

## Búsqueda de nuevas sinergias farmacológicas para el tratamiento melanoma humano

**Daniel Tomás Crespo Belenguer**

Grado en Farmacia. Universidad de Valencia.  
[dacresbe@alumni.uv.es](mailto:dacresbe@alumni.uv.es)

**Julián Carretero Asunción. Ángel Luís Ortega Valero.**

Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia

**Resumen:** el melanoma maligno es uno de los cánceres que presenta un peor pronóstico, dada su elevada capacidad metastásica y su resistencia a la quimioterapia convencional. En este contexto, resulta necesario abordar el estudio de nuevas estrategias terapéuticas. En nuestro proyecto nos hemos propuesto identificar, mediante un abordaje sistemático *in vitro*, potenciales sinergias antitumorales entre diferentes inhibidores de nuevas dianas moleculares en un panel de líneas celulares del melanoma humano.

**Palabras clave:** Melanoma. Cancer Stem Cell. Salinomycin. Sinergia.

### INTRODUCCIÓN

#### Melanoma

El melanoma es uno de los tumores más agresivos, metastásicos y letales, debido en cierta medida a la falta de detección del mismo en los estadios precoces de la enfermedad, cuando aún no ha metastatizado y es posible una extirpación quirúrgica. Además, su incidencia se encuentra en auge, sobretodo en países con exposiciones excesivas al sol. La tumorigénesis se explica a partir de la transformación de una población normal de los melanocitos integrados en la dermis y epidermis. Éstos tienen la función de secretar melanina, un pigmento de color que confiere protección a los queratinocitos frente a la radiación UV, agente agresivo que causa daños sobre macromoléculas, principalmente al ADN. Agresiones oncogénicas acumuladas sobre estos melanocitos producen un aumento en su proliferación, dando lugar a una lesión preneoplásica llamada nevus. Este microambiente confiere las condiciones necesarias para que algunas de estas células acumulen daños, que permitan adquirir mutaciones adicionales y consigan evadir los mecanismos homeostáticos tisulares, logrando migrar a la capa basal de la dermis, alcanzar la circulación (vía linfática o sanguínea) y establecerse en otros tejidos, dando lugar a metástasis.

Las mutaciones genéticas más frecuentes en el melanoma afectan al gen supresor de tumores *CDKN2A* en aproximadamente un 40% de los casos, el oncogén *BRAF* en un 60% de los mismos, y el oncogén *NRAS* en un 20% de los tumores. *CDKN2A* codifica dos proteínas de bajo peso molecular, p14 y p16. Esta última proteína es capaz de detener el ciclo celular tras la detección de una lesión, su ausencia permite la proliferación descontrolada y facilita la acumulación de mutaciones. *BRAF* y *NRAS* codifican proteínas clave de los procesos de crecimiento y diferenciación celular, de manera que una sobreexpresión conlleva una actividad mitótica elevada, que ayuda a alcanzar la capacidad migratoria. También se han identificado mutaciones en los genes supresores de tumores *TP53*, *STK11* o *PTEN*, cuya proteína actúa de regulador negativo de la vía PI3K/AKT/mTOR, una de las principales vías implicadas en el metabolismo, en la supervivencia y la proliferación celular. Otras proteínas oncogénicas como SRC, BCL-2, IGF1R o VEGFR están sobreexpresadas en el melanoma.

### **Terapias antimelanoma**

Tradicionalmente, las aproximaciones terapéuticas frente al cáncer han sido la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Con la mejora de los protocolos clínicos y el conocimiento progresivo de la biología de la enfermedad, hoy en día se consigue no menos del 50% de supervivencia del total de cánceres diagnosticados.

Con el descubrimiento de los mecanismos alterados que dan lugar al tumor, ha ganado importancia clínica la búsqueda de inhibidores frente a estas dianas moleculares específicas. Sin embargo, nos encontramos en las primeras etapas de transición, a caballo entre la quimioterapia tradicional y la aproximación moderna, con fármacos mucho más selectivos. No obstante, uno de los principales dificultades técnicas es la detección de estos marcadores que dirigen la enfermedad, para poder clasificar al paciente y elaborar una estrategia efectiva de tratamiento.

