

eman ta zabal zazu



Universidad Euskal Herriko
del País Vasco Unibertsitatea



MEDIKUNTZA ETA ODONTOLOGIA FAKULTATEA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

IMPLICACIÓN DE ANEXINA A5 EN LA PROGRESIÓN MALIGNA DEL MELANOMA HUMANO. VALOR PRONÓSTICO.

María Rocío Fernández Suárez

Departamento de Biología Celular e Histología

Facultad de Medicina y Odontología

Leioa, 2015

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido gracias a la financiación recibida a través de los siguientes proyectos de investigación:

-Subvención a grupos de investigación del sistema universitario Gobierno Vasco (IT524-10).

-Subvención a grupos de investigación del sistema universitario Gobierno Vasco (IT595-13).

Durante el periodo de realización de esta tesis la autora, María Rocío Fernández Suárez, ha sido beneficiaria de una beca predoctoral concedida por el Vicerrectorado de Investigación de la UPV/EHU, concedida en la convocatoria 2010 y de una Beca Fundación Jesús de Gangoiti Barrera.

A Ama y Aita

A Ramón

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

¡Ya está! Después de estos años en el laboratorio llego a la meta y quiero dar las gracias a todas las personas que me han acompañado en este largo y duro camino. Tod@s habéis contribuido de múltiples maneras en esta tesis doctoral. Espero no dejarme a nadie en el tintero, y en caso de olvido pido perdón por anticipado.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi directora de tesis la Doctora María Dolores Boyano por la oportunidad de trabajar, desarrollar mi vocación investigadora y realizar esta tesis en su laboratorio. Y por supuesto este agradecimiento se hace extensible a la Doctora Aintzane Asumendi, de la cual he aprendido muchas cosas, pero principalmente a cuestionarme todo y más sobre cualquier situación o problema. Gracias a las dos por confiar en mí, por todo el tiempo y paciencia dedicada a este trabajo y por vuestros consejos tanto dentro como fuera del laboratorio.

Quisiera extender mi agradecimiento a todos los profesores del departamento por su apoyo a lo largo de todos estos años. A todo el personal administrativo, de los servicios generales y becarios de otros departamentos que no han dudado en prestarme su ayuda siempre que lo he necesitado. Mención especial necesitan M^a Jose y Txus, por vuestra profesionalidad, disponibilidad y eficiencia. Y dentro de los servicios generales, no podría pasar por alto la ayuda prestada por Alex y Ricardo, muchas gracias por enseñarme a manejar tremendos equipos!

Para continuar, quisiera agradecer a mi GRUPO, con mayúsculas porque se lo merecen. Idoia, gracias a tí pertenezco al selecto club de "las Lolás". Erika, compañera de clase, de laboratorio, de viajes, compañera de vida en resumidas cuentas, mil gracias por todo. Ane,

la última incorporación pero no por ello menos importante, has sido un apoyo incondicional en la última etapa de esta tesis y siempre dispuesta a aprender. A todas os considero mucho más que compañeras de laboratorio, durante este camino nos hemos convertido en verdaderas amigas. También gracias a todos los estudiantes de grado y máster que han pasado durante estos años por "el cuartito", de cada uno de vosotros he aprendido y espero os haya enseñado también algo: Ainhoa, Sofía, Amaia, Cristina, Daní, Arantza. Gracias a tod@s por escucharme y animarme.

Gracias a mis amigas de la carrera, realmente sin vosotras no habría llegado hasta aquí. Todas hemos "sufrido" la realización de una tesis. Hemos compartido muchas horas, cafés, lloros y risas juntas, y por supuesto las que seguiremos compartiendo. Contigo Cata empecé a saber lo que era una tesis y conocí por primera vez a alguien con una clara vocación científica. Maí has sido y seguirás siendo compañía incondicional para todo tipo de ocasiones y una motivadora incansable. Arantza indispensable en toda celebración que se precie y gracias por abrirnos los ojos para ver que hay luz después de la Uní. Marta aunque en la distancia también has sido testigo de los descansitos en el "refu" y sobre todo de las quedadas que siempre se acababan convirtiendo en conversaciones sobre el laboratorio y la ciencia en general. Millones de gracias chicas!

