIATURAS UTILIZADAS

| | |
|------|--|
| ACC | Adrenocortical carcinoma |
| BLCA | Bladder Urothelial Carcinoma |
| BRCA | Breast invasive carcinoma |
| CESC | Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma |
| CHOL | Cholangio carcinoma |
| COAD | Colon adenocarcinoma |
| DLBC | Lymphoid Neoplasm Diffuse Large B-cell Lymphoma |
| ESCA | Esophageal carcinoma |
| GBM | Glioblastoma multiforme |
| HNSC | Head and Neck squamous cell carcinoma |
| KICH | Kidney Chromophobe |
| KIRC | Kidney renal clear cell carcinoma |
| KIRP | Kidney renal papillary cell carcinoma |
| LAML | Acute Myeloid Leukemia |
| LGG | Brain Lower Grade Glioma |
| LIHC | Liver hepatocellular carcinoma |
| LUAD | Lung adenocarcinoma |
| LUSC | Lung squamous cell carcinoma |
| MESO | Mesothelioma |
| OV | Ovarian serous cystadenocarcinoma |
| PAAD | Pancreatic adenocarcinoma |
| PCPG | Pheochromocytoma and Paraganglioma |
| PRAD | Prostate adenocarcinoma |
| READ | Rectum adenocarcinoma |
| SARC | Sarcoma |
| SKCM | Skin Cutaneous Melanoma |
| STAD | Stomach adenocarcinoma |
| TGCT | Testicular Germ Cell Tumors |
| THCA | Thyroid carcinoma |
| THYM | Thymoma |
| UCEC | Uterine Corpus Endometrial Carcinoma |
| UCS | Uterine Carcinosarcoma |
| UVM | Uveal Melanoma |

RESUMEN

El melanoma es la enfermedad más mortal de la piel, el órgano más grande del cuerpo humano. El melanoma surge debido a la transformación maligna de los melanocitos, los cuales acumulan alteraciones genéticas que conllevan a su proliferación y diseminación anormal. Este cáncer es propenso a metástasis y a recurrencia, y representa cerca del 75% de la mortalidad asociada al cáncer de piel. En melanoma, la vía de transducción intracelular MAPK muestra hiperactividad debido a mutaciones en el gen BRAF. En particular, la mutación BRAFV600E se encuentran en 60-65% de los melanomas. Los tumores con esta mutación no responden a la quimioterapia y los pacientes tienen un pronóstico desfavorable. Terapias desarrolladas para inhibir específicamente el oncogén BRAFV600E (Inhibidores de BRAF, BRAFi) han mostrado alta eficacia a corto plazo, sin embargo, prácticamente todos los pacientes desarrollan metástasis agresiva con resistencia al inhibidor BRAF (BRAFi). Esto deja a los pacientes sin opciones de tratamiento y con supervivencia menor al 20%, por lo que la identificación de nuevos blancos para el desarrollo de tratamientos más efectivos es una prioridad. La resistencia a inhibidores BRAFi y agresividad en melanoma se han asociado con células madre cancerígenas (CSC, del inglés “cáncer stem cells”) conocidas como células madre de melanoma (MSC, del inglés “melanoma stem cells”) y activación de genes de células madre/MSC. Sin embargo, se desconocen los mecanismos y genes implicados en activación de MSC, supervivencia y resistencia a tratamientos. Para abordar esto, en esta investigación nos propusimos identificar genes como nuevos blancos contra melanoma mediante análisis de transcriptoma. Para esto comparamos la expresión diferencial de células de melanoma metastásico sensibles a BRAFi y células metastásicas resistentes a este inhibidor. Los genes identificados preliminarmente fueron sometidos a varios criterios de análisis de expresión y supervivencia. Nos enfocamos en identificar genes asociados a células madre como candidatos involucrados en la adquisición de resistencia a los inhibidores de BRAFi en células sensibles al inhibidor. Los análisis identificaron el gen SOX10 como un potencial gen candidato, por lo que nos enfocamos en el mismo para estos estudios. En primer lugar, SOX10 es un factor de transcripción que normalmente se expresa en desarrollo y en células madre, por lo que hipotetizamos que el mismo podría estar involucrado en activación de mecanismos de MSC, supervivencia y resistencia a BRAFi. Estudios de Western blot, determinaron que SOX10 no sólo muestra expresión basal, sino también que su expresión es inducida como resultado del tratamiento con el inhibidor de BRAF. La inducción de SOX10 por el inhibidor nos sugirió que el mismo podría tener un papel en mecanismos de adquisición a resistencia de BRAFi, en la activación de MSC y supervivencia del melanoma. Para confirmar esto, silenciamos molecularmente la expresión de SOX10 mediante tratamiento con shRNA-mediado por lentivirus. Los datos demostraron que el tratamiento con shRNA redujo la expresión de SOX10 en más del 70%. Bioensayos de supervivencia celular MTT demostraron que inhibir SOX10 mata a las células de melanoma a corto plazo a las 24h, 48h, 72h y 96h. Además, bioensayos de clonogenicidad demuestran que inhibir SOX10 con shRNA mata a las células de melanoma a largo plazo a las dos (2) semanas. Estos datos *in vitro* demuestran que SOX10 es requerido para la supervivencia del melanoma, por lo que sería un buen candidato para el

posible desarrollo de nuevos tratamientos. Estudios futuros *in vivo* mediante modelos de ratones de xenotransplante confirmarán estos resultados.

SUMMARY

Melanoma is the deadliest disease of the skin, the largest organ in the human body. Melanoma arises due to the malignant transformation of melanocytes, which accumulate genetic alterations that lead to their abnormal proliferation and spread. This cancer is prone to metastasis and recurrence, and represents about 75% of the mortality associated with skin cancer. In melanoma, the intracellular MAPK transduction pathway shows hyperactivity due to mutations in the BRAF gene. In particular, the BRAFV600E mutation is found in 60-65% of melanomas. Tumors with this mutation do not respond to chemotherapy and patients have a poor prognosis. Therapies developed to specifically inhibit the BRAFV600E oncogene (BRAF Inhibitors, BRAFi) have shown high short-term efficacy, however, virtually all patients develop aggressive metastasis with resistance to the BRAF inhibitor (BRAFi). This leaves patients without treatment options and with survival of less than 20%, therefore, the identification of new targets for the development of more effective treatments is a priority. Resistance to BRAFi inhibitors and aggressiveness in melanoma have been associated with cancer stem cells (CSCs) known as melanoma stem cells (MSCs) and activation of stem cell/MSC genes. However, the mechanisms and genes involved in MSC activation, survival and resistance to treatments are unknown. To address this, here we set out to identify genes as new targets against melanoma through transcriptome analysis. For this, we compared the differential expression of metastatic melanoma cells sensitive to BRAFi and metastatic cells resistant to this inhibitor. The list of preliminarily identified genes were subjected to various expression and survival analysis criteria. We focused on identifying stem cell-associated genes as candidates involved in the acquisition of resistance to BRAFi inhibitors in cells sensitive to the inhibitor. The analyzes identified the SOX10 as a potential candidate gene, so we focused on it for these studies. Firstly, SOX10 is a transcription factor that is normally expressed during development and in stem cells, so we hypothesize that it could be involved in the activation of MSC mechanisms, survival and resistance to BRAFi. Western blot studies determined that SOX10 not only shows basal expression, but also that its expression is induced as a result of treatment with the BRAF inhibitor. The induction of SOX10 by the inhibitor suggested that it could play a role in mechanisms of acquisition of BRAFi resistance, in MSC activation and melanoma survival. To confirm this, we molecularly silenced SOX10 expression by lentivirus-mediated shRNA treatment. The data demonstrated that shRNA treatment reduced SOX10 expression by more than 70%. MTT cell survival bioassays demonstrated that inhibiting SOX10 kills melanoma cells in the short term at 24h, 48h, 72h and 96h. Additionally, clonogenicity bioassays demonstrate that inhibiting SOX10 with shRNA kills melanoma cells in the long-term at two (2) weeks. These *in vitro* data demonstrate that SOX10 is required for melanoma survival, making it a good candidate for the possible development of new treatments. Future *in vivo* studies using xenotransplant mouse models will confirm these results.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El melanoma cutáneo es la enfermedad más mortal de la piel, la cual se desarrolla en las células que producen melanina, los melanocitos (Miller & Mihm, 2006). Este cáncer es altamente maligno, propenso a la metástasis y la recurrencia, y representa cerca del 75% de la mortalidad asociada al cáncer de piel (Lo & Fisher, 2014). A nivel mundial, en el año 2020 se reportaron 324,635 nuevos casos y unas 57,043 muertes (WHO-The Global Cancer Observatory, 2020). Este es uno de los cánceres de mayor crecimiento y muertes en el mundo. Por ejemplo, sólo en Estados Unidos, la incidencia de melanoma aumentó un 270% entre 1973 y 2002 (Cancer Facts & Figures 2021). En el Instituto Oncológico Nacional (ION) de Panamá, estiman que son diagnosticados entre 150 y 200 nuevos pacientes por año en el país. Aunque es un número relativamente bajo, se considera un poco alto para el tamaño de la población con ascendencia blanca minoritaria. Más aún, los datos del ION indican que los pacientes de melanoma en Panamá muestran una supervivencia menor a 3 años, la cual está muy por debajo de otros países que muestran supervivencia de superior a 5 años (El Achtar, 2019).

Frecuentemente, el melanoma es diagnosticado en áreas de la piel comúnmente expuestas al sol, pero también en áreas que usualmente están menos expuestas al sol durante la vida del paciente. Estos melanomas se clasifican en dos categorías principales según la ubicación anatómica de su aparición: daño solar crónico (CSD, por sus siglas del inglés “chronically sun-damaged”) y daño solar no crónico (no-CSD, del inglés “non-CSD”). Los melanomas CSD suelen surgir en áreas de la piel que están naturalmente expuestas de forma prolongada a la radiación UV durante toda la vida, como el cuello y la cabeza; estos suelen exhibir un crecimiento lentiginoso (lento) y maligno, llamados melanoma lentigo maligno. En cambio, los melanomas no CSD suelen aparecer en las

extremidades proximales y el tronco y se clasifican como melanomas de extensión superficial (Shain & Bastian, 2016).

Aproximadamente 70% de los melanomas cutáneos presentan mutaciones activantes en el proto-oncogén BRAF (“viral del sarcoma murino v-raf”), (Cancer Genome Atlas N, 2015). Cerca del 90% de los melanomas BRAF mutante albergan la transversión BRAFT1799A, que codifica la oncoproteína BRAFV600E, la cual conduce a la activación constitutiva de BRAF y la consecuente hiperactividad de la vía de transducción intracelular MAPK (vía de la proteína quinasa activada por mitógenos) que resulta en crecimiento y proliferación descontrolada (Cheng et. al., 2018). Desafortunadamente, los pacientes con melanomas BRAF mutantes no responden a la quimioterapia tradicional (Houben et. al., 2004; Holderfield et. al., 2014), y existe una alta tendencia de estos pacientes a recaer y volverse resistentes a los agentes terapéuticos actuales (Holderfield et. al., 2014). Los inhibidores BRAF (BRAFi) se utilizan como terapia dirigida específicamente para inhibir BRAFV600E, sin embargo, los mismos son eficaces sólo a corto plazo, ya que prácticamente todos los pacientes desarrollan resistencia a BRAFi e incluso a la inhibición combinada de BRAF y otros componentes de la vía MAPK, llamados inhibidores de MEK (MEKi) (Robert et. al., 2015). Esto deja a los pacientes con muy pocas opciones de tratamiento y una supervivencia menor al 20% (Flaherty et al, 2012; Robert et al, 2015; Cancer Facts & Figures 2021). Los tumores resistentes a inhibidores de BRAF son el mayor desafío para el tratamiento del melanoma, por lo que el desarrollo de nuevos tratamientos más efectivos es una prioridad para estos pacientes.

La identificación e inactivación de nuevos genes blancos, brindaría oportunidades terapéuticas novedosas a los pacientes de melanoma con mutación BRAFV600E resistente

a fármacos. Sin embargo, los mecanismos y genes involucrados en la adquisición de resistencia a tratamientos no son bien conocidos. Existen varios mecanismos asociados al desarrollo de resistencia a tratamientos y metástasis agresiva en melanoma. Por ejemplo, reportes indican que cambios genéticos y/o epigenéticos en las células de melanoma juegan un papel en el desarrollo de la resistencia a los inhibidores de BRAF y contribuirían ampliamente a la heterogeneidad tumoral (Hugo et. al., 2015; Raaijmakers et. al., 2016; Vido et. al., 2018; Stagni et. al., 2018; Sullivan & Flaherty, 2013; Kakadia et. al., 2018). Por otro lado, estudios más recientes han asociado dicha resistencia a los inhibidores de BRAF y MEK con la activación de células madres cancerosas (CSC, del inglés “cáncer stem cells”) llamadas células madre del melanoma (MSC, del inglés “melanoma stem cell”) y activación de genes y vías de transducción de células madre/CSC/MS (Roesch et al., 2010, Zhang et al., 2017; Jamal et al., 2020). Por ejemplo, previamente se reportó que el inhibidor BRAFi facilita la reprogramación de las células de melanoma al estado de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) y que las células reprogramadas exhiben resistencia adquirida al inhibidor BRAFi (Castro-Pérez et. al., 2019). Estos datos sugieren que el inhibidor BRAFi induce cambios en expresión de diversos genes asociados a células madre que facilitan en la reprogramación a iPSC y participarían en la activación de mecanismos de resistencia al fármaco.

En ese sentido, nuestro objetivo es identificar genes asociados a células madre/CSC/MS como posibles nuevos blancos en el melanoma resistente a fármacos, a partir del análisis transcriptómico de células sensibles a BRAFi y células resistentes al inhibidor, e inactivar esos genes para evaluar su efecto en la viabilidad y supervivencia celular. Para ello, mediante varias herramientas bioinformáticas y criterios seleccionamos

los mejores genes candidatos como posibles nuevos blancos contra el melanoma. Los análisis identificaron a SOX10, un gen normalmente expresado en células madre durante el desarrollo, como un candidato fuerte, por lo que nuestra investigación se enfocó en estudiar este gen. Para ello, medimos la expresión de SOX10 mediante análisis de Western blot. Los datos demostraron que SOX10 no sólo mostraba expresión basal, sino que también su expresión es inducida en células de melanoma como resultado de tratamiento con el inhibidor de BRAF. La inducción de este gen por el inhibidor nos sugirió que SOX10 podría tener un papel en mecanismos que facilitan reprogramación iPSC, pero más importante, en la adquisición de resistencia a tratamientos, así como en la sobrevivencia del melanoma. Para verificar esta hipótesis silenciamos molecularmente la expresión de SOX10, mediante shRNA-mediado por lentivirus. Hipotetizamos que el silenciamiento de SOX10, tendría un efecto en la supervivencia y proliferación de las células de melanoma. Estudios de Western blot demostraron que el shRNA utilizado inhibió significativamente la expresión de SOX10 en más del 70%. Bioensayos de proliferación/sobrevivencia celular MTT demostraron que el silenciamiento de SOX10 mata a las células de melanoma a corto plazo a las 24, 48, 72 y 96 horas. Adicionalmente, bioensayos de clonogenicidad celular confirmaron que el silenciamiento molecular de SOX10 mata a las células de melanoma a largo plazo a las dos semanas. Estos estudios confirman el potencial de SOX10 como posible nuevo blanco en el tratamiento de melanoma resistente a tratamientos. El posible desarrollo de nuevos tratamientos en melanoma mutante de BRAF tiene el potencial de impactar también a pacientes de otros cánceres que exhiben alta frecuencia de mutación BRAFV600E y resistencia a estos inhibidores, como, por ejemplo, cáncer colo-rectal (15%), tiroides (30-50%), pulmón (3%) y leucemia de células pilosas (100%) (André et al.,

2017). Estos estudios *in vitro* estarán siendo confirmados con estudios *in vivo* en ratones modelo de xenotransplante.

OBJETIVO GENERAL:

Identificar mediante análisis transcriptómicos genes como posibles nuevos blancos en el tratamiento de melanoma y evaluar su papel en sobrevivencia celular mediante bioensayos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Objetivo específico 1:

→ Analizar la expresión genética diferencial de las células de melanoma metastásico (MRA6) que son sensibles al inhibidor BRAF y comparar con células resistentes (MRA5) al inhibidor para seleccionar genes candidatos como nuevos blancos en el tratamiento de melanoma.

Objetivo específico 2:

→ Evaluar los patrones de expresión de un gen candidato (SOX10) mediante análisis de Western blot antes y después de la aplicación del inhibidor de BRAF en células de melanoma metastásico sensibles al inhibidor.

Objetivo específico 3:

→ Evaluar funcionalmente el papel de un gen candidato (SOX10) en sobrevivencia celular del melanoma como posible nuevo blanco mediante silenciamiento molecular y bioensayos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

ORIGEN Y DESARROLLO DEL MELANOMA

El melanoma surge debido a la transformación maligna de los melanocitos, células productoras del pigmento de la piel que acumulan mutaciones que los llevan a una proliferación y diseminación anormal (Bastian, 2014). Los melanocitos son células derivadas de la cresta neural que, durante el desarrollo, colonizan la capa basal de la epidermis, y en menor grado, una amplia gama de otros tejidos en todo el cuerpo, como el folículo piloso, ojos, oídos, los epitelios mucosos, las meninges, la úvea, tracto anogenital y el sistema nervioso central (Slominski et al., 2004; Mort et. al., 2015). Múltiples linajes celulares y patrones migratorios que derivan de la cresta neural, dan origen a los melanocitos, sin embargo, se necesitan más estudios para comprender claramente el linaje celular y las células precursoras de los melanocitos en las diferentes partes del cuerpo; por ello se cree que los diversos orígenes de los melanocitos son un reflejo de la diversidad de subtipos de melanomas (Castro-Pérez et al., 2021).