De esta manera, el estudio conjunto de las alteraciones genéticas y el desarrollo de inhibidores específicos, debería conducir a lo que se ha llamado "Medicina Personalizada". Este hecho se ha confirmado por ejemplo en el melanoma mediante el desarrollo del vemurafenib, fármaco recientemente aprobado que actúa como un inhibidor específico de la actividad quinasa de la proteína BRAF, que recordemos, se encuentra mutada e hiperactiva en un 60% de los melanomas<sup>(1)</sup>.

### **Importancia de las *Cancer Stem Cells* o células iniciadoras de tumores**

Las células que componen un tumor sólido no son iguales desde un punto de vista genético y funcional. Sino que nos encontramos con un abanico de células tumorales que si bien comparten una serie de rasgos difieren unas de otras en muchos otros. Recientemente se ha postulado la existencia de una población de células tumorales pluripotentes, que expresan un programa transcripcional pseudoembrionario, con capacidad de auto-renovación, denominadas *Cancer Stem Cells (CSC)*<sup>(2)</sup>. Se postula que la existencia de éstas podría ser uno de los factores más

condicionantes en las recidivas del cáncer, el desarrollo de metástasis y la aparición de resistencias a la quimioterapia. Esta hipótesis plantea la posibilidad de buscar y usar como dianas terapéuticas componentes clave en el mantenimiento de este fenotipo, como un posible tratamiento para el cáncer. Con este fin, en un primer lugar deberíamos aislar e identificar esta población de células iniciadoras de tumores utilizando marcadores y técnicas de cultivo adecuados. En los últimos años se han conseguido identificar marcadores de membrana como CD24, CD44, CD34, CD133, SCA1 o c-KIT asociados al fenotipo CSC en varios tipos de cáncer, incluyendo al melanoma. También se ha relacionado esta población CSC con la capacidad de crecer formando esferoides en condiciones de baja adherencia superando la muerte conocida como *anoikis*. De hecho, comprobamos que la expresión de estos marcadores aumenta cuando las células se cultivan en estas condiciones, lo que sugiere que sólo las células con estas capacidades podrían dividirse y generar un tumor. Además, recientemente se ha descrito que esta población de células CSC podría ser especialmente sensible a fármacos como la *salinomycin* (un ionóforo con actividad antibacteriana de uso veterinario), hecho que ha despertado grandes expectativas<sup>(3)</sup>.

Este trabajo presenta una plataforma de líneas celulares de melanoma humano para la caracterización de potenciales sinergias entre nuevos inhibidores específicos diseñados contra proteína quinasas, y profundiza en el conocimiento de la *salinomycin* y su papel tanto como inhibidor específico *in vitro* del fenotipo CSC, como sensibilizador al efecto citotóxico de algunos inhibidores de proteína quinasa.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Cultivos celulares y ensayos de citotoxicidad

Las líneas celulares de melanoma humano utilizadas fueron A375, A2058, MELJUSO, COLO679, COLO794, MEWO Y G361. Todas las líneas fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Gibco), enriquecido con suero bovino fetal, penicilina/estreptomicina y anfotericina B, y se mantuvieron en incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Una vez sembradas las células en placas de 96 pocillos, a razón de 5000 células por pocillo, y pasadas 24 horas de cultivo, se añadieron los fármacos, AZD6244 (MEK1/2), AEW541 (IGF1R), BEZ235 (PI3K/mTOR), DASATINIB (SRC, SALINOMYCIN (CSC), BIBW2992 (EGFR/HER2), SB431542 (TGFβ) Y PAZOPANIB (VEGFR). tanto de forma individual como en combinación siempre en relación 1:1. Las concentraciones ensayadas fueron desde 10 nM a aproximadamente 1 nM. Para estimar el grado de inhibición del crecimiento celular se utilizó el método de la tinción con Sulforodamina B transcurridas 48 horas post-adición.

### Análisis de datos

Los programas informáticos utilizados fueron Microsoft Excel® para el cálculo y para el tratamiento estadístico se empleó el programa GraphPad Prism®, ambos para

Mac. Para la determinación de combinaciones sinérgicas-antagónicas se empleó el software CalcuSyn®, que sigue el método descrito por Chou et al. Para la elaboración de *heatmaps* se utilizó el software Gene-E (Broad Institute) y los datos mutacionales y de expresión génica depositados en el COSMIC (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>) la Cancer Cell Line Encyclopedia (<http://www.broadinstitute.org/software/cprg/?q=node/11>).