Por supuesto a todos los compañer@s que he conocido durante esta etapa tan importante en mi vida. En septiembre de 2009 conocí a la generación de las glorias del central: Aintzane, Agurtzane, Alex, Idoia, Maitane, María H, Leire. Después llegamos la generación a la cual pertenezco: Aitor, Amaia, Elí, Jairo, JonLo, María D, Olatz, Pablo, Patri, Raquel. Y en esta última época la incorporación de un montón de gente nueva: Alan, Lutxu, Igor, Miren, Miguel, Noelia,

Vero (Fundita), Vero (Alonso), Patri, Zuríne. A tod@s muchas gracias, ya que ir al "labo" se ha convertido en algo mucho más agradable por todos vosotr@s, y por supuesto no olvidar las actividades "extraescolares" que siempre hemos organizado!

Gracias también a mis amig@s de siempre: Alex, Itzi, Irache, Maite y Diego, porque aunque todo esto de la investigación os haya sonado a lejano, siempre habéis estado ahí preguntado, pendientes de mí y más aún de la fecha, para poder venir a verme. A todos vosotros, os quiero.

Y por supuesto quiero dedicar esta tesis a mi familia, aíta, ama y Ramón. Vuestro apoyo incondicional ha sido y es fundamental para alcanzar mis metas, sin vosotros esto no hubiese sido posible. Ama y aíta, sin entender muy bien porque pasaba tantas horas en el "labo" haciendo experimentos que no siempre salían, me habéis transmitido el ánimo que en ocasiones me faltaba, el apoyo que necesitaba en cada momento y sois para mí el mejor ejemplo de personas trabajadoras, luchadoras y honradas. Sois los pilares de mi día a día, por enseñarme que con trabajo y constancia todo es posible. A Ramón, quien a lo largo de este tiempo ha tenido las palabras adecuadas para seguir motivándome, el abrazo necesario para recuperar fuerzas y la sonrisa en la cara para contagiármela en los "días de tormenta". Gracias infinitas.

En resumen, muchísimas gracias a tod@s. Un poquito de esta tesis os pertenece a cada uno de vosotr@s.

ÍNDICES

Abreviaturas	<i>xi</i>
Resumen	<i>xv</i>
Introducción	1
1. <i>Melanoma humano</i>	3
1.1. <i>La piel</i>	3
1.2. <i>Etiopatogenia</i>	6
1.3. <i>Epidemiología</i>	7
1.4. <i>Etiología</i>	10
1.4.1. <i>Factores dependientes del individuo</i>	10
1.4.2. <i>Factores exógenos al individuo</i>	11
1.5. <i>Diagnóstico y estadiaje</i>	12
1.6. <i>Tipos de melanoma</i>	17
1.6.1. <i>Melanoma de extensión superficial (MES)</i>	17
1.6.2. <i>Melanoma nodular (MN)</i>	18
1.6.3. <i>Lentigo maligno de melanoma (LMM)</i>	18
1.6.4. <i>Melanoma lentiginoso acral (MLA)</i>	18
1.7. <i>Alteraciones genéticas asociadas a melanoma</i>	19
1.7.1. <i>Mutaciones germinales asociadas a melanoma</i>	21
1.7.2. <i>Mutaciones somáticas asociadas a melanoma</i>	22
1.8. <i>Tratamiento del melanoma</i>	24
1.8.1. <i>Tratamiento quirúrgico del melanoma primario</i>	24
1.8.2. <i>Biopsia del ganglio centinela</i>	25
1.8.3. <i>Radioterapia</i>	26
1.8.4. <i>Quimioterapia</i>	26
1.8.5. <i>Inmunoterapia</i>	27
1.8.6. <i>Terapia dirigida</i>	28
2. <i>Migración celular y desarrollo de potencial invasivo</i>	30
3. <i>Anexinas</i>	35
3.1. <i>Anexinas y cáncer</i>	38
Hipótesis y objetivos	41
1. <i>Hipótesis</i>	43
2. <i>Objetivos</i>	44
Material y Métodos	45
1. <i>Líneas celulares</i>	47
2. <i>Cultivos celulares</i>	48
2.1. <i>Mantenimiento de las líneas celulares</i>	48
2.2. <i>Viabilidad y recuento celular</i>	50