Los melanocitos tienen la función de sintetizar melanina, un pigmento macromolecular intracelular con propiedades antioxidantes, que protege a las células de agentes dañinos, como los radicales libres, las toxinas y la radiación ultravioleta (UV) (Haass et al., 2005; Ernfors, 2010). La melanina es sintetizada dentro de orgánulos llamados melanosomas, los cuales mediante procesos dendríticos transfieren la melanina a los queratinocitos, dentro de estos, los melanosomas se ubican en áreas perinucleares, donde protegen el ADN de los rayos ultravioletas (Wu & Hammer, 2014).

Los Melanocitos en distintas partes del cuerpo pueden dar lugar a múltiples subtipos de melanoma fenotípica y molecularmente diversos (Bastian, 2014), que pueden estar

relacionados con diferentes lesiones precursoras, que van desde nevos benignos (lunares comunes, incluyendo algunos congénitos) y nevos displásicos hasta melanoma in situ (MIS) (Shain & Bastian, 2016). Los nevos comunes son una agrupación benigna (no cancerosa) de melanocitos. Los nevos displásicos son lesiones benignas comunes en la población general y tienen un riesgo ligeramente mayor que un lunar común en cuanto a predisposición a la formación de melanoma. Esto es porque, los nevos displásicos se forman por melanocitos que se multiplicaron más de lo usual, pero mecanismos de control del ciclo celular y genes supresores de tumores los mantienen en arresto celular de manera segura y es muy raro que cambien a melanoma (Strazzula et. al., 2014). La mayoría de los melanomas se forman en ausencia de un nevo benigno precursor y, en cambio, probablemente se inician a partir de melanocitos o células madre de melanocitos y evolucionan primero como lesiones intermedias que histológicamente pueden ser difíciles de distinguir de un nevo displásico antes de la progresión a melanoma in situ o melanoma invasivo (Shain & Bastian, 2016).

En términos generales, los melanomas cutáneos se pueden clasificar en dos categorías, melanomas CSD, los cuales están en la piel que está crónicamente afectada por el sol (como el cuello, la cara y las manos), y melanoma no-CSD, los cuales se originan en la piel normalmente no expuesta crónicamente por el sol (como el abdomen y la espalda) (**Figura 1**) (Shain y Bastian, 2016; Castro-Pérez et al., 2023). Los melanomas CSD y no-CSD difieren en su sitio anatómico de origen, grado de exposición acumulativa a la radiación UV, edad del huésped, carga de mutaciones y tipos de alteración oncogénica (Curtin et. al., 2005, Viros et. al., 2014). Los melanomas CSD surgen en la piel con elastosis solar marcada (pérdida de la elasticidad), caracterizada por presentar signos macroscópicos

y microscópicos de exposición prolongada a la radiación UV. Por lo tanto, los melanomas de CSD típicamente se originan en la cabeza, el cuello y las superficies dorsales de las extremidades distales de personas mayores de 55 años de edad. Tienen una alta carga de mutaciones y están asociadas con mutaciones en los genes NF1, NRAS, BRAF non-V600E o KIT (Bastian, 2014). En cambio, los melanomas no-CSD, suelen afectar las áreas expuestas al sol de forma intermitente, como el tronco y las extremidades proximales de individuos más jóvenes (menores de 55 años de edad) que no muestran una marcada elastosis solar. Se asocian con una carga de mutaciones moderada y un predominio de mutaciones BRAFV600E. (Shain & Bastian, 2016).

La OMS clasifica las neoplasias melanocíticas en cuatro subtipos clínicos (basados en la clasificación de Clark et. al., 1986): 1) Melanoma de extensión superficial, 2) melanoma nodular, 3) melanoma lentigo maligno y 4) melanoma lentiginoso acral. Esta clasificación se basa en la localización corporal del melanoma primario y los aspectos morfológicos de la fase de crecimiento inicial. El melanoma de extensión superficial es el tipo más común de melanoma, que se muestra en las características distintivas en el “**ABCD**” del diagnóstico del melanoma: **A** = **A**simetría, **B** = **B**ordes irregulares, **C** = variación de **C**olor y **D** = aumento del **D**íámetro (Friedman et. al., 1985). Por lo general, tiene una fase de crecimiento radial prolongada caracterizada por una expansión intraepidérmica sin invasión dérmica que continúa hacia una fase de crecimiento vertical que se asocia con invasión dérmica y peor pronóstico (Ostrowski & Fisher, 2021).

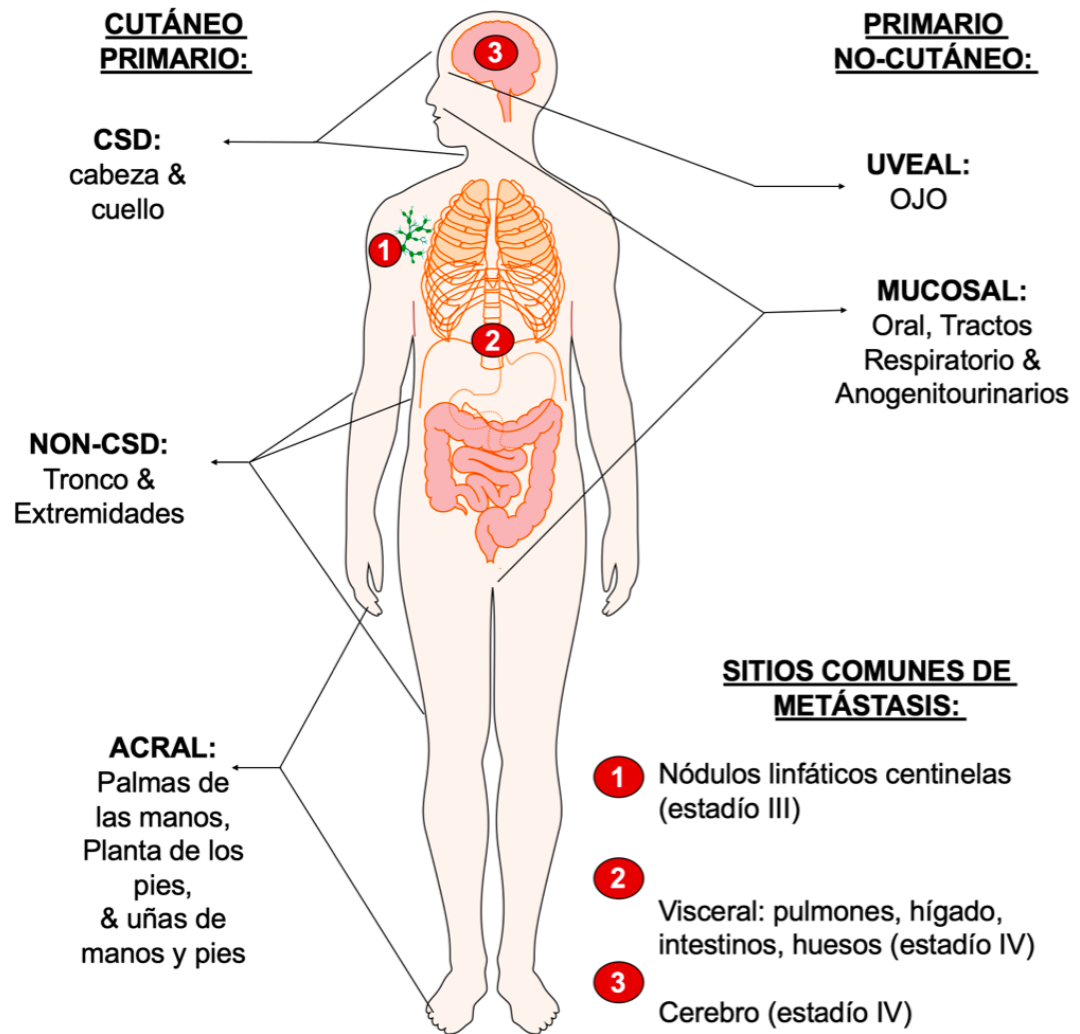


Figura 1. Tipos de Melanoma CSD y no-CSD. Los melanoma CSD ocupan sitios de exposición prolongada a la radiación solar UV (cabeza y cuello) y tienen una aparición tardía, usualmente después de los 55 años de edad y muestran altas cargas mutacionales. Los melanoms no-CSD ocupan sitios anatómicos con exposición intermitente a la radiación solar como el tronco y extremidades, usualmente se presentan a edades más tempranas, antes de los 55 años y se caracterizan por cargas mutacionales más bajas. Tomado con autorización de Castro-Pérez et al., 2023.

Los melanomas nodulares crecen muy rápidamente y, en la mayoría de los casos, en ausencia de una lesión precursora aparente (Clark et. al., 1975). Se cree que el melanoma nodular deriva de un melanocito o de una célula madre de melanocito que acumula mutaciones que predisponen a la melanomagénesis y que después de un segundo impacto de una mutación activadora en la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), es propenso a la formación de melanoma (Shain & Bastian, 2016). El melanoma lentigo maligno deriva de una lesión precursora que se presenta como una mácula que crece lentamente y cambia de color marrón a negro con bordes irregulares, ocurre principalmente en pacientes de edad avanzada con piel de la cara crónicamente dañada por el sol. El melanoma lentigo maligno es un ejemplo de melanoma con expansión lenta y prolongada en la etapa de melanoma *in situ* antes de la progresión a melanoma invasivo; y alrededor del 5% de las lesiones precursoras *in situ* progresan a melanoma lentigo maligno (Weinstock & Sober, 1987). Sin embargo, no se ha dilucidado claramente si los diversos tipos de melanoma provienen de distinto origen celular o mecanismos moleculares aislados. Una mejor comprensión del origen celular de los subtipos de melanoma podría mejorar la clasificación actual, el diagnóstico y pronóstico del melanoma. Además, aún existen algunos subtipos de melanomas que no encajan claramente en ninguna de esas categorías, como los melanomas no cutáneos que se originan en el ojo (uveal melanoma) y en las mucosas de la vía oral, respiratoria y anogenitourinal (melanoma mucosal) (Castro-Pérez et. al., 2019).

DIVERSIDAD DE MUTACIONES CONDUCTORAS DE MELANOMA

Las mutaciones más recurrentes en los melanomas CSD y no CSD afectan genes en vías de señalización clave que gobiernan la proliferación celular (BRAF, NRAS y NF1),

el crecimiento y el metabolismo celular (PTEN y KIT), la identidad celular (ARID2), resistencia a la apoptosis (TP53), control del ciclo celular (CDKN2A), y la vida útil replicativa (TERT). (Hodis et. al., 2012; Huang et. al., 2013; Horn et. al., 2013; Krauthammer et al., 2015).

Las mutaciones clave en los procesos de iniciación de melanoma afectan principalmente la vía MAPK, especialmente los genes BRAF, NRAS y NF1. Siendo la mutación BRAFV600E común en los melanomas no-CSD, los cuales evolucionan como nevos. En cambio, los melanomas CSD se caracterizan por mutaciones en NRAS y BRAF (no V600E), los cuales progresan como lesiones intermedias a melanoma in situ; y mutaciones en NF1, las cuales evolucionan como melanoma in situ. (Shain & Bastian, 2016). El aumento de la carga mutacional de estos genes, la mutación del promotor de la transcriptasa reversa de la telomerasa (TERT), mutación de componentes del complejo de remodelación de cromatina SWI/SNF y pérdida de CDKN2A representan los eventos tempranos en las etapas de nevo a melanoma in situ; mientras que los eventos mutacionales posteriores que causan la progresión a melanoma in situ a melanoma invasivo, incluyen alteraciones en el número de copias y mutaciones en las vías de p53 y del homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) (Shain et. al., 2015; Shain et. al., 2018). A continuación, describimos brevemente las funciones de algunos de estos genes mutados como principal causa del inicio y progresión del melanoma.

BRAF

Las mutaciones activantes en BRAF se encuentran en más del 60% de los melanomas cutáneos (Cancer Genome Atlas, 2015). Estas mutaciones, con mayor

frecuencia, conducen a la sustitución del aminoácido valina (V) por ácido glutámico (E) en el codón 600 (BRA_FV600E); o en menor frecuencia, incluyen otras sustituciones como lisina (K) en el codón 600 (BRA_FV600K), y otras mutaciones recurrentes, pero menos comunes que activan la función de BRA_F (como G469R). Estas mutaciones oncogénicas conducen a la actividad constitutiva de BRA_F y a la activación río abajo (downstream) de MEK y MAPK, sin la necesidad de interacción RAS/RAF (Satyamoorthy et al., 2003; Hingorani et al., 2003). Las mutaciones BRA_FV600E ocurren más comúnmente en melanoma asociado a nevus (no-CSD), localización troncal y pacientes más jóvenes, mientras que las mutaciones BRA_FV600K están más comúnmente relacionadas con exposición crónica a los rayos UV en áreas de la cabeza y el cuello crónicamente expuestas al sol (Stadelmeyer et al., 2014; Menzies et al., 2012).

NRAS

Mutaciones activadoras recurrentes de NRAS son comunes entre el 15 al 20% de los melanomas. La mayoría de las mutaciones ocurren en el codón 61 (Q61R, Q61K, Q61L) y una pequeña fracción ocurre en el codón 12. La mutación NRAS activa la cascada de señalización MAPK y también activa la vía fosfoinositol-3-quinasa (PI3K)-AKT (Ascierto et al., 2013).

NF1

La función del gen supresor de tumores NF1 es promover la conversión de RAS-GTP activo en RAS-GDP inactivo. Las mutaciones en NF1 ocurren entre 10% al 15% de los melanomas y causan la pérdida de esta función, con la consecuente activación de MAPK y PI3K (Krauthammer et al., 2015; Nissan et al., 2014).

PTEN

PTEN es un supresor de tumores que actúa como una fosfatasa lipídica para convertir PIP3 en PIP2 para antagonizar la función de PI3K (Stambolic et al., 1998). La pérdida de PTEN por delección, mutación o desregulación epigenética potencia PI3K, ocurre hasta en un 30% de los melanomas y se asocia más comúnmente con la mutación BRAFV600E, lo que marca el importante papel de la activación de MAPK y PI3K para la melanomagénesis (Goel et al., 2006; Mirmohammadsadegh et al., 2006).

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CLAVE EN EL INICIO Y PROGRESIÓN DEL MELANOMA

Vía MAPK

La vía de señalización MAPK es de importancia central para la patogénesis de muchas formas de cáncer, como el adenocarcinoma de pulmón, el adenocarcinoma colorrectal y el melanoma. La vía de señalización MAPK/ERK está compuesta aguas abajo por las proteínas efectoras RAS, RAF, MEK y ERK. Esta vía se activa, generalmente, mediante la unión de un factor de crecimiento al receptor de citoquinas tirosina quinasa (RTK), el cual se autofosforila, desencadenando eventos de fosforilación, que se propagan desde la membrana celular hasta el núcleo (Cherfils & Zeghouf, 2013; Simanshu et. al., 2017; Lin et. al., 2017). La unión del ligando conduce al reclutamiento de adaptadores de señalización, incluidos GRB2 y SHC, lo que resulta en el reclutamiento de RAS y la conversión de RAS inactivo unido a GDP en RAS activo unido a GTP. La fosforilación de RAS activa a la proteína quinasa de las isoformas RAF (RAF1, BRAF, ARAF), cada isoforma RAF posee una capacidad distinta para activar MEK, siendo BRAF el activador

más fuerte. MEK fosforila y activa proteínas aguas abajo, como ERK1 y ERK2, que pueden translocarse al núcleo y fosforilar diferentes factores de transcripción, que controlan la progresión del ciclo celular; por lo que la señalización descontrolada de esta vía puede provocar proliferación celular, supervivencia, invasión, metástasis y angiogénesis (Teixido et. al., 2021).

Vía PI3K

Las PI3K representan 3 clases de quinasas multisubunitarias que generan fosfoinosítidos específicos. Solo la clase I PI3K fosforila el fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato (PIP2) a fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3), un segundo mensajero clave que conduce a la activación posterior de la serina/treonina quinasa Akt. Akt activado promueve varias vías celulares implicadas en la proliferación, supervivencia y angiogénesis celular. Una de las vías clave reguladas por la activación de Akt son los complejos 1 y 2 de la proteína blanco mamífero de la rapamicina (mTOR), mTORC1 y mTORC2, respectivamente, mediante la inhibición del complejo regulador negativo de esclerosis tuberosa (TSC1/TSC2) (Damsky et al., 2015). La activación de mTORC1 conduce a la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (fosfo-S6), un sello distintivo de la activación de mTOR que promueve el crecimiento celular y supervivencia; y ha sido identificado como un nodo de resistencia a la terapia dirigida (Teh et al., 2018). En el melanoma, PI3K puede activarse por mutación NRAS, mutación de NF1 o pérdida del supresor tumoral PTEN.