## RESULTADOS

Las líneas celulares presentan curvas particulares de citotoxicidad para los fármacos estudiados (Fig.1). Las líneas resultaron ser aquellas que presentaban una mayor resistencia a los fármacos de manera general. En el análisis de las combinaciones sinérgicas, observamos tres patrones diferentes (Fig. 2): en el primero (cluster verde), se encuentran las combinaciones sinérgicas entre el inhibidor de PI3K/MTOR (BEZ235) y otros inhibidores proteína quinasa. El segundo grupo (color violeta), engloba las combinaciones en las que aparece la *salinomycin* y que afectan específicamente a las líneas BRAF<sub>wt</sub>. En el último cluster (color naranja), aparecen combinaciones entre inhibidores de tirosina quinasa y el inhibidor de MEK (AZD6244), y que sinergizan entre ellos preferentemente en las líneas BRAF mutantes.

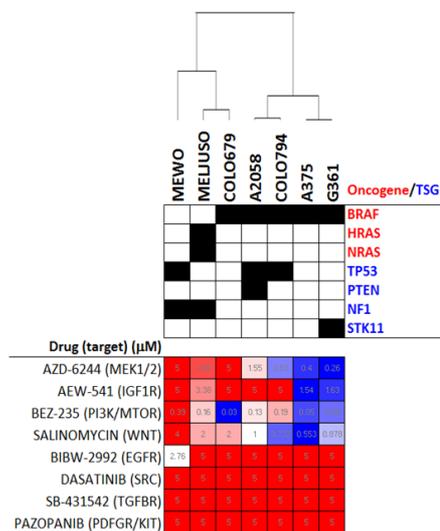


Figura 1 (Izquierda). Efecto citotóxico de los inhibidores en líneas de melanoma humano. En la parte superior anotamos el estatus mutacional en nuestras líneas celulares de los oncogenes y genes supresores de tumores más estudiados para el melanoma (el color negro indica que el gen se encuentra mutado). Vemos representado en forma de *heatmap* (rojo, valores altos, azul los bajos) las IC<sub>50</sub> de los fármacos estudiados frente a las líneas celulares utilizadas. A las IC<sub>50</sub> que superaban la concentración máxima ensayada y que por tanto fueron inferidas según la tendencia de la curva, se les asignó el valor más alto, de 5μM.

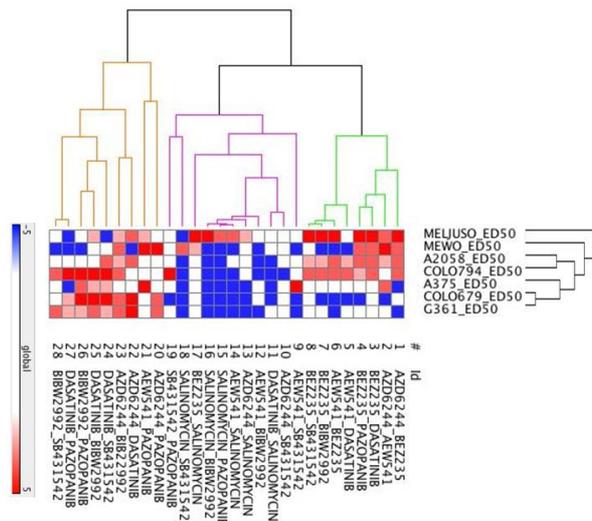


Figura 2 (Derecha). Efecto de la combinación de los inhibidores en líneas de melanoma humano. Representamos en forma de *heatmap* los efectos sinérgicos (gama roja) y antagónicos (gama azul), de las combinaciones de fármacos utilizadas.

A la vista de estos resultados, y dado el posible efecto sensibilizador que presenta la *salinomycin* frente a la mayoría de los inhibidores de proteína quinasa de manera selectiva en las líneas *BRAF<sub>wt</sub>* (Meljuso, y en menor medida Mewo) nos centramos en los detalles de esta posible interacción (Fig 3). Escogimos este cluster en particular porque los tumores *BRAF<sub>wt</sub>* son precisamente los huérfanos de tratamiento específico, ya que no responden a inhibidores específicos como el vemurafenib.