2.3. <i>Detección de Micoplasma</i>	50
3. <i>Estudio de proliferación celular mediante el método colorimétrico XTT</i>	51
4. <i>Ensayos in vitro de migración o cierre de herida</i>	52
5. <i>Ensayos in vitro de invasión</i>	52
6. <i>Silenciamiento génico mediante siRNA</i>	54
7. <i>Técnicas de extracción y análisis de proteínas</i>	56
7.1. <i>Obtención de extractos celulares</i>	56
7.2. <i>Cuantificación de la concentración de proteína total mediante el método del ácido biconínico</i>	57
8. <i>Identificación de proteínas mediante Western Blot</i>	58
8.1. <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS</i>	58
8.2. <i>Transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa</i>	61
8.3. <i>Inmunomarcaje y revelado</i>	61
9. <i>Zimografía</i>	63
10. <i>Microscopía de fluorescencia</i>	65
11. <i>Análisis de ácidos nucleicos</i>	66
11.1. <i>Extracción y purificación de ADN</i>	67
11.2. <i>Extracción y purificación de ARN</i>	68
11.3. <i>Cuantificación de ácidos nucleicos</i>	69
11.4. <i>Retrotranscripción</i>	70
11.5. <i>Diseño de cebadores</i>	70
11.6. <i>Reacción PCR convencional</i>	71
11.7. <i>RT-qPCR con SYBR Green</i>	72
11.8. <i>Array de expresión génica</i>	76
12. <i>Pacientes</i>	80
12.1. <i>Diagnóstico clínico y anatomopatológico</i>	80
12.2. <i>Seguimiento</i>	80
12.3. <i>Obtención de suero a partir de muestras de sangre</i>	81
13. <i>Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)</i>	82
14. <i>Análisis estadístico</i>	84
15. <i>Análisis de imagen</i>	86
Resultados	87
1. <i>La proteína ANXA5 está implicada en la capacidad migratoria e invasiva de las células de melanoma humano</i>	89
1.1. <i>Expresión de ANXA5 en las líneas celulares de melanoma humano: A375, HT-144, MEL-HO y COLO-800</i>	89
1.2. <i>La expresión de ANXA5 se relaciona con la capacidad migratoria e invasiva de las líneas celulares de melanoma humano</i>	91
1.3. <i>El silenciamiento de ANXA5 reduce significativamente la capacidad migratoria e invasiva de las células de melanoma humano</i>	94

1.4. <i>La expresión de ANXA5 no afecta a la proliferación de las células de melanoma humano</i>	97
1.5. <i>Determinación de la actividad proteolítica de MMP-2 y MMP-9 en las líneas celulares de melanoma humano</i>	99
1.6. <i>Determinación de los niveles de expresión de MMP y TIMP implicados en el desarrollo del melanoma</i>	100
2. <i>Efecto de ANXA5 en la expresión de genes implicados en la motilidad celular</i>	102
2.1. <i>Proteína ARHGEF7</i>	105
2.2. <i>Proteína FAP</i>	106
2.3. <i>Proteína PTK2β</i>	108
2.4. <i>Proteína RAC1</i>	109
2.5. <i>Proteína VEGFA</i>	111
2.6. <i>Proteína WASL</i>	112
3. <i>Niveles séricos de ANXA5 en pacientes con melanoma y su relación con la evolución clínica de la enfermedad</i>	114
3.1. <i>Características clínicas del grupo de pacientes con melanoma</i>	114
3.2. <i>Niveles séricos de ANXA5 en pacientes con melanoma en relación a la evolución clínica y al estadio del tumor primario</i>	116
3.3. <i>Análisis multivariante de marcadores pronóstico en pacientes con melanoma</i>	121
3.4. <i>Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier</i>	122
<i>Discusión</i>	125
1. <i>Implicación de la proteína ANXA5 en la capacidad migratoria e invasiva de las células de melanoma humano</i>	127
2. <i>ANXA5 regula la expresión de genes relacionados con el control del citoesqueleto de actina</i>	133
3. <i>Marcadores de melanoma: ANXA5 como marcador pronóstico del melanoma</i>	139
<i>Conclusiones</i>	143
<i>Bibliografía</i>	147
<i>Anexos</i>	173