PLASTICIDAD CELULAR, RESISTENCIA A FÁRMACOS Y METÁSTASIS AGRESIVA EN MELANOMA

El melanoma maligno es un tumor heterogéneo, en el cual existen diferentes subpoblaciones de células genéticamente divergentes, como las células madre cancerosas (CSC, del inglés “cáncer stem cells”), presentes como una pequeña fracción, y células madre no cancerosas (no-CSC), que forman la mayor parte de la masa tumoral (El-Khattouti et. al., 2014). En melanoma las CSC son conocidas como células madre de melanoma (MSC, del inglés “melanoma stem cells”) y se caracterizan por sus proteínas de superficie únicas y vías de señalización aberrantes, que tienen una relación causal o consecuente con la progresión del melanoma, la resistencia al tratamiento y la recurrencia (Sun et. al., 2011; El-Khattouti et. al., 2014; Kumar et. al., 2016).

Debido a la heterogeneidad, los tumores se caracterizan por tener la capacidad de evadir la toxicidad de los fármacos, adquiriendo, en algunos casos, resistencia a los tratamientos. Se ha establecido que la clasificación de la resistencia tumoral se divide dos tipos: 1) resistencia primaria (intrínseca) y 2) resistencia adquirida o adaptativa (Beasley et. al., 2015). La resistencia primaria representa la minoría de los casos en melanoma y la aparición de la misma se atribuye a mecanismos dependientes de las características intrínsecas de algunos tumores primarios (Yang et al., 2017). Por ejemplo, el desarrollo de la resistencia primaria se atribuye a la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas como respuesta directa a cambios significativos en el microambiente tumoral (Van den Hurk et al., 2012; Pulluri et. al., 2017).

Por otro lado, el desarrollo de la resistencia adquirida o adaptativa representa la mayoría de los casos en melanoma y la misma depende del agente anticancerígeno, es decir, ocurre principalmente después de que se ha iniciado el tratamiento o como consecuencia del tratamiento prolongado de los pacientes (Johannessen et. al., 2010; Yang et. al., 2017;

Kakavand et. al., 2017). A diferencia de la resistencia primaria, una vez que se ha desarrollado la resistencia adquirida, se espera la aparición de una resistencia cruzada/resistencia a múltiples fármacos (Yadav et. al., 2012). Como consecuencia, el tumor se vuelve más resistente a cualquier tipo de terapia (Gowrishankar et. al., 2012).

Las terapias moleculares dirigidas han brindado soluciones mejoradas y menos peligrosas, lo que ha llevado a que los medicamentos genéricos sean reemplazados por inhibidores terapéuticos más precisos. En el caso de los melanomas con oncogenes BRAFV600E y BRAFV600K representan la mayoría de los melanomas (alrededor del 80-90%), se ha demostrado que la proteína mutada es inhibida por vemurafenib y dabrafenib, inhibidores específicos de BRAF (**BRAF_i**) aprobados por la FDA. Este tipo de terapia ha dado resultados positivos en una variedad de cánceres con mutación en BRAF, incluidos los melanomas (Flaherty et al., 2012). Sin embargo, el manejo sostenible de la enfermedad o la supervivencia a largo plazo aún se ve obstaculizado por la resistencia adquirida a los medicamentos.

Las evidencias indican que, en melanoma, la resistencia a los tratamientos está estrechamente asociada principalmente con los mecanismos de resistencia adquirida lo cual involucraría desregulación de vías de señalización aberrantes clave que conllevarían a la activación de cambios en plasticidad y transdiferenciación celular (Johnson et. al., 2015). Estos cambios en plasticidad, transdiferenciación y auto renovación celular estarían relacionados con CSC/MSK y/o activación de mecanismos/vías/genes de células madre que conducirían a la progresión y resistencia a los tratamientos en melanoma (Kemper al., 2014; Roesch et al., 2010; Tsoi et al., 2018). Por lo tanto, se ha propuesto que el estudio de CSC/MSK y vías/genes asociados a CSC/MSK como nuevos blancos celulares sería una

estrategia eficaz para tratar el melanoma (Schatton y Frank, 2008). Sin embargo, no se comprenden los mecanismos que activan plasticidad/transdiferenciación y su relación con expresión de marcadores de CSC/MSK en melanoma. Estudios previos han demostrado que la reprogramación de células de melanoma a células madre pluripotentes inducidas (iPSC) tiene el potencial de contribuir al esclarecimiento de la relación entre la plasticidad/transdiferenciación de las células de melanoma y la resistencia a los medicamentos (Castro-Pérez et al., 2019). En particular, se observó que células sensibles (MRA6) al inhibidor no son reprogramables a célula madre iPSC bajo condiciones de expresión forzada de seis factores de reprogramación (OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, LIN28, NANOG) y usando un medio de cultivo enriquecido con un cocktail de cinco químicos/inhibidores que facilitan reprogramación (Castro-Pérez et al., 2019). Sin embargo, interesantemente, cuando se agrega el inhibidor de BRAF (BRAFi) al medio de reprogramación (con la expresión de los factores de reprogramación, sin usar el cocktail de cinco químicos/inhibidores) las células de melanoma MRA6 son reprogramadas y muestran la formación de múltiples colonias de células madre iPSC (Castro-Pérez et al., 2019). Adicionalmente, se reportó que células de melanoma MRA6 originalmente sensibles a inhibidores de BRAF se vuelven resistentes a estos inhibidores, después de ser reprogramadas a célula madre iPSC y diferenciadas en medio de melanocitos (Castro-Pérez et al., 2019; Bernhardt et al., 2017). Por el contrario, células de melanoma (MRA5) resistentes al inhibidor, no son reprogramables a iPSC incluso en la presencia del inhibidor de BRAF, a pesar de que ambas líneas celulares tienen la mutación oncogénica BRAFV600E.

Estos datos son muy interesantes, porque demuestran que el inhibidor de BRAF que es utilizado para matar a las células de melanoma, también facilita su conversión a célula madre en células sensibles al inhibidor. Adicionalmente, esto sugiere que el inhibidor de BRAF podría inducir/modular la expresión de genes/vías de células madre/CSC/MSC que facilitarían la reprogramación iPSC. Estos genes cuya expresión sería modulada por el inhibidor de BRAF podrían, además, estar implicados en mecanismos de plasticidad y transdiferenciación que conlleven a la resistencia adquirida a este inhibidor. Esta posibilidad es algo que sugieren los datos, ya que las células de melanoma originalmente sensibles al inhibidor, muestran resistencia adquirida al mismo después de ser reprogramadas. Sin embargo, se desconoce la identidad de los genes y mecanismos cuya expresión es modulada por BRAFi. Identificar e inactivar esos genes podría ser el camino hacia el desarrollo de nuevos tratamientos contra el melanoma.

Por otro lado, dado que las células MRA5 (resistentes al inhibidor) no son reprogramables incluso en la presencia de BRAFi, esto sugiere que ambas líneas celulares exhibirían patrones de expresión génica diferentes, por ejemplo, diferencias en genes asociados a célula madre/CSC/MSC. El principal objetivo de esta investigación es identificar genes asociados a vías de célula madre/CSC/MSC en células de melanoma sensibles a BRAFi y determinar su papel en supervivencia/proliferación como posibles nuevos blancos contra melanoma.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares, cultivo y preparación para secuenciación del transcriptoma

Las líneas celulares fueron adquiridas gracias a la generosa donación del Dr. Vijay Setaluri de la Universidad de Wisconsin, con quien el Dr. Edgardo Castro Pérez (asesor principal) realizó estudios postdoctorales y mantiene colaboraciones en INDICASAT. Utilizamos dos líneas celulares de melanoma metastásico MRA5 (resistente a BRAFi) y MRA6 (sensible a BRAFi). Las células fueron mantenidas en platos de cultivo con medio DMEM, 10% FBS y 1% penicilina/estreptomicina a 37°C en una incubadora con atmósfera humidificada y 5% de CO₂. Para secuenciar el transcriptoma y obtener el perfil de expresión genética basal de cada línea celular las células fueron cosechadas con tripsina, centrifugadas y los botones (pellet) de células obtenidos fueron almacenados a -80°C hasta que fueron enviados para secuenciación del transcriptoma (RNA-total) en los Estados Unidos.

Secuenciación de RNA-total y análisis bioinformáticos preliminares

Los pellets de células fueron preparados en duplicados de diferentes platos de cultivo y enviados para secuenciación a los Estados Unidos. Los datos de expresión diferencial de los transcriptomas fueron analizados preliminarmente por la misma empresa que realizó la secuenciación del RNA. A continuación, se describe el procedimiento básico de manera general. Brevemente, se determinó el control de calidad utilizando FastQC (Andrews, 2010) y se mapearon las secuencias (sequence reads) contra las secuencias de referencia del genoma humano (Hg19 Refseq reference) usando Bowtie 0.12.8 (Langmead *et. al.*, 2009). Se estimó el número de transcriptos por millón de bases esperados (TPM)

usando RSEM 1.2.3 (Li *et. al.*, 2010). El Análisis de expresión diferencial fue realizado usando el programa R (RDevelopment, Core-Team, 2007). Los genes diferencialmente expresados entre las líneas celulares MRA5 y MRA6 fueron identificados usando EBSeq con una probabilidad de al menos 95% y al menos cambio doble (2-fold change) en expresión (Leng *et. al.*, 2013). Dado que un gran número de genes podrían ser detectados (varios cientos o miles), se estableció un criterio de corte definido (cut-off) para la selección de genes candidatos. Se seleccionaron genes con probabilidad de expresión diferencial de al menos 99% (es decir, 1% False Discovery Rate-FDR) y al menos con el doble de cambio en expresión genética (2-fold change). Sólo se escogieron genes que también estuvieran anotados en varios elementos relevantes y categorías de ontología genética (GOs), y que solo se expresaran en las células sensibles a BRAFi.

Análisis para selección de genes candidatos

Recibimos los resultados preliminares de la empresa que secuenció los transcriptomas incluyendo algunos análisis bioinformáticos básicos con mapas de calor (heat maps) y una lista preliminar de cientos de genes diferencialmente expresados. A partir de estos datos seleccionamos los genes con mayor significancia estadística y mayor expresión (coeficiente de variación) en ambas líneas celulares: MRA5, resistente a BRAFi y MRA6, sensitiva a BRAFi. Generamos una lista con los 100 genes de mayor expresión en cada línea celular y los comparamos para identificar los genes exclusivamente expresados en cada línea celular utilizando la herramienta análisis de Diagramas de Venn (“Venn Diagram Analysis”). Los análisis de Diagramas de Venn permitieron generar tres listas de genes más refinadas. La primera lista corresponde a genes expresados en ambas

líneas celulares, la segunda contiene genes expresados sólo en MRA5 (resistente a BRAFi) y la tercera contiene genes exclusivamente expresados en la línea MRA6 (sensitiva a BRAFi). Nos enfocamos en la lista de genes expresados en mayor proporción en MRA6, ya que nuestro objetivo era identificar genes que participan en la resistencia adquirida al inhibidor y participarían en plasticidad/trans-diferenciación y activación de CSC/MSC, mientras que los genes de las células resistentes serán analizados en otros estudios.

Esta lista de genes expresados sólo por la línea celular MRA6 (sensitiva al inhibidor) fueron luego clasificados de acuerdo a su ontología genética usando “Panther’s 18.0 gene ontology (G.O.) analysis” basado en Procesos Biológicos (“Biological Process”), lo cual incluye 11 sub-categorías. Nuestro objetivo es identificar genes asociados a células madre, CSC/MSC, por lo que nos enfocamos en la sub-categoría de genes involucrados en procesos de desarrollo (developmental process, GO: 0032502). Seleccionamos los seis (6) genes de mayor expresión de esta lista aún más refinada e investigamos en la base de datos GEPIA2 (Gene Expression ProfilinIng Interactive Analysis, Tang, et al., 2019) la significancia de estos seis genes en diferentes tipos de cánceres/tumores y comparamos la expresión de estos seis genes en tejido normal versus tejido tumoral. GEPIA2 permitió identificar y descartar varios genes que no eran tan relevantes en términos de proporción y frecuencia de expresión génica en tumores de melanoma. Seleccionamos los genes de mayor expresión y frecuencia en melanoma y posteriormente, analizamos en GEPIA2 la significancia de seis genes candidatos en pacientes de melanoma mediante análisis de supervivencia Kaplan-Meier. Nos enfocamos en los genes que mostraban alta expresión y que estuvieran significancia ($P < 0.05$) en mortalidad, es decir, genes que a mayor expresión y frecuencia mostraran menor supervivencia en los pacientes. Estos análisis condujeron a

identificar el gen candidato que nos enfocamos en los estudios presentados aquí. Además de estos criterios biológicos (genes involucrados en células madre y procesos de desarrollo determinados en Panther) y criterios bioestadísticos (al menos 99% de probabilidad, doble de cambio en expresión génica, etc.), y criterios clínicos (en bases de datos con análisis de sobrevivencia en GEPIA2), contrastamos la información de los genes candidatos con la literatura (seleccionando los genes menos estudiados).

Transducción lentiviral y silenciamiento molecular con shRNA

Se cultivaron 150.000 células en platos Petri de seis pocillos, se dejaron crecer por 24 horas, o hasta que alcanzaran una confluencia entre 60-80%. Antes de la transducción agregamos polybrene al medio de las células a una concentración final de 8 µg/ml para facilitar la transducción viral del shRNA. Se utilizó la siguiente secuencia de oligonucleótidos de shRNA anti-SOX10: GCAGCCAGTATATACGACACT (Sigma Aldrich, TRCN0000018987) o shRNA-control (Sigma Aldrich, SHP001). El tratamiento con shRNA fue optimizado con una multiplicidad de infección (MOI, del inglés **M**ultiplicity **O**f **I**nfection) de alrededor de 4 MOIs.

Bioensayos de proliferación/sobrevivencia celular MTT

Las células fueron sembradas en platos de 96 pocillos plateando 4,000 células por pocillo (n = 8 por tratamiento). Al día siguiente, las células fueron tratadas con shRNA anti-SOX10 o con shRNA control. Se utilizó un plato para cada tiempo incluyendo día 0, 24h, 48h, 72h y 96h. Cada plato contenía un grupo control (sin tratar) y un grupo shRNA. En cada tiempo de medición del bioensayo agregamos 20µL del tinte/reactivo de MTT 3-

(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) a cada pocillo con las células y se mantuvieron en la incubadora por 60min. Luego, removimos el volumen total del medio, agregamos 100µL de DMSO para lisar las células y verificaremos la absorbancia en lector de microplatos a 540nm. La efectividad del tratamiento de matar células de melanoma se indica por menor absorbancia hay menor crecimiento de células.

Bioensayos de clonogenicidad celular

Para los ensayos de clonogenicidad, se sembraron 1,000 células por pocillo por triplicado en placas de 24 pocillos y las células se incubaron hasta el día siguiente. Luego, las células recibieron tratamiento con shRNA-control o con shRNA anti-SOX10. El medio se cambió cada 4 días durante 2 semanas. Las placas se lavaron tres veces con 1X PBS, se fijaron con para formaldehído al 4%, se tiñeron con cristal violeta al 1 % en etanol al 70 % durante 1 hora. Los platos fueron sumergidos en envase con agua del grifo para lavarlos 3 veces, se dejaron secar y se fotodocumentaron.

Detección de expresión del gen reportero EGFP por microscopía confocal

El vector viral utilizado contenía un gen reportero de EGFP, por lo que se verificó su expresión en diferentes etapas del proyecto. Para esto, las células fueron cultivadas en platos de 24 pocillos y al día siguiente o cuando alcanzaran una confluencia del 60-80% las células fueron transducidas con lentivirus que expresaban shRNA anti-SOX10-EGFP. Las células fueron luego visualizadas bajo microscopía confocal a las 24 horas, a los 7 días y a las 2 semanas para verificar la expresión del reportero EGFP que es co-expresado por el vector lentiviral del shRNA anti-SOX10.

Tratamientos con BRAFi y con shRNA para extracción de proteínas.

Las células MRA6 fueron sembradas en varios platos de 6 pocillos con DMEM + FBS 10% y pen/strep 1% y mantenidas en una incubadora húmeda a 37°C y 5% CO₂. Al día siguiente o hasta alcanzar una confluencia del 70-80%, se agregó el inhibidor de BRAF (PLX4032/vemurafenib) a una concentración final de 1 µM. Las células fueron luego cosechadas utilizando tripsina a diferentes tiempos incluyendo control (0h), 6h, 12h, 15h, 18h, 21, 24h, 48h, 72h ó 7 días. Las células fueron centrifugadas y los botones de células (pellets) fueron guardados a -80 hasta que se realizaran las extracciones de proteínas para análisis por Western blot.

Para los tratamientos con shRNA las células fueron cultivadas en platos de seis pocillos y al día siguiente o cuando alcanzaran una confluencia del 70-80% las células fueron transducidas con lentivirus que expresaban shRNA anti-SOX10 o con shRNA-control. Las células fueron cosechadas usando tripsina a las 24 horas después del tratamiento con shRNA. Los botones de células fueron guardados a -80 hasta que se realizaran las extracciones de proteínas para análisis por Western blot.