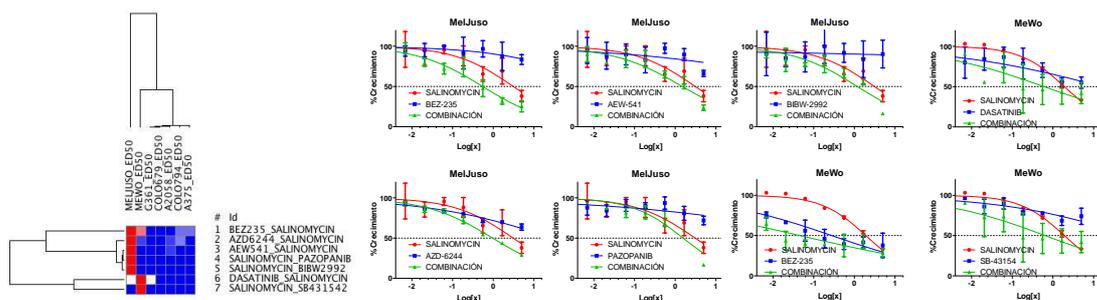


Figura 3. Análisis de sinergia entre la *salinomycin* y los inhibidores de proteína quinasa. A: detalle del efecto sinérgico de la *salinomycin*. B: ejemplos de curvas de citotoxicidad para combinaciones sinérgicas de Meljuso y MeWo. Los datos están normalizados y la concentraciones se muestran en logaritmo en base diez (expresadas en  $\mu\text{M}$ ).

Por último, realizamos un análisis de correlación entre diferentes firmas transcripcionales y genes individuales, relacionados todos ellos con el fenotipo cancer stem cell, en los datos de expresión génica de nuestras líneas celulares disponibles en la *Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)* (Fig. 5). En este análisis se observa una relación positiva entre la expresión de las dianas transcripcionales del *Policomb repressor*

*complex 2* y la sensibilidad a la *salinomycin*. Esta misma relación se observa con genes implicados en la señalización de la vía WNT (como WNT6, WNT7A, FZD1); la activación de la firma transcripcional del oncogén MYC, (frecuentemente activada en *cancer stem cells* de cáncer de mama); y la firma de activación de la transición epitelio-mesénquima (*CDH1\_KD signature*).

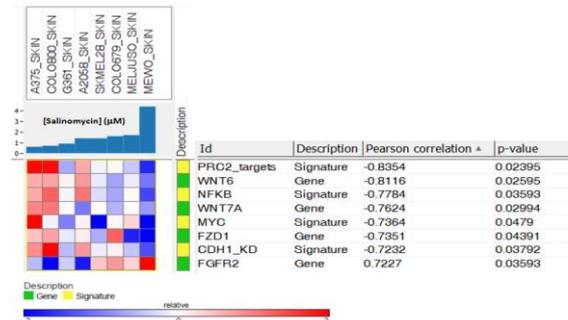


Figura 5: Representación de la relación entre las  $IC_{50}$  de *salinomycin*, con el grado de activación de firmas genéticas y genes individuales obtenidos de la CCLE.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo hemos comprobado que es posible encontrar combinaciones sinérgicas entre diferentes inhibidores específicos contra el melanoma. El uso de estas combinaciones permitiría disminuir las dosis administradas alcanzando un efecto tóxico equivalente. Además, el análisis de combinaciones puede resultar útil para prevenir resistencias al tratamiento al intervenir en vías de señalización diferentes.

El estudio profundo de los mecanismos moleculares que subyacen en estas sinergias resulta útil para comprender mejor la biología tumoral, ya que hemos comprobado que existen tendencias en función del estatus mutacional del oncogén BRAF. En las líneas BRAF *wild type*, con la adición de *salinomycin* observábamos un efecto sinérgico mayor que en los otros casos, pese a su  $IC_{50}$  individual elevada.

Se ha relacionado el efecto de la *salinomycin* de manera individual con la activación de firmas genéticas relacionadas con el fenotipo *cancer stem cell* y la vía WNT. Las líneas más resistentes al efecto individual de la *salinomycin* son precisamente aquellas donde ésta potencia el efecto citotóxico de inhibidores de proteína quinasas. Este efecto paradójico requiere sin duda de estudios más detallados.

### **BIBLIOGRAFÍA**

1. Tsao H, et al. Melanoma: from... Genes Dev. 2012;26(11):1131-55. Epub 2012/06/05.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks...Cell. 2011;144(5):646-74. Epub 2011/03/08.
3. Gupta PB et al Identification of selective...Cell.2009;138(4):645-59. Epub 2009/08/18.

Recibido: 7 noviembre 2013.

Aceptado: 24 febrero 2014.