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras del apartado Introducción

<i>Figura 1. Representación esquemática de la piel.</i>	4
<i>Figura 2. Unidad melano-epidérmica.</i>	5
<i>Figura 3. Representación de los niveles de progresión del melanoma.</i>	7
<i>Figura 4. Evolución de la incidencia y mortalidad del melanoma cutáneo por sexo y año en la Comunidad Autónoma del País Vasco.</i>	9
<i>Figura 5. Evolución de la supervivencia (%) a los cinco años del melanoma cutáneo por sexo en la Comunidad Autónoma del País Vasco (1986-2004).</i>	10
<i>Figura 6. Criterios clínicos de diagnóstico del melanoma (ABCDE).</i>	13
<i>Figura 7. Niveles de invasión de Clark e índice de Breslow.</i>	14
<i>Figura 8. Fotografías de los tipos de melanoma cutáneo más comunes.</i>	19
<i>Figura 9. Vías de señalización implicadas en el desarrollo del melanoma.</i>	22
<i>Figura 10. Representación del estudio del ganglio centinela.</i>	26
<i>Figura 11. Mutaciones clave en el desarrollo de melanoma y sus dianas terapéuticas.</i>	29
<i>Figura 12. Papel de PI3K en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina y la migración celular.</i>	30
<i>Figura 13. Esquema de los principales mecanismos y moléculas implicadas en la regulación del citoesqueleto de actina.</i>	33
<i>Figura 14. Expresión de MMP y TIMP en la progresión maligna del melanoma.</i>	34
<i>Figura 15. Funciones intracelulares y extracelulares de las anexinas.</i>	37
<i>Figura 16. Funciones generales de las anexinas en la génesis tumoral.</i>	40

Figuras del apartado Material y Métodos

<i>Figura 17. Representación esquemática de los ensayos de invasión.</i>	53
<i>Figura 18. Funcionamiento del RNA de interferencia.</i>	55