Las proteínas totales fueron extraídas usando el buffer RIPA conteniendo inhibidores de proteasas (Thermo Fisher, #78410). Las células fueron sonicadas y luego centrifugadas a 4°C por 30min. El sobrenadante fue recolectado y la concentración de proteínas fue estimada usando el Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher, #23227) con el método de extrapolación con curva estándar.

Análisis de expresión de proteínas mediante Western blot

Se hicieron los cálculos de volúmenes para cada muestra/buffer de corrida correspondientes a 20 μ g de proteínas y se realizó electroforesis de proteínas (SDS-PAGE). Las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF. Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche sin grasa en buffer PBST. Las membranas fueron incubadas hasta el día siguiente con anticuerpos primarios anti-SOX10 o anticuerpos contra el gen control GAPDH. Al día siguiente las membranas fueron lavadas con PBST tres veces y luego incubadas con anticuerpo secundario conjugado con HRP por 1 h. Las bandas de proteínas fueron detectadas usando el kit ECL Start Western Blotting Detection Reagent (Thermo Fisher, #32106) y foto documentadas. Las bandas fueron cuantificadas por densitometría utilizando ImageJ y graficadas en Prism's GraphPad. Todos los experimentos fueron realizados en triplicados.

Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos fueron determinados mediante T de Student (experimental vs control). Los datos significativos fueron estimados basados en un intervalo de confianza de 95% ($p < 0.05$). Los datos fueron analizados y graficados utilizando Prism's GraphPad.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Perfiles de expresión genética en MRA5 y MRA6

Los análisis preliminares de expresión genética del transcriptoma de las líneas celulares MRA5 (resistentes a BRAFi) y MRA6 (sensibles a BRAFi) se pueden apreciar en el mapa de calor (heat map) mostrado en la **Figura 2**. Estos análisis generaron un listado preliminar de cientos de genes candidatos que fueron analizados en más detalle para seleccionar los genes candidatos más robustos. Nuestro objetivo era identificar genes que podrían estar involucrados en la transformación a resistencia adquirida al fármaco en las células sensibles (MRA6) al inhibidor. Para esto, identificamos de manera específica qué genes mostraban mayor expresión en MRA6, pero no eran expresados en MRA5. Como la secuenciación del transcriptoma se realizó en duplicados para cada línea celular, primero que todo se seleccionaron los “Top100” genes más expresados en cada línea celular y se verificó que los niveles de expresión de cada duplicado fueran similares. Sólo se tomaron en cuenta los genes cuyos duplicados mostraran niveles similares de expresión, mientras que los genes que mostraran discrepancias en los valores de sus duplicados no fueron considerados. La **Tabla 1** muestra los “Top100” genes más expresados en cada línea celular. Para determinar qué genes eran expresados en MRA5, MRA-6 o ambas, estas listas de genes se analizaron utilizando la herramienta “Diagramas de Venn” (**Figura 3**). Los análisis con Diagramas de Venn generaron tres listas de genes: una lista de genes expresados en ambas líneas celulares, una segunda lista con genes expresados sólo en MRA5 y la tercera lista con genes sólo expresados en MRA6. En total, se identificaron 66 genes expresados en ambas líneas celulares, 34 genes sólo expresados en MRA5 y 34 genes expresados sólo en MRA6 (**Tabla 2**).

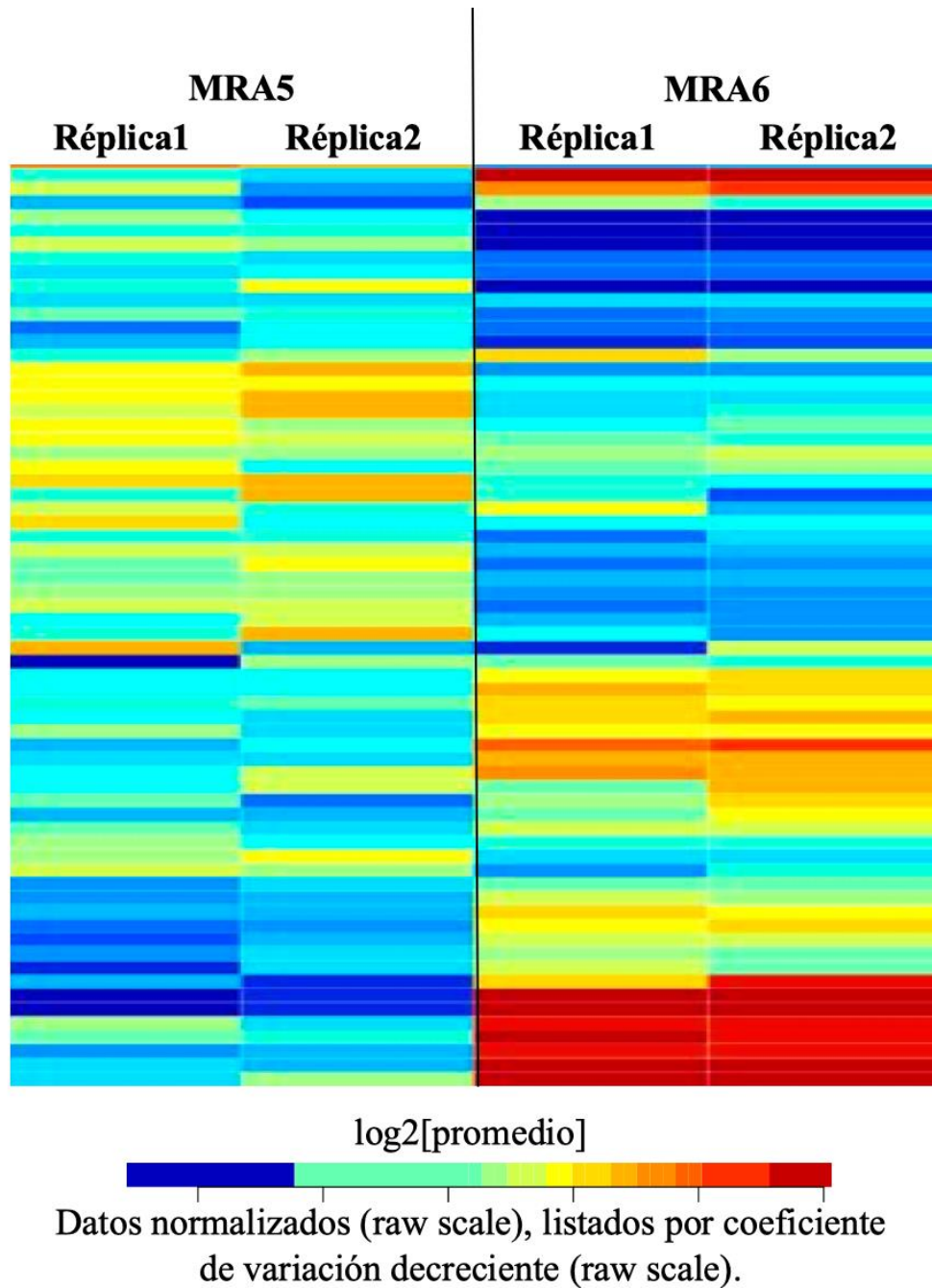


Figura 2. Mapa de calor que resume los análisis preliminares de expresión diferencial en líneas celulares MRA5 y MRA6.

Tabla 1. Lista preliminar de “Top100” genes expresados en células MRA5 y MRA6.

| MRA5 | | | | | | | | MRA6 | | | | | | | |
|------|--------------|----------|----------|-----|--------------|----------|----------|------|--------------|----------|----------|-----|--------------|----------|----------|
| # | Top100 Genes | Réplica1 | Réplica2 | # | Top100 Genes | Réplica1 | Réplica2 | # | Top100 Genes | Réplica1 | Réplica2 | # | Top100 Genes | Réplica1 | Réplica2 |
| 1 | THBS1 | 309748 | 272415 | 51 | LIF | 3457 | 2909 | 1 | TIMP3 | 94244 | 111304 | 51 | SMAD2 | 3499 | 2841 |
| 2 | FN1 | 239521 | 181880 | 52 | IL6 | 3415 | 2038 | 2 | THBS1 | 81980 | 100397 | 52 | EZH2 | 3480 | 2503 |
| 3 | CD44 | 43054 | 37129 | 53 | HMGB2 | 3392 | 3437 | 3 | FN1 | 69770 | 81668 | 53 | SOX5 | 3414 | 3971 |
| 4 | PSMD2 | 30885 | 35299 | 54 | EGFR | 3366 | 3564 | 4 | IGFBP3 | 46542 | 46010 | 54 | PDGFA | 3381 | 3579 |
| 5 | NRP1 | 25087 | 20939 | 55 | JAG1 | 3352 | 2359 | 5 | TGFA | 37652 | 35354 | 55 | ANGPT1 | 3367 | 2834 |
| 6 | IRAK1 | 14029 | 14682 | 56 | IRS1 | 3230 | 3192 | 6 | NES | 24695 | 27197 | 56 | PBK | 3334 | 2153 |
| 7 | NOTCH2 | 13400 | 13621 | 57 | FGF2 | 3210 | 2875 | 7 | CD44 | 19256 | 20422 | 57 | IGF1R | 3254 | 3891 |
| 8 | CAV1 | 11903 | 9348 | 58 | F2R | 3149 | 2237 | 8 | LIF | 18860 | 19580 | 58 | PEA15 | 3180 | 3549 |
| 9 | CDK1 | 11442 | 12466 | 59 | DUSP6 | 3143 | 2820 | 9 | PDGFRA | 17792 | 20117 | 59 | SMC3 | 3160 | 2779 |
| 10 | MAP4K4 | 10143 | 9745 | 60 | CYR61 | 3108 | 4426 | 10 | CAV1 | 15519 | 13301 | 60 | EPHA2 | 3066 | 3811 |
| 11 | WNT5A | 9678 | 6797 | 61 | GPNMB | 3070 | 2155 | 11 | SFRP1 | 15039 | 14009 | 61 | TBX3 | 2919 | 3395 |
| 12 | ITGAV | 8598 | 6849 | 62 | GAS6 | 2989 | 2645 | 12 | CDH2 | 13497 | 15497 | 62 | PSMD3 | 2863 | 3006 |
| 13 | CDH2 | 8229 | 8028 | 63 | FOXO3 | 2987 | 2829 | 13 | DUSP6 | 13056 | 14061 | 63 | ID4 | 2801 | 2373 |
| 14 | SFRP1 | 7631 | 6837 | 64 | AKAP9 | 2974 | 2843 | 14 | SPRY4 | 12592 | 13404 | 64 | GBA | 2758 | 3244 |
| 15 | MAP2K4 | 7593 | 7613 | 65 | DAG1 | 2742 | 2333 | 15 | MAP4K4 | 11396 | 12410 | 65 | SDCBP | 2710 | 2664 |
| 16 | PTPN1 | 7502 | 7220 | 66 | PBK | 2716 | 2858 | 16 | ASPM | 10784 | 6710 | 66 | ID1 | 2707 | 2431 |
| 17 | EZR | 7472 | 7697 | 67 | IQGAP3 | 2661 | 2903 | 17 | SPRED1 | 9284 | 7511 | 67 | PTPN1 | 2682 | 2792 |
| 18 | PSMD3 | 7045 | 7109 | 68 | TGFB2 | 2635 | 1951 | 18 | SHC1 | 9176 | 10432 | 68 | GDNF | 2634 | 3879 |
| 19 | ASPM | 6974 | 7789 | 69 | TNIP1 | 2622 | 2468 | 19 | ERBB3 | 9160 | 8655 | 69 | RBPJ | 2624 | 2105 |
| 20 | JAK1 | 6737 | 6412 | 70 | MAP3K4 | 2603 | 2682 | 20 | AKAP9 | 9016 | 10035 | 70 | ERBB2 | 2530 | 2895 |
| 21 | IL1B | 6670 | 4920 | 71 | ID1 | 2477 | 1767 | 21 | PSMD2 | 8676 | 9597 | 71 | PTPRJ | 2497 | 2603 |
| 22 | FOXP1 | 6520 | 6334 | 72 | CUL1 | 2471 | 2618 | 22 | HIPK2 | 8352 | 9825 | 72 | JAG1 | 2469 | 3823 |
| 23 | HMGA2 | 6051 | 6263 | 73 | FGFR1 | 2414 | 2291 | 23 | F2R | 8227 | 9126 | 73 | FGF2 | 2467 | 1752 |
| 24 | PSMB1 | 6005 | 5841 | 74 | SPRED1 | 2410 | 2665 | 24 | DNAJA1 | 8095 | 7734 | 74 | JAK1 | 2457 | 2507 |
| 25 | TIMP3 | 5846 | 4560 | 75 | IL11 | 2358 | 1666 | 25 | POLR2B | 7228 | 7192 | 75 | PSMB1 | 2441 | 2564 |
| 26 | DUSP3 | 5811 | 5322 | 76 | HIPK2 | 2274 | 3162 | 26 | PRRX1 | 6948 | 6269 | 76 | FGFR1 | 2394 | 2439 |
| 27 | PEA15 | 5784 | 6273 | 77 | CD24 | 2245 | 2317 | 27 | MAGED1 | 6862 | 6973 | 77 | IRS2 | 2386 | 3231 |
| 28 | PSMB3 | 5607 | 5359 | 78 | MAP3K1 | 2240 | 2400 | 28 | CUL1 | 6366 | 6935 | 78 | PSMD11 | 2378 | 2949 |
| 29 | DUSP10 | 5537 | 4947 | 79 | PSME1 | 2193 | 2131 | 29 | DAG1 | 6284 | 6919 | 79 | PSMB3 | 2355 | 2568 |
| 30 | RACGAP1 | 5401 | 5493 | 80 | AJUBA | 2147 | 2587 | 30 | LEF1 | 6193 | 6561 | 80 | FANCD2 | 2262 | 1861 |
| 31 | EPHA2 | 5355 | 5305 | 81 | FANCD2 | 2107 | 2183 | 31 | TNFRSF19 | 5566 | 5446 | 81 | FOXM1 | 2219 | 1863 |
| 32 | POLR2B | 5336 | 5215 | 82 | MAGED1 | 2090 | 1552 | 32 | NOTCH2 | 5520 | 5263 | 82 | SORL1 | 2192 | 2265 |
| 33 | SHC1 | 5330 | 5139 | 83 | GBA | 2070 | 1792 | 33 | TRIB2 | 5460 | 5778 | 83 | S1PR2 | 2176 | 2365 |
| 34 | SMAD2 | 5212 | 5036 | 84 | SNAI2 | 1969 | 1936 | 34 | SPRY2 | 5436 | 5657 | 84 | MID1 | 2095 | 2186 |
| 35 | PSMD11 | 5000 | 5271 | 85 | CAMK2G | 1958 | 1810 | 35 | CSPG4 | 5288 | 5817 | 85 | POLR2F | 2049 | 2378 |
| 36 | DNAJA1 | 4995 | 4957 | 86 | LTBR | 1934 | 1626 | 36 | SOX10 | 5269 | 6249 | 86 | DLG1 | 2046 | 2046 |
| 37 | EPAS1 | 4734 | 3776 | 87 | ADORA2B | 1868 | 2050 | 37 | TIAM1 | 5194 | 5256 | 87 | GPNMB | 1972 | 2571 |
| 38 | VEGFA | 4694 | 4137 | 88 | HBEGF | 1800 | 2039 | 38 | ITGAV | 5016 | 5430 | 88 | HGF | 1932 | 3385 |
| 39 | SMC3 | 4658 | 4550 | 89 | PDCD2 | 1695 | 1842 | 39 | NRP1 | 5003 | 5185 | 89 | FZD4 | 1905 | 1950 |
| 40 | UBE2V1 | 4631 | 4446 | 90 | GADD45B | 1687 | 2309 | 40 | CAMK2D | 4356 | 4015 | 90 | SPRED2 | 1880 | 2103 |
| 41 | RBPJ | 4587 | 4473 | 91 | CAV2 | 1681 | 1550 | 41 | IQGAP3 | 4332 | 3119 | 91 | FYN | 1853 | 2063 |
| 42 | FAM83D | 4505 | 4606 | 92 | GADD45A | 1633 | 2286 | 42 | TLR4 | 4226 | 3851 | 92 | DUSP3 | 1827 | 2039 |
| 43 | CTGF | 4479 | 4978 | 93 | POLR2D | 1629 | 1673 | 43 | SOX11 | 4071 | 4565 | 93 | HMGA2 | 1774 | 2078 |
| 44 | TBX3 | 4378 | 4205 | 94 | IGF1R | 1609 | 1505 | 44 | MAP3K1 | 3910 | 4141 | 94 | FZD7 | 1711 | 1532 |
| 45 | DLG1 | 4366 | 4500 | 95 | PAK1 | 1599 | 1620 | 45 | FLT1 | 3879 | 4556 | 95 | EZR | 1563 | 1344 |
| 46 | JUN | 4210 | 4752 | 96 | TRIM8 | 1557 | 1688 | 46 | RACGAP1 | 3766 | 2627 | 96 | UBE2V1 | 1539 | 1681 |
| 47 | TGFBR1 | 4097 | 2896 | 97 | CAMK2D | 1548 | 1664 | 47 | CDK1 | 3649 | 2347 | 97 | CAV2 | 1432 | 1327 |
| 48 | FOXO1 | 3794 | 3984 | 98 | EZH2 | 1440 | 1405 | 48 | HMGB2 | 3634 | 2310 | 98 | CDON | 1382 | 1509 |
| 49 | SDCBP | 3613 | 3174 | 99 | SPRY2 | 1363 | 1483 | 49 | IRAK1 | 3621 | 3738 | 99 | MAP3K4 | 1369 | 1479 |
| 50 | PINK1 | 3601 | 3294 | 100 | MID1 | 1338 | 1544 | 50 | WNT5A | 3567 | 3422 | 100 | NCAM1 | 1281 | 1500 |

Para los siguientes análisis nos enfocamos en la lista de los 34 genes expresados sólo en MRA6. Dado que nuestro objetivo era identificar genes cuya función esté asociada a células madre y genes de CSC/MSC, se les realizó un análisis de ontología genética (G.O.) a estos 34 genes para identificar la función de los mismos utilizando la herramienta de Panther. La clasificación de ontologías analizadas en Panther se basó en “Procesos Biológicos” (Biological Process), ya que es la categoría donde se muestran hasta 11 sub-categorías funcionales de genes entre los cuales se muestran grupos de genes involucrados en “procesos de desarrollo” y asociados a células madre. La sub-categoría de genes clasificados como “procesos de desarrollo” (developmental process, G.O.: 0032502, color amarillo) representó un 12% de los genes identificados (**Figura 4**).