Figuras del apartado Resultados

Figura 19. <i>Expresión de ANXA5 en líneas celulares de melanoma humano</i>	89
Figura 20. <i>Imágenes microscópicas mediante inmunofluorescencia de la expresión de ANXA5 en líneas celulares de melanoma humano</i>	90
Figura 21. <i>Ensayos de cierre de herida.</i>	92
Figura 22. <i>Ensayos de invasión sobre Matrigel.</i>	93
Figura 23. <i>Transfección con siRNA control en las células de melanoma humano.</i>	94
Figura 24. <i>Eficiencia de silenciamiento de ANXA5.</i>	95
Figura 25. <i>Efecto del silenciamiento de ANXA5 sobre lamigración de células de melanoma.</i>	96
Figura 26. <i>Efecto del silenciamiento de ANXA5 sobre la invasión de células de melanoma.</i>	97
Figura 27. <i>Análisis de la capacidad proliferativa de las líneas de melanoma humano.</i>	98
Figura 28. <i>Análisis de proliferación celular en las células silenciadas para ANXA5.</i>	98
Figura 29. <i>Actividad enzimática gelatinolítica asociada a MMP-2 y MMP-9.</i>	99
Figura 30. <i>Niveles de expresión relativa de MMP-2, MT1-MMP, TIMP-1 y TIMP-2.</i>	101
Figura 31. <i>Modulación de la expresión génica debido al silenciamiento de ANXA5 en las células de melanoma</i>	102
Figura 32. <i>Clasificación funcional de los genes modulados por el silenciamiento de ANXA5 en la línea MEL-HO de melanoma humano.</i>	104
Figura 33. <i>Niveles de expresión ARHGEF7 en líneas celulares de melanoma.</i>	106
Figura 34. <i>Niveles de expresión FAP en líneas celulares de melanoma.</i>	107
Figura 35. <i>Niveles de expresión PTK2β en líneas celulares de melanoma.</i>	109
Figura 36. <i>Niveles de expresión RAC1 en líneas celulares de melanoma.</i>	110
Figura 37. <i>Niveles de expresión VEGFA en líneas celulares de melanoma.</i>	112
Figura 38. <i>Niveles de expresión WASL en líneas celulares de melanoma.</i>	113
Figura 39. <i>Clasificación de los pacientes de melanoma de acuerdo a la localización del tumor primario.</i>	115
Figura 40. <i>Clasificación de los pacientes de melanoma de acuerdo al tipo de metástasis desarrollada.</i>	116

<i>Figura 41. Comparación de los niveles séricos de ANXA5 entre pacientes y controles sanos, y entre pacientes con diferentes estadios del tumor primario: I, II y III.</i>	119
<i>Figura 42. Comparación de los niveles séricos de ANXA5 entre los pacientes con melanomas de distinta evolución clínica.</i>	119
<i>Figura 43. Comparación de los niveles séricos de ANXA5 entre los pacientes de estadios tempranos con distinta evolución clínica.</i>	120
<i>Figura 44. Comparación de los niveles séricos de ANXA5 en función del tipo de metástasis desarrollada en los pacientes de melanoma.</i>	121
<i>Figura 45. Curva de supervivencia Kaplan-Meier.</i>	123

Figuras del apartado Discusión

<i>Figura 46. Modelo de señalización de ARHGEF7 a través de p38 para la reorganización del citoesqueleto de actina.</i>	135
<i>Figura 47. Diagrama de las principales vías de transducción mediadas por Src que contribuyen a la progresión del cáncer.</i>	137

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas del apartado Introducción

<i>Tabla 1. Clasificación TNM según AJCC.</i>	15
<i>Tabla 2. Sistema de estadiaje AJCC 2009.</i>	17
<i>Tabla 3. Características de los principales genes involucrados en la génesis y progresión del melanoma.</i>	20
<i>Tabla 4. Márgenes quirúrgicos para la exéresis del melanoma primario en relación al espesor tumoral.</i>	24
<i>Tabla 5. Nomenclatura y caracterización de las anexinas humanas.</i>	36

Tablas del apartado Material y Métodos

<i>Tabla 6. Condiciones de cultivo de las líneas celulares utilizadas.</i>	49
<i>Tabla 7. Secuencias de los siRNAs empleados</i>	55
<i>Tabla 8. Elaboración de la recta patrón para la cuantificación de proteínas</i>	57
<i>Tabla 9. Porcentaje de acrilamida utilizado en la separación de las proteínas en función de su peso molecular.</i>	59
<i>Tabla 10. Composición del running gel para diferentes porcentajes de acrilamida.</i>	60
<i>Tabla 11. Composición del stacking gel.</i>	60
<i>Tabla 12. Anticuerpos primarios utilizados.</i>	63
<i>Tabla 13. Anticuerpos secundarios utilizados.</i>	63
<i>Tabla 14. Tampón de carga para zimografía.</i>	64
<i>Tabla 15. Tampón sustrato de metaloproteasas.</i>	65
<i>Tabla 16. Cebadores utilizados en los ensayos de RT-qPCR.</i>	75
<i>Tabla 17. Diseño de la matriz de RT² Profiler™ PCR.</i>	78
<i>Tabla 18. Composición de la mezcla de retrotranscripción.</i>	79
<i>Tabla 19. Materiales y soluciones utilizadas en los ensayos ELISA.</i>	83