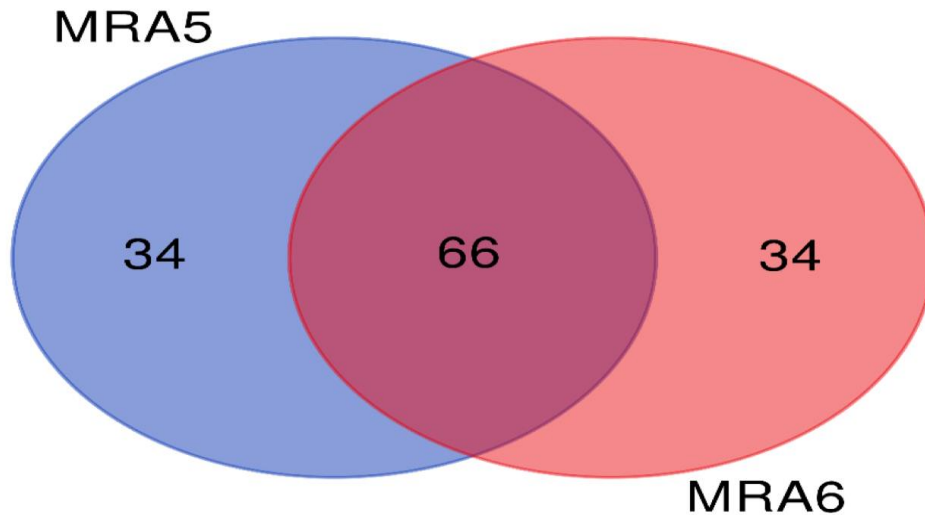


Figura 3. Diagramas de Venn analizados donde se muestran el número de genes expresados por ambas células (66 genes) y el número de genes expresados sólo en MRA5 y sólo en MRA6 (34 genes en cada célula).

Tabla 2. Lista de genes diferencialmente expresados en líneas celulares MRA5 y MRA6 determinado mediante análisis de Diagramas de Venn.

| Lineas celulares | Total | Genes |
|------------------|-------|---|
| MRA5/MRA6 | 66 | CD44 PSMB1 CDK1 DLG1 POLR2B IQGAP3 GBA MAP4K4 IRAK1 FGF2 RACGAP1 ID1 PSMD3 AKAP9 PSMD11 PTPN1 SMAD2 IGF1R CAMK2D FGFR1 MAGED1 F2R ASPM CAV1 THBS1 DAG1 NRP1 LIF DUSP3 JAK1 TBX3 ITGAV CDH2 EZR SHC1 GPNMB DUSP6 MAP3K1 PBK HIPK2 TIMP3 SFRP1 JAG1 SDCBP EPHA2 SMC3 DNAJA1 WNT5A SPRY2 MID1 HMGB2 SPRED1 PEA15 MAP3K4 CAV2 HMGA2 FN1 RBPJ FOXM1 NOTCH2 FANCD2 UBE2V1 EZH2 PSMD2 CUL1 PSMB3 |
| MRA5 | 34 | HBEGF PINK1 EPAS1 TGFB2 PAK1 FAM83D FOXO3 MAP2K4 VEGFA IRS1 GAS6 JUN CD24 SNAI2 AJUBA CYR61 FOXP1 DUSP10 GADD45A IL6 CAMK2G LTBR CTGF TRIM8 EGFR PSME1 TNIP1 POLR2D PDCD2 TGFBR1 IL1B GADD45B ADORA2B IL11 |
| MRA6 | 34 | TLR4 IGFBP3 TNFRSF19 PDGFA IRS2 LEF1 CSPG4 SPRED2 FZD7 FLT1 FZD4 FYN SORL1 SOX10 NCAM1 GDNF S1PR2 PDGFRA PTPRJ TRIB2 HGF SPRY4 ID4 SOX5 NES TGFA CDON ANGPT1 SOX11 TIAM1 POLR2F PRRX1 ERBB3 ERBB2 |

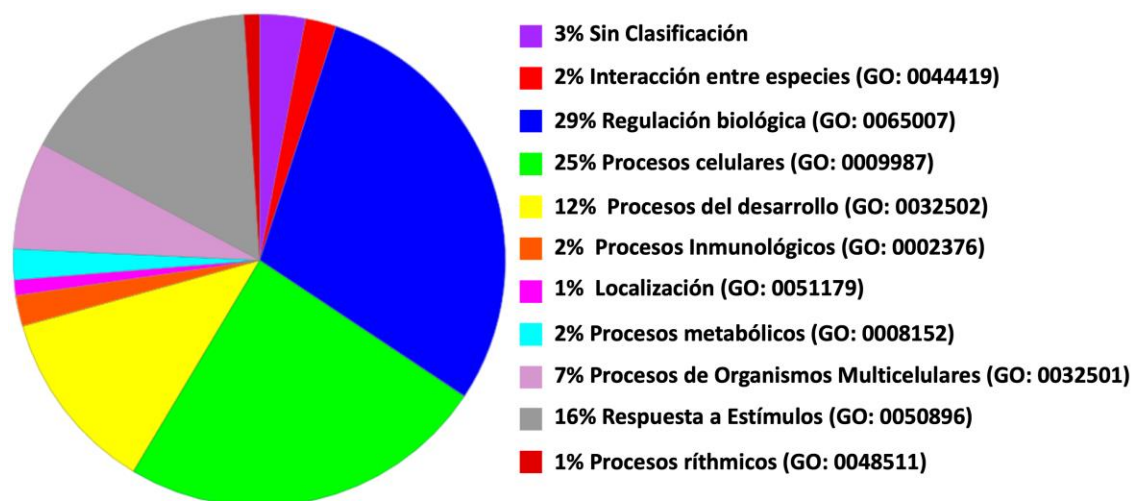


Figura 4. Clasificación funcional de los 34 genes expresados sólo por MRA6, determinado mediante la herramienta Panther. Los genes involucrados en procesos de desarrollo (G.O.: 0032502) en color amarillo representan aproximadamente el 12%.

Selección de genes candidatos

Seleccionamos los 6 genes de mayor expresión en las MRA6 y que fueron clasificados en Panther en la sub-categoría “procesos de desarrollo” como el grupo más refinado de genes candidatos asociados a células madre y CSC/MSC. Esto incluyó los genes CSPG4, SPRED2, SPRY4, POLR2F, ERBB3 y SOX10 (**Tabla 2**). Para determinar la relevancia de estos seis genes en diferentes tipos cánceres (incluyendo melanoma) se analizaron sus patrones de expresión en tejido normal y en tejido tumoral de pacientes reportados en la base de datos GEPIA2. La **Figura 5** muestra gráficos de barra con los patrones de expresión de los seis genes analizados en diferentes tipos de tumores. En negro aparecen los niveles de expresión en tejido normal y en rojo los niveles de expresión en tejido tumoral. Las gráficas de las **Figuras 5A, 5B, 5C, 3D, y 5E** muestran que estos genes (CSPG4, SPRED2, SPRY4, POLR2F y ERBB3, respectivamente) exhiben patrones de expresión relativamente altos en casi todos los tipos de tumores, pero también muestran expresión relativamente alta en algunos tejidos normales, incluyendo en melanoma (SKMC). Sin embargo, la **Figura 5F**, muestra el gen SOX10 con un patrón de expresión muy alto en melanoma, pero con expresión muy baja tanto en tejido normal, como en otros tipos de cánceres con sus correspondientes tejidos normales. Un análisis más detallado en GEPIA2, enfocado sólo en melanoma (SKMC) permitió confirmar estas observaciones, donde se muestra que SOX10 es uno de los genes de mayor expresión y con mayor diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el tejido tumoral versus tejido normal (**Figura 6**). Adicionalmente, hicimos una revisión bibliográfica sobre estudios realizados con los genes CSPG4, SPRED2, SPRY4, POLR2F, ERBB3 y SOX10 y las evidencias mostraron que el papel de SOX10 y la vía que controla este gen no es bien conocida ni en melanoma ni en

otros cánceres. Por lo tanto, concluimos que el gen SOX10 podría ser un excelente gen candidato en el cual enfocamos nuestros estudios que desarrollamos desde este punto en adelante.

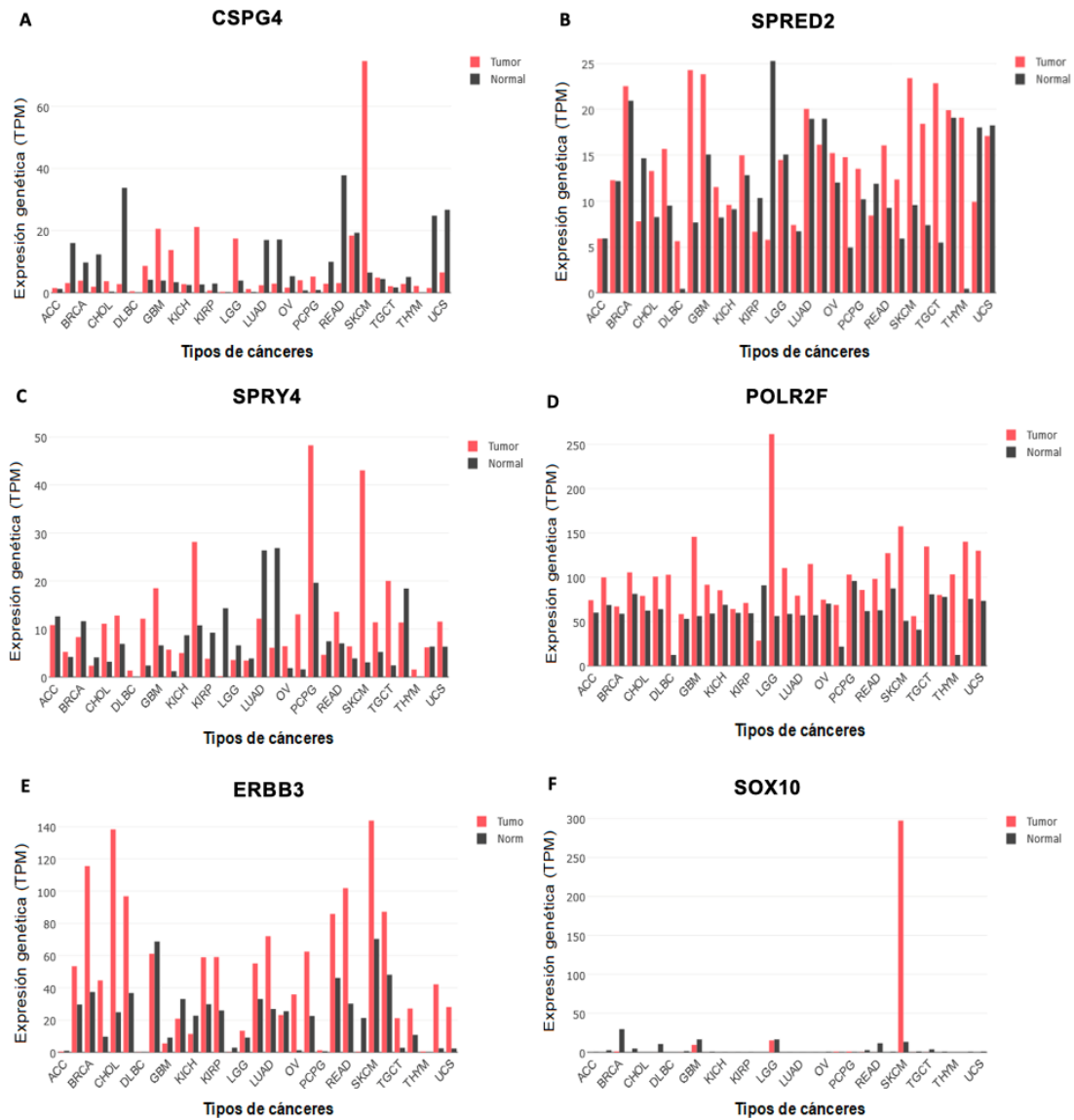


Figura 5. Patrones de expresión genética de los seis genes más expresados en las células MRA6 y clasificados en “Procesos de desarrollo” (G.O.: 0032502) en diferentes tipos de cánceres analizados en GEPIA2 donde se compara tejido normal y tumor. TPM=Transcriptos por millón por kilo base.

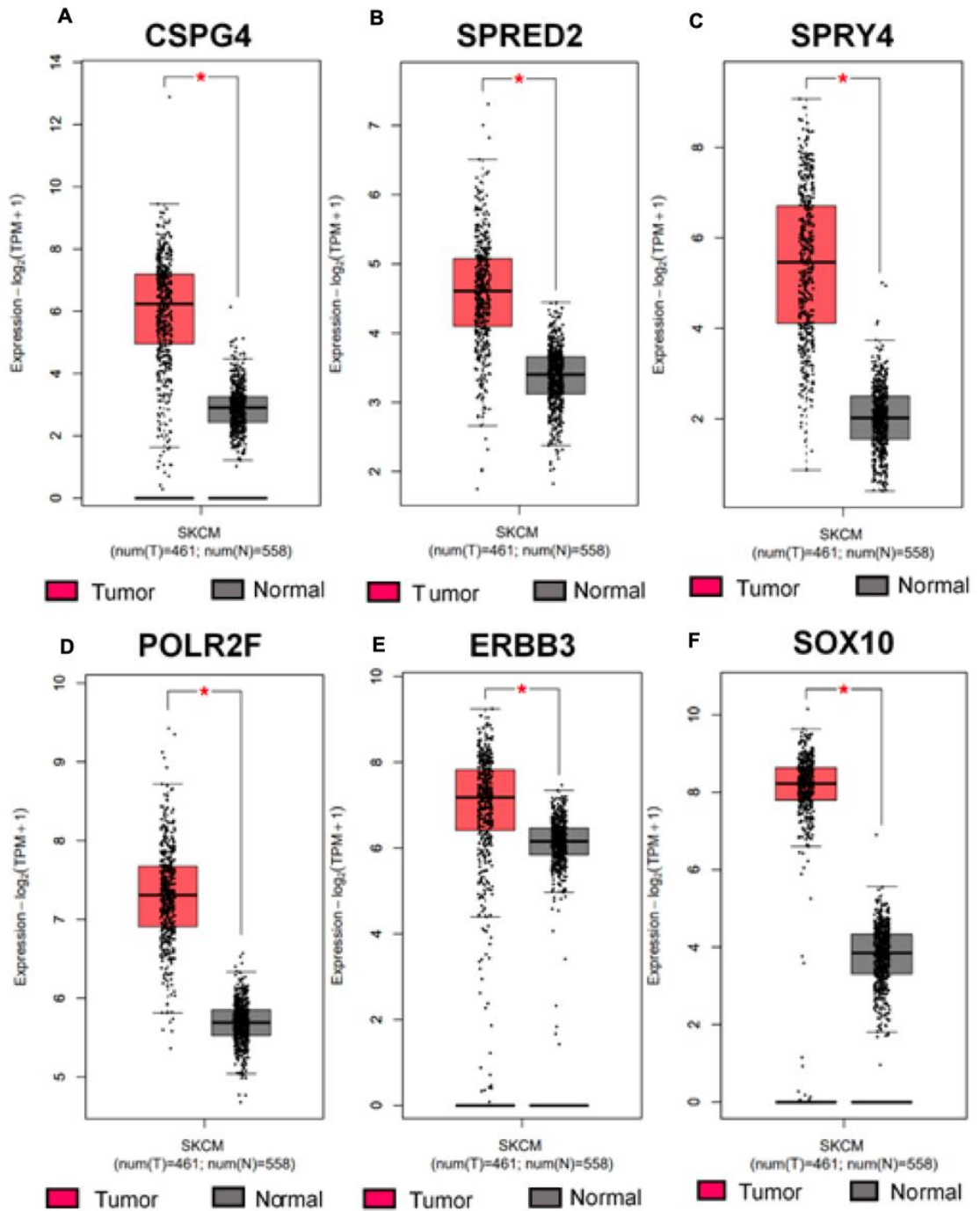


Figura 6. Patrones de expresión genética de los seis genes más expresados en las células MRA6 y clasificados en “Procesos de desarrollo” (G.O.: 0032502) en melanoma (SKCM) analizados en la base de datos GEPIA2. TPM=Transcriptoss por millón por kilo base.

Los pacientes de melanoma que expresan SOX10 muestran baja supervivencia.

Los análisis realizados demostraron que los seis genes seleccionados son buenos candidatos como nuevos blancos en melanoma basados en los patrones de expresión génica, de los cuales, SOX10 sería el gen con mayor respaldo. Sin embargo, para confirmar esto, realizamos análisis de supervivencia Kaplan-Meier en GEPIA2 de los seis genes candidatos. La **Figura 7** muestra los resultados donde se indica que, de los seis genes seleccionados, SOX10 fue el único que mostró una supervivencia significativamente baja ($p < 0.05$) en los grupos de pacientes con una expresión genética de SOX10 alta (líneas rojas) versus grupos de pacientes con expresión baja (líneas azules) (**Figura 7F**). En contraste, los otros cinco genes mostraron no ser estadísticamente significativos para determinar la supervivencia de los pacientes de melanoma ($P > 0.05$). Estos análisis confirmaron que SOX10 sería un interesante gen candidato, por lo que decidimos enfocarnos en este gen en el resto de la investigación.

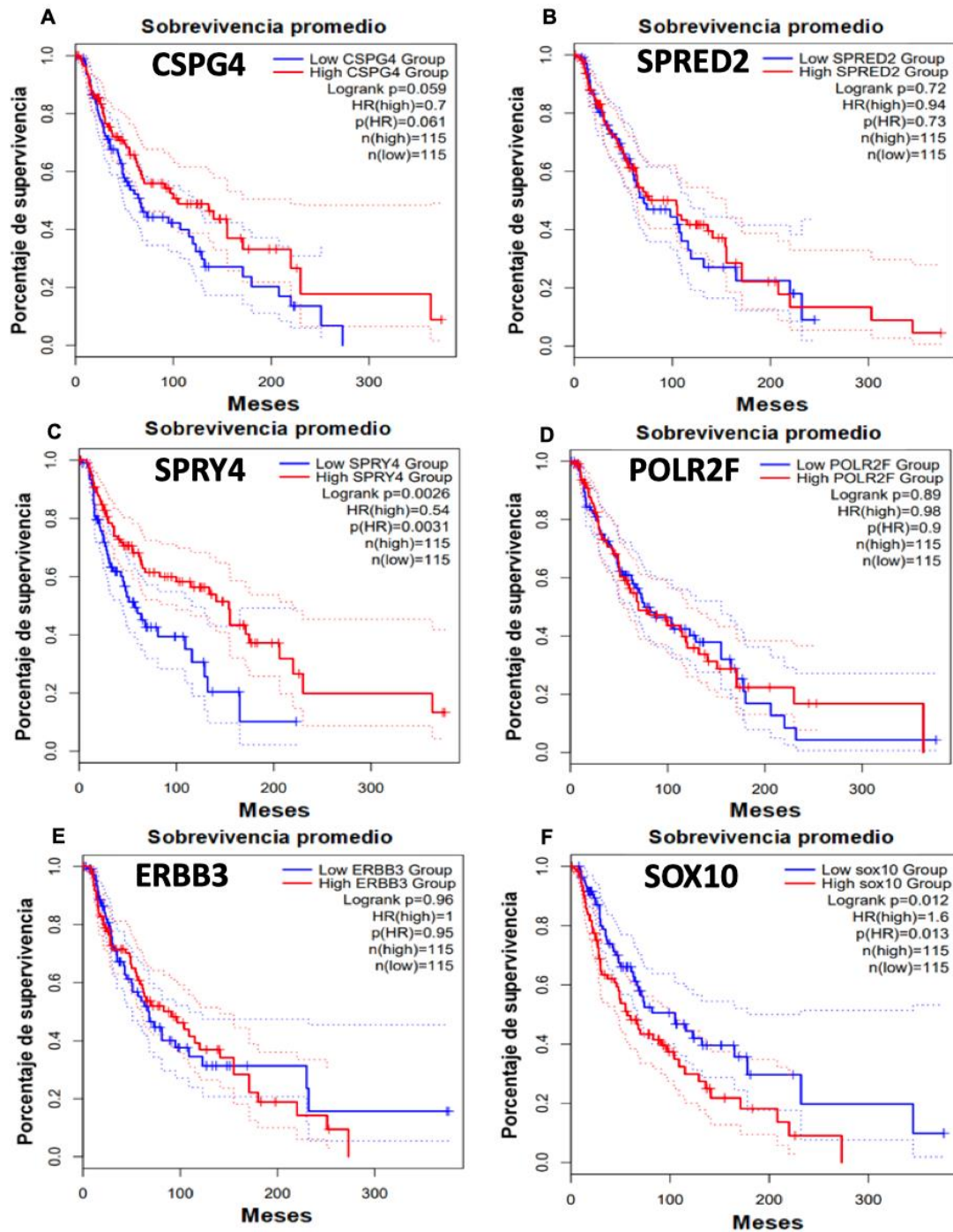


Figura 7. Sobrevivencia promedio de los pacientes de melanoma según el nivel de expresión de los seis candidatos seleccionados, analizados en GEPIA2.

El inhibidor de BRAF induce la expresión de SOX10 en melanoma.

Estudios previos demostraron que el inhibidor de BRAF facilita la reprogramación a célula madre iPSC en melanoma y que las células exhiben resistencia adquirida al inhibidor después de ser reprogramadas (Castro-Pérez et al., 2019). Estos datos sugerían que el inhibidor de BRAF podría inducir la expresión de genes de célula madre/CSC/MSC que podrían facilitar la reprogramación a célula madre iPSC y posiblemente contribuir en mecanismos de resistencia adquirida al inhibidor, sin embargo, la identidad de estos genes era desconocida. El objetivo de la investigación presentada aquí era identificar algunos de estos genes asociados a célula madre/CSC/MSC mediante análisis de transcriptoma. Los análisis realizados condujeron a la identificación de SOX10 (un marcador de células madre) como un gen candidato fuerte expresado por células de melanoma MRA6 sensibles al inhibidor.

Una vez identificado y seleccionado, la primera pregunta que abordamos fue si la expresión de SOX10 era modulada por el inhibidor de BRAF (BRAFi). Para esto, células de melanoma metastásico MRA6 fueron tratadas con el inhibidor de BRAF y cosechadas a diferentes tiempos para verificar la expresión de SOX10 mediante Western blot. Los análisis de transferencia Western demostraron preliminarmente que la expresión de SOX10 es inducida por el tratamiento con BRAFi, entre 24 - 48h con el pico máximo a las 24 h, y posterior disminución a las 72h y 7 días sin afectar la expresión basal del gen control GAPDH (**Figura 8A**). Para determinar en más detalle los patrones en tiempos de inducción de SOX10 por el inhibidor, repetimos estos experimentos, pero ampliando los tiempos de monitoreo. En particular, las células fueron cosechadas a 1h, 6h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h, 48h, 72h y 7 días. Cada tiempo de cosecha fue realizado usando tres réplicas biológicas.

Los datos de Western blot demostraron que la inducción en expresión de SOX10 inicia a las 12h con un pico máximo entre las 12h y 24h sin afectar la expresión del gen control GAPDH (**Figura 8B**). Estos datos de Western blot fueron cuantificados por análisis densitométrico realizado en el programa ImageJ seguido de un análisis estadístico con GraphPad (Prism). Los datos demostraron que los niveles de proteína SOX10 después del tratamiento farmacológico con BRAFi son significativamente más altos que después del tratamiento con el fármaco, específicamente a las 12 y 24 horas (BRAFi vs Control, $p < 0.05$) (**Figura 8C**).

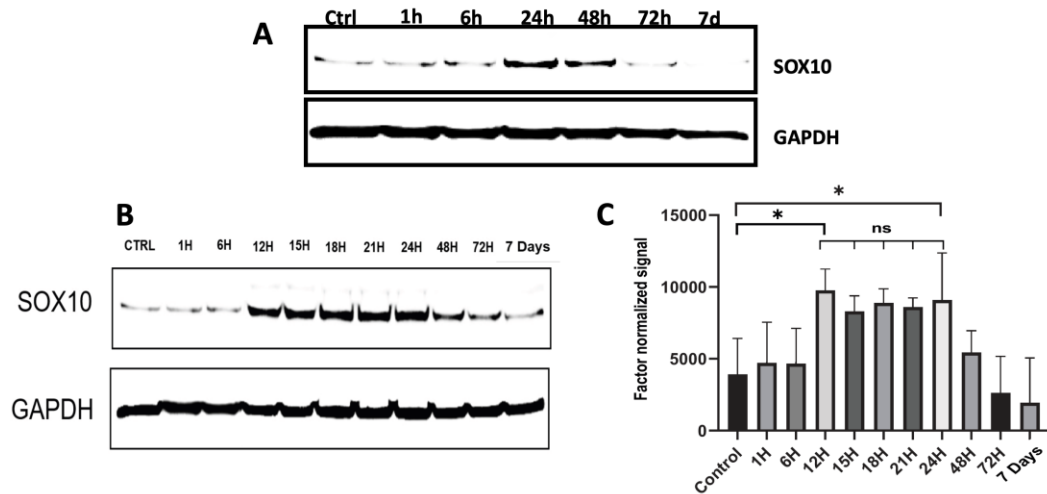


Figura 8. Experimentos de Western blot donde se muestra que la expresión de SOX10 es inducida por el inhibidor de BRAF. A. Inducción preliminar a las 24h y 48h ($n = 1$). B. Inducción más detallada entre 12h y 24h. C. Cuantificación por densitometría ($n = 3$ cada uno, $P < 0.05$). La expresión del control GAPDH no se vio afectada.

El tratamiento con shRNA disminuye significativamente la expresión de SOX10.

La siguiente pregunta que abordamos era si la expresión de SOX10 era requerida para la supervivencia en células de melanoma. Para esto, primero que todo optimizamos una estrategia de silenciamiento molecular de la expresión de SOX10 con shRNA mediado por lentivirus. Las células fueron tratadas con BRAFi y seis horas después las células fueron transducidas con lentivirus que expresaban un shRNA anti-SOX10. Los experimentos se realizaron en triplicados biológicos. A las 24 horas después de ser tratadas con BRAFi las células fueron cosechadas y preparadas para verificar mediante Western blot si el shRNA había disminuido o no expresión de SOX10. Los datos demostraron que las células tratadas con BRAFi + shRNA anti-SOX10, exhibían una expresión significativamente reducida de SOX10 ($P < 0.05$) sin afectar la expresión del gen control GAPDH. Estos datos confirmaron la efectividad del shRNA para silenciar significativamente la expresión del gen SOX10 de manera específica (**Figura 9**). Adicionalmente, en estos experimentos pudimos verificar nuevamente que la expresión de SOX10 es significativamente mayor en las células tratadas con el inhibidor de BRAF versus las células control (tratadas solamente con medio celular) ($p < 0.05$). Estos datos demostraron que el shRNA anti-SOX10 es efectivo silenciando el gen de manera específica y que por lo tanto podría utilizarse en los siguientes experimentos de supervivencia celular en melanoma.

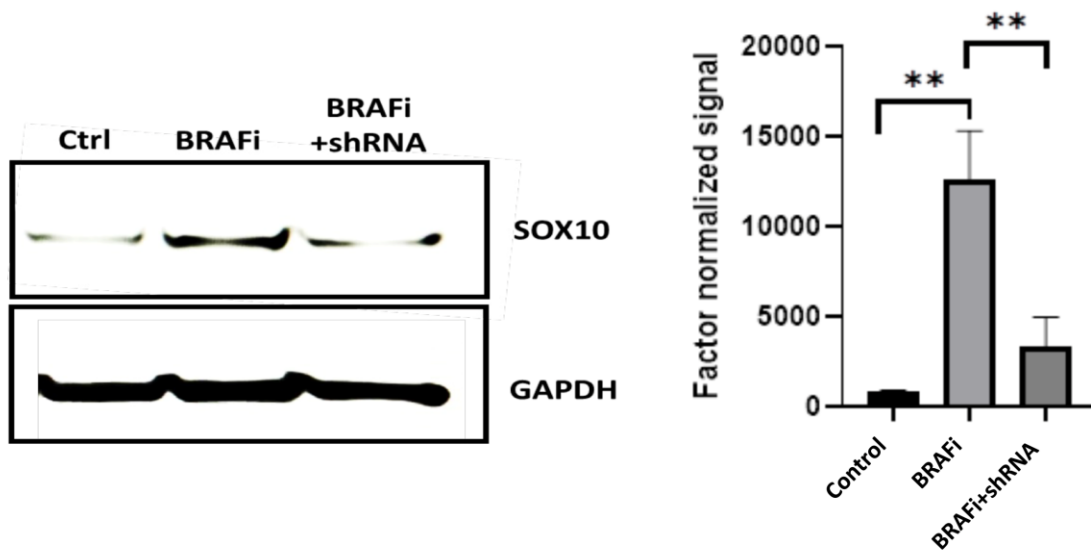


Figura 9. Tratamiento de células MRA6 con shRNA anti-SOX10 silencia molecularmente la expresión de SOX10 significativamente ($P < 0.05$). $N = 3$ cada grupo). La expresión de GAPDH no se vio afectada.

El silenciamiento molecular de SOX10 con shRNA mata las células de melanoma.

La siguiente pregunta que abordamos era si el tratamiento con el shRNA anti-SOX10 tenía un efecto en sobrevivencia celular del melanoma. Datos cualitativos de microscopía muy preliminares sugerían que el shRNA anti-SOX10 mataba a las células de melanoma a las 48h (**Figura 10**). Sin embargo, era necesario utilizar métodos cuantitativos que confirmaran si este efecto era estadísticamente significativo. Para esto, realizamos bioensayos de proliferación celular-MTT. Las células fueron sembradas en platos de 96 pocillos y se dividieron en tres grupos: 1) shRNA anti-SOX10, 2) shRNA-control, y 3) grupo sin tratar. Veinticuatro horas después de ser plateadas, las células fueron transducidas con el shRNA anti-SOX10, o con el shRNA-control o se mantuvieron sin tratar. Se utilizó un plato de 96 pocillos para cada tiempo de medición del bioensayo, que incluyó un grupo control (tiempo 0, es decir, 24h después de ser plateadas, sin recibir

tratamiento), y cuatro tiempos experimentales de 24h, 48, 72h y 96h después de haber sido transducidas con el correspondiente shRNA. Cada grupo incuyó una “n” de 8 pocillos de células. La medición de las absorbancias demostró que el tratamiento con el shRNA anti-SOX10 mató a las células de melanoma de manera significativa ($P < 0.05$) desde las 24h hasta las 96h después del tratamiento). En contraste, el grupo control-sin tratar y el grupo tratado con el shRNA-control mantuvieron un crecimiento estable que se incrementó hasta casi duplicarse desde las 24h y las 96h. Estos datos demuestran que SOX10 es requerido para la sobrevivencia y proliferación celular del melanoma a corto plazo (24h - 96h), sin embargo, para confirmar este efecto, era necesario verificar si SOX10 es también requerido para sobrevivencia y proliferación a largo plazo.

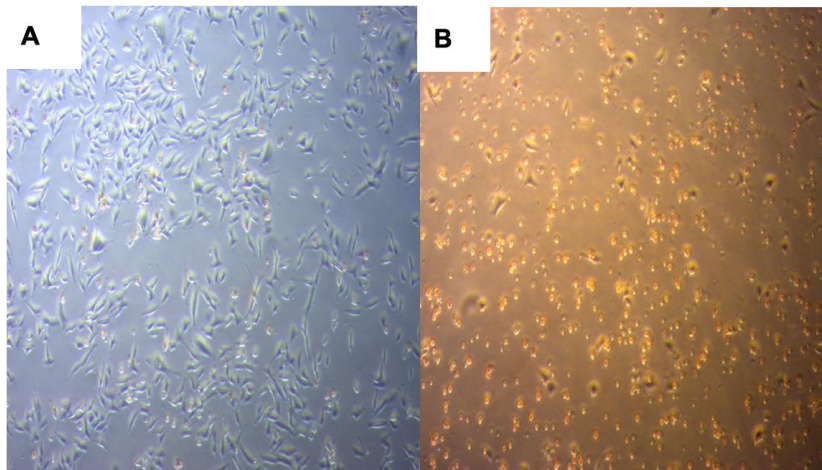


Figura 10. La inhibición de la expresión de SOX10 por shRNA mata las células de melanoma. (A) Células con DMEM solo (Control). (B) Células tratadas con shRNA anti-SOX10.

Para determinar si SOX10 era requerido para crecimiento del melanoma a largo plazo, se realizaron bioensayos de clonogenicidad celular que se midieron a las dos semanas. Las células fueron sembradas en platos de 24 pocillos y 24h después fueron tratadas con shRNA-anti SOX10 o con shRNA-control y se cambió el medio de cultivo cada 3 días. Como el vector viral del shRNA anti-SOX10 contenía un gen reportero de EGFP, se verificó la expresión del mismo a las 24h, a 1 semana y a las 2 semanas después de la transducción mediante microscopía confocal. La microscopía confocal confirmó la expresión del reportero de EGFP y además, demostró preliminarmente que en efecto, el shRNA mataba a las células de melanoma a las dos semanas, ya que se observaba elevada mortalidad celular (células flotando) a causa de la inhibición en expresión de SOX10.