Tablas del apartado Resultados

Tabla 20. Datos clínicos de los pacientes diagnosticados con melanoma.	114
Tabla 21. Niveles séricos de ANXA5 en pacientes con melanoma y controles sanos.	118
Tabla 22. Niveles séricos de ANXA5 en pacientes con estadios tempranos de melanoma.	120
Tabla 23. Análisis multivariante de factores pronóstico en pacientes con melanoma.	122

ABREVIATURAS

μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar
ACRYL-BIS	Acrilamida-Bis-acrilamida
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ANXA5	Anexina A5
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	Ácido bicinconínico
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamiento local básica
BSA	Albúmina sérica bovina
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DAPI	4'-6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dubbecco
DMSO	DimetilSulfóxido
DNasa	Desoxirribonucleasa
DS	Desviación estándar
DTIC	Dacarbazina
DTT	Ditiotreitol
ECL	<i>Enhanced Chemi Luminiscence</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EF	Eficiencia
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fw	Forward
G	Galga, medida de jeringas
g	Gramo
g	Aceleración de la gravedad
GEF	<i>Guanine nucleotide-exchange factor</i>
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
L-Glu	L-Glutamina
LMM	Lentigo Maligno Melanoma
M	Molar
mA	Miliamperios
MES	Melanoma de Extensión Superficial
mg	Miligramo
mg/ml	Miligramo/mililitro

Milli-Q	Agua bidestilada
ml	Mililitro
MLA	Melanoma Lentiginoso Acral
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MN	Melanoma Nodular
n	Tamaño muestral
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
NS	No significativo
°C	Grado Celsius
p/v	Partes/volumen
pb	Pares de bases
PBE	Pacientes de buena evolución
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PME	Pacientes de mala evolución
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RGP	<i>Radial Growth Phase</i>
RNasa	Ribonucleasa
RPMI-1640	Medio de cultivo modificado de McCoy's
RT	Retrotranscripción
RT-qPCR	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
Rv	Reverse
S	Svedberg
SBF	Suero Bovino Fetal
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida
SE	Error estándar
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
TAE	Solución Tris, acetato y EDTA
TBS	Solución salina tamponada con tris
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Tm	<i>Melting Temperature</i>
UI	Unidades internacionales
UV	Ultravioleta
V	Voltios
VGP	<i>Vertical Growth Phase</i>

RESUMEN

El melanoma cutáneo es un tumor maligno que se origina a partir de la transformación maligna de los melanocitos de la epidermis. El interés por este tumor es cada vez mayor, ya que la incidencia de esta neoplasia crece de modo constante y alarmante en la población general, pero principalmente en los países desarrollados desde los años 50. Entre las características del melanoma es bien conocido su potencial maligno, es decir, su elevada capacidad de diseminación y de metástasis. Esto, junto con el hecho de que no existe un tratamiento efectivo para el melanoma metastático, lo convierte en un tumor potencialmente letal.

En la actualidad, la mejora del tratamiento del melanoma requiere establecer nuevos abordajes terapéuticos y factores pronósticos más eficientes, y para ello es necesaria una comprensión más detallada de las bases moleculares de esta patología. Recientes estudios han implicado a una familia de proteínas, las anexinas, con el desarrollo y la progresión de distintos tumores. Las características biológicas generales de las anexinas incluyen muchas acciones que son directa o indirectamente relevantes en determinados procesos tumorales; destacan su papel en la adhesión celular, la participación en la transducción de señales celulares, la inmunosupresión, la apoptosis, el mantenimiento de la integridad del citoesqueleto y la matriz extracelular y la respuestas frente a estímulos de proliferación y diferenciación celular.

El objetivo principal de esta tesis ha sido establecer una relación entre la proteína Anexina A5 (ANXA5) y las propiedades invasivas de las células de melanoma, además de evaluar el posible valor pronóstico de esta proteína ANXA5 en el desarrollo de la enfermedad.

Los resultados obtenidos confirman una expresión diferencial de la proteína ANXA5 entre las líneas celulares de melanoma analizadas. Se ha encontrado una correlación significativa entre la expresión de ANXA5 y la capacidad migratoria e invasiva de las líneas celulares de melanoma, lo que sugiere una implicación de dicha proteína en los mecanismos moleculares implicados en la migración y la invasión celular.

Tras el silenciamiento del gen *ANXA5* se llevaron a cabo estudios de expresión génica utilizando *arrays* específicos donde se detectaron cambios de expresión de genes relacionados con la capacidad migratoria e invasiva de las células. Concretamente, en las células silenciadas destacan los genes sobreexpresados *ARHGEF7*, *DPP4*, *PAK1*, *PAK4*, y *SRC*, y genes cuya expresión se ve reducida: *ACTN3*, *EGFR*, *FAP*, *LIMK1*, *MYL9*, *PFN1*, *PTK2*, *PTK2 β* , *RAC1*, *RHO*, *TGF β 1*, *VEGFA* y *WASL*. Tras seleccionar aquellos genes cuyo cambio de expresión se consideró más significativo, se analizó la variación en la cantidad de las proteínas *ARHGEF7*, *FAP*, *PTK2 β* , *RAC1*, *VEGFA* y *WASL* mediante western blot. A través de los resultados obtenidos se evidencia que *ANXA5* posee un efecto sobre las proteínas analizadas que, de modo directo o indirecto, están relacionadas principalmente con la regulación del citoesqueleto de actina.

Por otro lado, hemos analizado los niveles séricos de la proteína *ANXA5* en 155 pacientes con melanoma y su relación con la progresión maligna de la enfermedad. Los resultados mostraron que los niveles séricos de *ANXA5* aumentan significativamente en los pacientes con melanoma frente a los controles sanos, pero especialmente aumentan significativamente en aquellos pacientes que desarrollaron metástasis en los dos primeros años de seguimiento clínico de la enfermedad.

Análisis estadísticos multivariantes de regresión logística y análisis de supervivencia de Kaplan-Meier ponen en evidencia que los niveles séricos elevados de *ANXA5* se relacionan con la progresión metastática del tumor. En conclusión, independientemente del estadio tumoral, el aumento de los niveles séricos de *ANXA5* es un marcador pronóstico de la progresión metastática.

INTRODUCCIÓN

1. Melanoma humano

El melanoma cutáneo es un trastorno neoplásico de la piel que tiene su origen en la transformación maligna de los melanocitos situados en la capa basal de la epidermis. El melanoma se ha consolidado como una de las enfermedades cutáneas con mayor crecimiento en este siglo, y constituye una importante causa de morbilidad y mortalidad a escala mundial (Kim y cols., 2014; Weinstein y cols., 2014). Para entender la génesis del melanoma es fundamental conocer el órgano en el cual la enfermedad comienza su desarrollo: la piel.

1.1. La piel

La piel es el órgano de mayor tamaño del cuerpo humano y actúa como barrera protectora que aísla al organismo del medio que lo rodea protegiendo y manteniendo íntegras sus estructuras, al tiempo que actúa como sistema de comunicación con el entorno. La estructura general de la piel (Figura 1) se compone de tres estratos con funciones y componentes diferentes que se interrelacionan, y que del exterior al interior son:

- **Epidermis:** es la superficie externa de la piel y está formada por un epitelio plano queratinizado de un grosor medio de 0,1 mm. Este estrato es de origen ectodérmico y no está irrigado por ningún vaso sanguíneo.
- **Dermis:** es una gruesa capa de tejido conectivo fibroelástico denso que sostiene y nutre la epidermis. Este estrato es de origen mesodérmico, está altamente vascularizado y posee numerosos receptores sensitivos.
- **Hipodermis:** es el estrato más profundo de la piel y contiene cantidades variables de tejido adiposo organizado en lobulillos separados por tabiques de tejido conjuntivo laxo.