A las dos semanas, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con PFA y teñidas con violeta cristal por 1h. Una hora después de ser teñidas las células se lavaron con agua, se visualizaron en el estéreo microscopio y foto documentadas. Los resultados demostraron que las células tratadas con el shRNA control mostraban alto crecimiento cubriendo al 100% la superficie completa de cada pocillo. En contraste, las células tratadas con el shRNA anti-SOX10 mostraban muerte celular, cubriendo apenas el 10% de la superficie del pocillo (**Figura 13**). Estos bioensayos de clonogenicidad demuestran que la expresión de SOX10 es requerida para sobrevivencia celular del melanoma a largo plazo. Además, los datos son consistentes con los resultados de los bioensayos de proliferación celular MTT medidos a corto plazo entre 24-96h. Ambos bioensayos confirman de manera robusta que SOX10 es requerido para la proliferación y sobrevivencia del melanoma.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Los análisis del transcriptoma de células de melanoma sensibles a BRAFi (MRA6) y resistentes a BRAFi (MRA5), nos brinda un panorama general de las diferencias en cuanto al perfil de expresión genética, que poseen las células antes y después de volverse resistente a los inhibidores BRAFi. Entre estas diferencias aquí describimos patrones de expresión en genes de células madre/CSC/MSC asociados de manera específica a células MRA6 sensibles al inhibidor de BRAF, pero ausentes en células resistentes MRA5. Estas diferencias son consistentes con reportes que indican que las células de melanoma sensibles a BRAFi (MRA6) se pueden reprogramar al estado iPSC mientras que las células resistentes (MRA5) no son reprogramables (Castro-Pérez et al., 2019). En particular, los datos reportados indicaban que el inhibidor de BRAF facilita la reprogramación a célula madre iPSC en células MRA6 sensibles a este inhibidor. Esto sugería que la vía oncogénica BRAF-MAPK restringe la activación de genes de célula madre/CSC/MSC que facilitan la reprogramación a iPSC. Además, los datos indicaban que las células de melanoma originalmente sensitivas al inhibidor, mostraban resistencia adquirida a BRAFi después de ser reprogramadas. Estos datos sugerían que el inhibidor de BRAF podría inducir la expresión de genes asociados a célula madre/CSC/MSC que facilitarían la conversión al estado de célula madre y en la adquisición de resistencia al fármaco. Sin embargo, la identidad de estos genes era desconocida. La identificación e inhibición de estos genes podría conducir a nuevos blancos requeridos para sobrevivencia y proliferación del melanoma y al posible desarrollo de tratamientos más efectivos contra esta enfermedad. En los trabajos presentados aquí, hemos identificado el gen SOX10 como un gen asociado a célula madre/CSC/MSC que es requerido para la sobrevivencia y proliferación del melanoma.

Las células MRA6 expresaron 34 genes específicos, no observados en células MRA5. De estos 34 genes, el 12% correspondían a genes asociados a procesos de desarrollo/célula madre, entre los cuales se identificaron y caracterizaron algunos genes candidatos con mayor respaldo. Al analizar la expresión de estos genes en los diferentes tumores registrados en la base de datos GEPIA2, seis de estos genes presentaban una elevada expresión con respecto al resto de los cánceres, además, esta expresión era significativamente diferente a la expresión en el tejido normal. De los seis genes, solo SOX10 mostró alta significancia en la supervivencia promedio de los pacientes. Una expresión alta de SOX10 se correlaciona con un mal pronóstico y una baja supervivencia de los pacientes de melanoma, según los análisis en GEPIA2. Esto es consistente con nuestros resultados, ya que el silenciamiento molecular de SOX10 causó la muerte de las células de melanoma, lo que indica que SOX10 es fundamental para la supervivencia y progresión del melanoma.

Además, en los trabajos presentados aquí identificamos que la expresión de la proteína SOX10 aumenta significativamente en las células de melanoma tratadas con BRAFi. Esto sugiere que BRAFi induce la expresión de SOX10 y con ello podría inducir la expresión de características de células madres que facilitan la reprogramación iPSC en melanoma y posiblemente contribuya a mecanismos de resistencia adquirida al fármaco. Numerosas publicaciones recientes sobre melanoma informan sobre la aparición de células con fenotipo de células madre de melanocitos durante la formación del melanoma, sin embargo, aún no están claros los mecanismos en la aparición de este fenotipo. Algunos estudios señalan la presencia de marcadores de células madre multipotentes, por ejemplo, CD-271+, como rasgo característico de células con fenotipo de células madres. Las células

CD-271+ parecen tener características celulares iniciadoras de melanoma, y la vía SOX10 podría ser necesaria para el desarrollo de estas características en la transformación maligna de melanocitos (Civenni et al., 2011). Otra vía que podría tener importancia con SOX10 es la actividad de la vía SOX10-MITF (SOX10 = HMG-box-10 relacionada con Sry; MITF = factor de transcripción asociado a microftalmia) y expresión de marcadores de células madre en melanocitos (Bakos et al., 2010; Flammiger et al., 2009; Redmer et al., 2014; Shakhova et al., 2015). Los marcadores de células madre y la vía SOX10-MITF podrían determinar su tumorigenicidad, heterogeneidad, plasticidad y propiedades similares a las de células madre (Trudej et al., 2017). Es posible que, después de la división celular, estas células se conviertan en nuevas células iniciadoras de tumores o en una progenie más diferenciada sin propiedades similares a las de células madres, que constituirán la masa tumoral (Civenni et al., 2011, Shakhova et al., 2012; Redmer et al., 2014). Sin embargo, comprender estos mecanismos requieren de más estudios que permitan describir, de forma más detallada y precisa, los genes blanco de SOX10 y sus funciones en el desarrollo del melanoma (Graf et al., 2014; Trudej et al., 2017; Tang & Cao, 2021).

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- El perfil de expresión genética es diferente en las células MRA5 y MRA6, lo que nos permitió identificar a SOX10 como un posible candidato robusto. Este gen tiene una elevada expresión en los tumores de melanoma con respecto a resto otros cánceres y tejidos normales. Además, la elevada expresión de SOX10 se asocia con baja supervivencia en pacientes de melanoma.
- La expresión de SOX10 es significativamente inducida por el tratamiento con el inhibidor de BRAFi en células de melanoma sensibles al inhibidor. Esto sugiere, además, que SOX10 podría contribuir en la activación de mecanismos de adquisición de resistencia del inhibidor y otros mecanismos como reprogramación a célula madre iPSC y activación de CSC/MSC en melanoma.
- El silenciamiento del gen de SOX10 por shRNA mata a las células de melanoma, lo que demuestra que SOX10 es requerido para la supervivencia y proliferación de estas células tumorales tanto a corto plazo (24h - 96h) como a largo plazo a las dos semanas.
- SOX10 es una vía de transducción que activaría genes/vías blanco río abajo necesarios para la resistencia a los medicamentos; sin embargo, se desconoce la identidad de estos genes.

RECOMENDACIONES

Todos los estudios presentados aquí fueron realizados *in vitro*, por lo que para confirmar la efectividad de SOX10 como un gen blanco en melanoma es necesario realizar estudios *in vivo* con ratones modelo de xenotransplante.

SOX10 tiene importantes funciones en el mantenimiento y progresión del melanoma que aún no se comprenden con claridad. Por lo tanto, profundizar en el análisis de los genes y las vías que son regulados por SOX10 podría contribuir en una mejor comprensión de esta vía y del papel de SOX10 en el desarrollo y progresión del melanoma en mecanismos de resistencia a tratamientos. Estudios en curso dirigidos por el Dr. Edgardo Castro Pérez tienen como objetivo identificar vías y genes regulados por SOX10 en melanoma.

REFERENCIAS

- André, Fabrice; *et. al.* AACR Project GENIE Consortium. (2017). AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer Discovery*, 7(8), 818-831. doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0151
- Ascierto, P. A., Schadendorf, D., Berking, C., Agarwala, S. S., van Herpen, C. M., Queirolo, P., Blank, C. U., Hauschild, A., Beck, J. T., St-Pierre, A., Niazi, F., Wandel, S., Peters, M., Zube, A., & Dummer, R. (2013). MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. *The Lancet. Oncology*, 14(3), 249–256. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70024-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70024-X)
- Bakos, R. M., Maier, T., Besch, R., Mestel, D. S., Ruzicka, T., Sturm, R. A., & Berking, C. (2010). Nestin and SOX9 and SOX10 transcription factors are coexpressed in melanoma. *Experimental dermatology*, 19(8), e89–e94. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00991.x>
- Bastian, B. C. (2014). The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annual Review of Pathology*, 9, 239-271. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104658
- Beasley G. M., Speicher P., Augustine C. K., Dolber P. C., Peterson B. L., Sharma K., Mosca P. J., Royal R., Ross M., Zager J. S., & Tyler D. S. (2015). A multicenter phase I dose escalation trial to evaluate safety and tolerability of intra-arterial temozolomide for patients with advanced extremity melanoma using normothermic isolated limb infusion. *Ann Surg Oncol*, 22(1), 287-94. doi: 10.1245/s10434-014-3887-z.
- Bernhardt M., Novak D., Assenov Y., Orouji E., Knappe N., Weina K., Reith M., Larribere L., Gebhardt C., Plass C., Umansky V., & Utikal J. (2017). Melanoma-Derived iPCCs Show Differential Tumorigenicity and Therapy Response. *Stem Cell Reports*, 8(5), 1379-1391. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.03.007.
- Castro-Pérez, E., Rodríguez, C. I., Mikheil, D., Siddique, S., McCarthy, A., Newton, M. A., & Setaluri, V. (2019). Melanoma Progression Inhibits Pluripotency and Differentiation of Melanoma-Derived iPSCs Produces Cells with Neural-like Mixed Dysplastic Phenotype. *Stem cell report*, 13(1), 177-192. doi:10.1016/j.stemcr.2019.05.018
- Castro-Pérez E., Sadangi S., Singh M., & Setaluri V. (2021). Chapter 9 - Melanoma-derived induced pluripotent stem cells: a model for understanding melanoma cell of origin and drug resistance. In: *Cell Sources for iPSCs Volume 7*; Pages 191-219. In *Advances in Stem Cell Biology*. Alexander Birbrair, Editor. Elsevier/Academic Press. 300pp.
- Castro-Pérez E., Singh M., Sadangi S., Mela-Sánchez C., & Setaluri V. (2023). Connecting the dots: Melanoma cell of origin, tumor cell plasticity, trans-differentiation, and drug resistance. *Pigment Cell Melanoma Res*, 36(5), 330-347.
- Cheng, L., Lopez-Beltran, A., Massari, F., MacLennan, G. T., & Montironi, R. (2018). Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a

- move toward precision medicine. *Modern Pathology*, 31(1), 24-38. doi:10.1038/modpathol.2017.104
- Cherfils, J., & Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological Reviews*, 93(1), 269-309. doi:10.1152/physrev.00003.2012
- Civenni, G., Walter, A., Kobert, N., Mihic-Probst, D., Zipser, M., Belloni, B., Seifert, B., Moch, H., Dummer, R., van den Broek, M., & Sommer, L. (2011). Human CD271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth. *Cancer research*, 71(8), 3098–3109. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3997>
- Clark, W. H., Jr, Ainsworth, A. M., Bernardino, E. A., Yang, C. H., Mihm, C. M., Jr, & Reed, R. J. (1975). The developmental biology of primary human malignant melanomas. *Seminars in oncology*, 2(2), 83–103.
- Clark, W. H., Jr, Elder, D. E., & Van Horn, M. (1986). The biologic forms of malignant melanoma. *Human pathology*, 17(5), 443–450. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(86\)80032-6](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(86)80032-6)
- Curtin J. A., Fridlyand J., Kageshita T., Patel H. N., Busam K. J., Kutzner H., Cho K. H., Aiba S., Bröcker E.B., LeBoit P. E., Pinkel D., Bastian B. C. (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*, 353(20), 2135–47.
- Damsky, W., Micevic, G., Meeth, K., Muthusamy, V., Curley, D. P., Santhanakrishnan, M., Erdelyi, I., Platt, J. T., Huang, L., Theodosakis, N., Zaidi, M. R., Tighe, S., Davies, M. A., Dankort, D., McMahan, M., Merlino, G., Bardeesy, N., & Bosenberg, M. (2015). mTORC1 activation blocks BrafV600E-induced growth arrest but is insufficient for melanoma formation. *Cancer cell*, 27(1), 41–56. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.014>
- El Achar Villarreal, O. E. (2019). Experiencia En El Manejo De Los Pacientes Con Melanoma En El Instituto Oncológico Nacional De Panamá En Los Años 2012 Al 2017. *Revista Médica de Panamá*, 39(2). doi:10.37980/im.journal.rmdp.2019797
- El-Khattouti, A., Selimovic, D., Haikel, Y., Megahed, M., Gomez, C. R., & Hassan, M. (2014). Identification and analysis of CD133(+) melanoma stem-like cells conferring resistance to taxol: An insight into the mechanisms of their resistance and response. *Cancer letters*, 343(1), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.09.024>
- Ernfors, P., (2010). Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. *Exp. Cell Res*, 316, 1397-1407.
- Flaherty, K. T., Robert, C., Hersey, P., Nathan, P., Garbe, C., Milhem, M., & Schadendorf, D. (2012). Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 367(2), 107-114. doi:10.1056/NEJMoa1203421
- Flammiger, A., Besch, R., Cook, A. L., Maier, T., Sturm, R. A., & Berking, C. (2009). SOX9 and SOX10 but not BRN2 are required for nestin expression in human melanoma cells. *The Journal of investigative dermatology*, 129(4), 945–953. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.316>
- Friedman R. J., Rigel D. S., & Kopf A. W. (1985). Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin*, 35(3), 130–51.

- Graf, S. A., Busch, C., Bosserhoff, A. K., Besch, R., & Berking, C. (2014). SOX10 promotes melanoma cell invasion by regulating melanoma inhibitory activity. *The Journal of investigative dermatology*, *134*(8), 2212–2220. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.128>
- Goel, V. K., Lazar, A. J., Warneke, C. L., Redston, M. S., & Haluska, F. G. (2006). Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *The Journal of investigative dermatology*, *126*(1), 154–160. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700026>
- Gowrishankar K., Snoyman S., Pupo G. M., Becker T. M., Kefford R. F., & Rizos H. (2012). Acquired resistance to BRAF inhibition can confer cross-resistance to combined BRAF/MEK inhibition. *J Invest Dermatol*, *132*, 1850–9.
- Haass, N. K., Smalley, K. S., Li, L., & Herlyn, M. (2005). Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Research*, *18*, 150–159.
- Hingorani, S. R., Jacobetz, M. A., Robertson, G. P., Herlyn, M., & Tuveson, D. A. (2003). Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation. *Cancer research*, *63*(17), 5198–5202.
- Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V., Arold, S. T., Imielinski, M., Theurillat, J. P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., Dicara, D., Ramos, A. H., Lawrence, M. S., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Voet, D., Saksena, G., Stransky, N., Onofrio, R. C., Winckler, W., & Chin, L. (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*, *150*(2), 251–263. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.024>
- Holderfield, M., Deuker, M. M., McCormick, F., & McMahon, M. (2014). Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nature reviews Cancer*, *14*(7), 455–467. doi:10.1038/nrc3760
- Horn, S., Figl, A., Rachakonda, P. S., Fischer, C., Sucker, A., Gast, A., Kadel, S., Moll, I., Nagore, E., Hemminki, K., Schadendorf, D., & Kumar, R. (2013). TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6122), 959–961. <https://doi.org/10.1126/science.1230062>
- Houben, R., Becker, J. C., Kappel, A., Terheyden, P., Bröcker, E.-B., Goetz, R., & Rapp, U. R. (2004). Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. *Journal of carcinogenesis*, *3*, 6. doi:10.1186/1477-3163-3-6
- Huang, F. W., Hodis, E., Xu, M. J., Kryukov, G. V., Chin, L., & Garraway, L. A. (2013). Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6122), 957–959. <https://doi.org/10.1126/science.1229259>
- Hugo, W., Shi, H., Sun, L., Piva, M., Song, C., Kong, X., & Lo, R. S. (2015). Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. *Cell*, *162*(6), 1271–1285. doi:10.1016/j.cell.2015.07.061
- Jamal S. M. E., Alamodi A., Wahl R. U., Grada Z., Shareef M. A., Hassan S. Y., Murad F., Hassan S. L., Santourlidis S., Gomez C. R., Haikel Y., Megahed M., & Hassan M. (2020). Melanoma stem cell maintenance and chemo-resistance are mediated by CD133 signal to PI3K-dependent pathways. *Oncogene*, *39*(32), 5468–5478. doi:10.1038/s41388-020-1373-6.

- Johannessen C. M., Boehm J. S., Kim S. Y., Thomas S. R., Wardwell L., Johnson L. A., Emery C. M., Stransky N., Cogdill A. P., Barretina J., Caponigro G., Hieronymus H., Murray R. R., Salehi-Ashtiani K., Hill D. E., Vidal M., Zhao J. J., Yang X, Alkan O, Kim S, Harris J. L., Wilson C. J., Myer V. E., Finan P. M., Root D. E., Roberts T. M., Golub T., Flaherty K. T., Dummer R, Weber B. L., Sellers W. R., Schlegel R., Wargo J. A., Hahn W. C., Garraway L. A. (2010). COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature*, 468(7326),968-72. doi: 10.1038/nature09627.
- Johnson D. B., Menzies A. M., Zimmer L., Eroglu Z., Ye F., Zhao S., Rizos H., Sucker A., Scolyer R. A., Gutzmer R., Gogas H., Kefford R. F., Thompson J. F., Becker J. C., Berking C., Egberts F., Loquai C., Goldinger S. M., Pupo G. M., Hugo W., Kong X., Garraway L. A., Sosman J. A., Ribas A., Lo R. S., Long G. V., & Schadendorf D. (2015). Acquired BRAF inhibitor resistance: A multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms. *Eur J Cancer*, 51(18), 2792-9. doi: 10.1016/j.ejca.2015.08.022.
- Kakavand H., Jakkett L. A., Menzies A. M., Gide T. N., Carlino M. S., Saw R. P. M., Thompson J. F., Wilmott J. S., Long G. V., & Scolyer R. A. (2017). Negative immune checkpoint regulation by VISTA: a mechanism of acquired resistance to anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma patients. *Mod Pathol*, 30(12), 1666-1676. doi: 10.1038/modpathol.2017.89.
- Kakadia, S., Yarlagadda, N., Awad, R., Kundranda, M., Niu, J., Naraev, B., & Mahmoud, F. (2018). Mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors and clinical update of US Food and Drug Administration-approved targeted therapy in advanced melanoma. *OncoTarget and Therapy*, 11, 7095-7107. doi:10.2147/OTT.S182721
- Kemper, K., de Goeje, P. L., Peeper, D. S., & van Amerongen, R. (2014). Phenotype switching: tumor cell plasticity as a resistance mechanism and target for therapy. *Cancer research*, 74(21), 5937–5941. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1174>
- Krauthammer, M., Kong, Y., Bacchiocchi, A., Evans, P., Pornputtpong, N., Wu, C., McCusker, J. P., Ma, S., Cheng, E., Straub, R., Serin, M., Bosenberg, M., Ariyan, S., Narayan, D., Sznol, M., Kluger, H. M., Mane, S., Schlessinger, J., Lifton, R. P., & Halaban, R. (2015). Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nature genetics*, 47(9), 996–1002. <https://doi.org/10.1038/ng.3361>
- Kumar, D., Kumar, S., Gorain, M., Tomar, D., Patil, H. S., Radharani, N. N. V., Kumar, T. V. S., Patil, T. V., Thulasiram, H. V., & Kundu, G. C. (2016). Notch1-MAPK Signaling Axis Regulates CD133⁺ Cancer Stem Cell-Mediated Melanoma Growth and Angiogenesis. *The Journal of investigative dermatology*, 136(12), 2462–2474. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.07.024>
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, 10(3), R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>

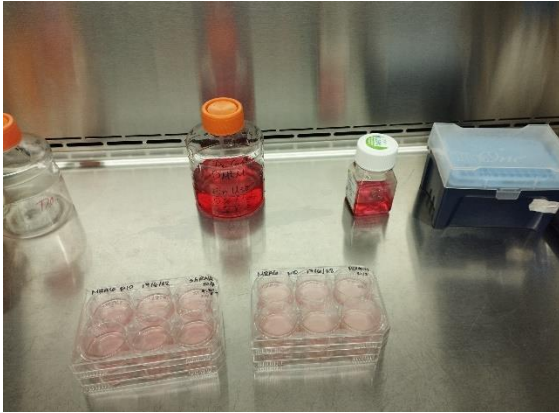
- Leng, N., Dawson, J. A., Thomson, J. A., Ruotti, V., Rissman, A. I., Smits, B. M., Haag, J. D., Gould, M. N., Stewart, R. M., & Kendziorski, C. (2013). EBSeq: an empirical Bayes hierarchical model for inference in RNA-seq experiments. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *29*(8), 1035–1043. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt087>
- Li B., Ruotti V., Stewart R., Thomson J., Dewey C. (2010). RNA-Seq gene expression estimation with read mapping uncertainty. *Bioinformatics*, *26*(4), 493-500. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp692>
- Lin, D. T., Davis, N. G., & Conibear, E. (2017). Targeting the Ras palmitoylation/depalmitoylation cycle in cancer. *Biochemical Society transactions*, *45*(4), 913-921. doi:10.1042/BST20160303
- Lo, J. A., & Fisher, D. E. (2014). The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science (New York, N. Y.)*, *346*(6212), 945-949. doi:10.1126/science.1253735
- Menzies, A. M., Haydu, L. E., Visintin, L., Carlino, M. S., Howle, J. R., Thompson, J. F., Kefford, R. F., Scolyer, R. A., & Long, G. V. (2012). Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, *18*(12), 3242–3249. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0052>
- Miller, A. J., & Mihm, M. C. (2006). Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, *355*(1), 51-65. doi:10.1056/NEJMra052166
- Mirmohammadsadegh, A., Marini, A., Nambiar, S., Hassan, M., Tannapfel, A., Ruzicka, T., & Hengge, U. R. (2006). Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer research*, *66*(13), 6546–6552. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0384>
- Mort, R. L., Jackson, I. J., & Patton, E. E. (2015). The melanocyte lineage in development and disease. *Development*, *142*, 1287.
- Nissan, M. H., Pratilas, C. A., Jones, A. M., Ramirez, R., Won, H., Liu, C., Tiwari, S., Kong, L., Hanrahan, A. J., Yao, Z., Merghoub, T., Ribas, A., Chapman, P. B., Yaeger, R., Taylor, B. S., Schultz, N., Berger, M. F., Rosen, N., & Solit, D. B. (2014). Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer research*, *74*(8), 2340–2350. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2625>
- Ostrowski, S. M., & Fisher, D. E. (2021). Biology of Melanoma. *Hematology/oncology clinics of North America*, *35*(1), 29–56. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2020.08.010>
- Pulluri B., Kumar A., Shaheen M., Jeter J., & Sundararajan S. (2017). Tumor microenvironment changes leading to resistance of immune checkpoint inhibitors in metastatic melanoma and strategies to overcome resistance. *Pharm Res*, *123*, 95–102.
- R Development Core Team. (2007). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org>
- Raaijmakers, M. I., Widmer, D. S., Narechania, A., Eichhoff, O., Freiberger, S. N., Wenzina, J., & Levesque, M. (2016). Co-existence of BRAF and NRAS driver

- mutations in the same melanoma cells results in heterogeneity of targeted therapy resistance. *Oncotarget*, 7(47), 77163-77174. doi:10.18632/oncotarget.12848
- Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogén*, 26, 3100-3112.
- Redmer, T., Welte, Y., Behrens, D., Fichtner, I., Przybilla, D., Wruck, W., Yaspo, M. L., Lehrach, H., Schäfer, R., & Regenbrecht, C. R. (2014). The nerve growth factor receptor CD271 is crucial to maintain tumorigenicity and stem-like properties of melanoma cells. *PLoS one*, 9(5), e92596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092596>
- Robert, C., Karaszewska, B., Schachter, J., Rutkowski, P., Mackiewicz, A., Stroiakovski D., & Drucis, K. (2015). Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. *The New England Journal of Medicine*, 372, 30-39. doi:10.1056/NEJMoa1412690
- Roesch, A., Fukunaga-Kalabis, M., Schmidt, E. C., Zabierowski, S. E., Brafford, P. A., Vultur, A., & Herlyn, M. (2010). A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell*, 141(4), 583-594. doi:10.1016/j.cell.2010.04.020
- Satyamoorthy, K., Li, G., Gerrero, M. R., Brose, M. S., Volpe, P., Weber, B. L., Van Belle, P., Elder, D. E., & Herlyn, M. (2003). Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer research*, 63(4), 756-759.
- Shain, A. H., Yeh, I., Kovalyshyn, I., Sriharan, A., Talevich, E., Gagnon, A., Dummer, R., North, J., Pincus, L., Ruben, B., Rickaby, W., D'Arrigo, C., Robson, A., & Bastian, B. C. (2015). The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *The New England journal of medicine*, 373(20), 1926-1936. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1502583>
- Shain A. H., & Bastian B. C. (2016). From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*, 16(6), 345-58.
- Shain, A. H., Joseph, N. M., Yu, R., Benhamida, J., Liu, S., Prow, T., Ruben, B., North, J., Pincus, L., Yeh, I., Judson, R., & Bastian, B. C. (2018). Genomic and Transcriptomic Analysis Reveals Incremental Disruption of Key Signaling Pathways during Melanoma Evolution. *Cancer cell*, 34(1), 45-55.e4. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.06.005>
- Shakhova, O., Cheng, P., Mishra, P. J., Zingg, D., Schaefer, S. M., Debbache, J., Häusel, J., Matter, C., Guo, T., Davis, S., Meltzer, P., Mihic-Probst, D., Moch, H., Wegner, M., Merlino, G., Levesque, M. P., Dummer, R., Santoro, R., Cinelli, P., & Sommer, L. (2015). Antagonistic cross-regulation between Sox9 and Sox10 controls an anti-tumorigenic program in melanoma. *PLoS genetics*, 11(1), e1004877. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004877>
- Simanshu, D. K., Nissley, D. V., & McCormick, F. (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, 170(1), 17-33. doi:10.1016/j.cell.2017.06.009
- Slominski, A., Tobin, D.J., Shibahara, S., & Wortsman, J., (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev*, 84, 1155-1228.
- Stadmeyer, E., Heitzler, E., Resel, M., Cerroni, L., Wolf, P., & Dandachi, N. (2014). The BRAF V600K mutation is more frequent than the BRAF V600E mutation in

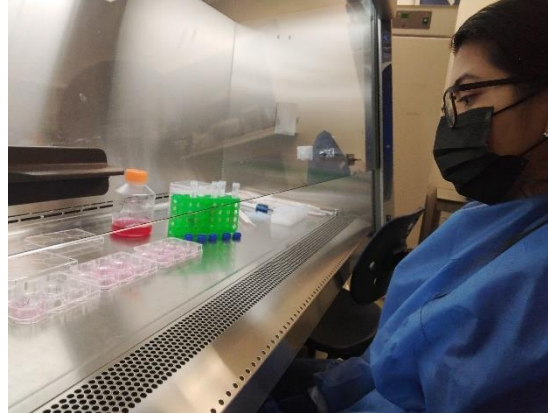
- melanoma in situ of lentigo maligna type. *The Journal of investigative dermatology*, 134(2), 548–550. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.338>
- Stagni, C., Zamuner, C., Elefanti, L., Zanin, T., Del Bianco, P., Sommariva, A., & Menin, C. (2018). BRAF Gene Copy Number and Mutant Allele Frequency Correlate with Time to Progression in Metastatic Melanoma Patients Treated with MAPK Inhibitors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(6), 1332-1340. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-1124
- Strazzula L., Vedak P., Hoang M. P., Sober A., Tsao H., & Kroshinsky D. (2014). The utility of re-excising mildly and moderately dysplastic nevi: a retrospective analysis. *J Am Acad Dermatol*, 71(6), 1071-6. doi: 10.1016/j.jaad.2014.08.025.
- Sullivan, R. J., & Flaherty, K. T. (2013). Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *European Journal of Cancer*, 49(6), 1297-1304. doi:10.1016/j.ejca.2012.11.019
- Sun, H., Hu, K., Wu, M., Xiong, J., Yuan, L., Tang, Y., Yang, Y., & Liu, H. (2011). Contact by melanoma cells causes malignant transformation of human epithelial-like stem cells via alpha V integrin activation of transforming growth factor β 1 signaling. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 236(3), 352–365. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010106>
- Tang Z., Kang B., Li C., Chen T., & Zhang Z. (2019). GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res*, 47(W1), W556-W560. doi:10.1093/nar/gkz430
- Tang, Y., & Cao, Y. (2021). SOX10 Knockdown Inhibits Melanoma Cell Proliferation via Notch Signaling Pathway. *Cancer management and research*, 13, 7225–7234. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S329331>
- Teh, J. L. F., Cheng, P. F., Purwin, T. J., Nikbakht, N., Patel, P., Chervoneva, I., Ertel, A., Fortina, P. M., Kleiber, I., HooKim, K., Davies, M. A., Kwong, L. N., Levesque, M. P., Dummer, R., & Aplin, A. E. (2018). *In Vivo* E2F Reporting Reveals Efficacious Schedules of MEK1/2-CDK4/6 Targeting and mTOR-S6 Resistance Mechanisms. *Cancer discovery*, 8(5), 568–581. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0699>
- Teixido, C., Castillo, P., Martínez-Vila, C., Arance, A., & Alos, L. (2021). Molecular Markers and Targets in Melanoma. *Cells*, 10(9), 2320. doi:10.3390/cells10092320
- Tsoi, J., Robert, L., Paraiso, K., Galvan, C., Sheu, K. M., Lay, J., Wong, D. J. L., Atefi, M., Shirazi, R., Wang, X., Braas, D., Grasso, C. S., Palaskas, N., Ribas, A., & Graeber, T. G. (2018). Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer cell*, 33(5), 890–904.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.017>
- Tudrej, K. B., Czepielewska, E., & Kozłowska-Wojciechowska, M. (2017). SOX10-MITF pathway activity in melanoma cells. *Archives of medical science: AMS*, 13(6), 1493–1503. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.60655>
- van den Hurk K., Niessen H. E., Veeck J., van den Oord J. J., van Steensel M. A., Zur Hausen A., van Engeland M., & Winnepeninckx V. J. (2012). Genetics and epigenetics of cutaneous malignant melanoma: a concert out of tune. *Biochim Biophys Acta*, 1826(1), 89-102. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.03.011.

- Vido, M. J., Le, K., Hartsough, E. J., & Aplin, A. E. (2018). BRAF Splice Variant Resistance to RAF Inhibitor Requires Enhanced MEK Association. *Cell Report*, 25(6), 1501-1510. doi:10.1016/j.celrep.2018.10.049
- Viros, A., Sanchez-Laorden, B., Pedersen, M., Furney, S. J., Rae, J., Hogan, K., Ejjama, S., Girotti, M. R., Cook, M., Dhomen, N., & Marais, R. (2014). Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. *Nature*, 511(7510), 478–482. <https://doi.org/10.1038/nature13298>
- Weinstock M.A., & Sober A.J. (1987). The risk of progression of lentigo maligna to lentigo maligna melanoma. *British Journal of Dermatology*, 116, 303-310. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1987.tb05843.x>
- Wu X., & Hammer J. A. (2014). Melanosome transfer: it is best to give and receive. *Curr Opin Cell Biol*, 29, 1–7.
- Yadav V., Zhang X., Liu J., Estrem S., Li S., Gong X. Q., Buchanan S., Henry J. R., Starling J. J., & Peng S. B. (2012). Reactivation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway by FGF receptor 3 (FGFR3)/Ras mediates resistance to vemurafenib in human B-RAF V600E mutant melanoma. *J Biol Chem*, 287(33), 28087-98. doi: 10.1074/jbc.M112.377218.
- Yang H., Kircher D. A., Kim K. H., Grossmann A. H., VanBrocklin M. W., Holmen S. L., & Robinson J. P. (2017). Activated MEK cooperates with Cdkn2a and Pten loss to promote the development and maintenance of melanoma. *Oncogene*, 36(27), 3842-3851. doi: 10.1038/onc.2016.526.
- Zhang, C.-L., Huang, T., He, W.-X., & Liu, D. (2017). Stem cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Oncotarget*, 8(43), 75756-75766. doi:10.18632/oncotarget.20798.

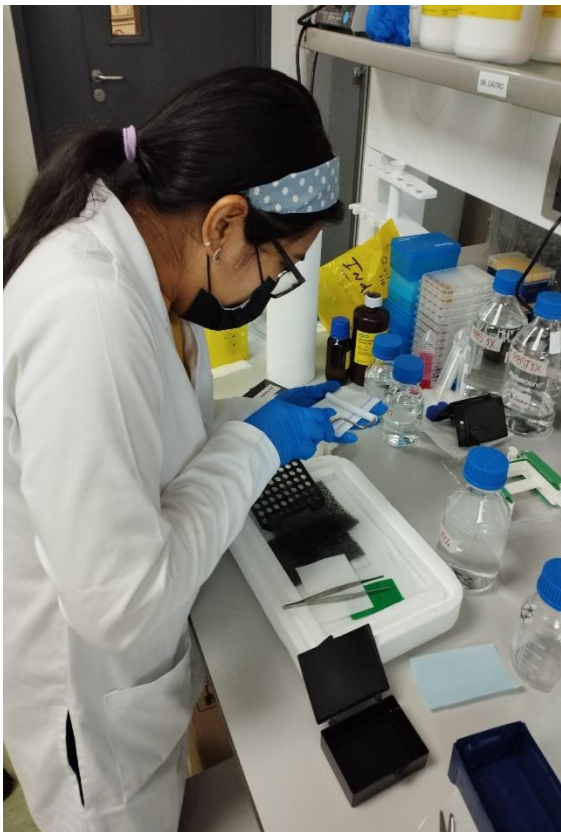
ANEXOS



Cultivo celular



Cosecha celular



Western Blot