Ese epitelio pluriestratificado que forma la piel está compuesto en un 80-95% de queratinocitos que albergan en su interior queratina; en menor número se encuentran los melanocitos, encargados de sintetizar el pigmento fotoprotector denominado melanina; y aparecen también células de presentación antigénica de Langerhans, involucradas en la respuesta inmune; además de células mecano-receptoras de Merkel y células inflamatorias (Álvarez Mon-Soto y cols., 2005).

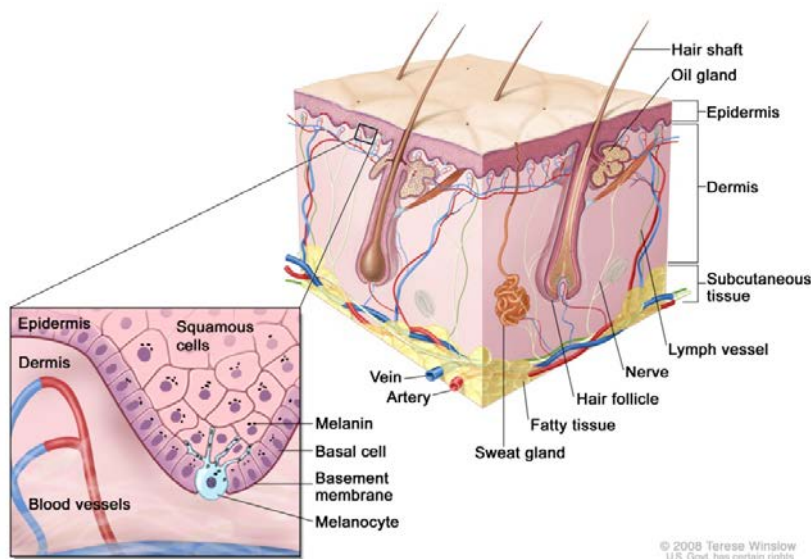


Figura 1. Representación esquemática de la piel. En el dibujo aparecen representadas las tres capas principales que componen la piel: epidermis, dermis e hipodermis (Terese Winslow, 2008).

Los melanocitos son células productoras de melanina, responsables de la pigmentación de la piel, que derivan de células de la cresta neural. Sus inmediatos precursores, los melanoblastos, emigran durante el primer trimestre de la gestación desde la cresta neural a diversas regiones anatómicas como la piel, la úvea y el folículo piloso (Hirobe, 2011). En condiciones normales, los melanocitos se sitúan en la capa basal epidérmica de la piel y contactan con los queratinocitos por medio de sus dendritas, existiendo un melanocito por cada 36-40 queratinocitos y por cada 8-9 células basales (unidad melano-epidérmica) (Figura 2).

La densidad de los melanocitos es variable dependiendo de la región anatómica (mayor en la región genital y areola mamaria), pero es muy constante entre los individuos de las distintas regiones geográficas continentales. Los melanocitos son células con un reducido poder de replicación, que presentan un citoplasma claro, no contienen desmosomas y cuya característica más destacada es que poseen unos orgánulos con membrana denominados melanosomas. En los melanosomas tiene lugar la síntesis de melanina a partir del aminoácido tirosina a través de una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente. La transferencia de los melanosomas a los queratinocitos está mediada por las dendritas de los melanocitos. Sin embargo, a pesar de que hoy en día existe mucha información tanto de los melanocitos como de los queratinocitos, los mecanismos de interacción entre estos dos tipos celulares necesitan aún ser estudiados para entender los mecanismos mediante los cuales se transfiere la melanina (Gillbro y Olsson, 2011). Los queratinocitos transportan la melanina en su migración hacia las capas superficiales de la epidermis, formando la unidad melano-epidérmica encargada de proteger la piel de la acción de los rayos solares.

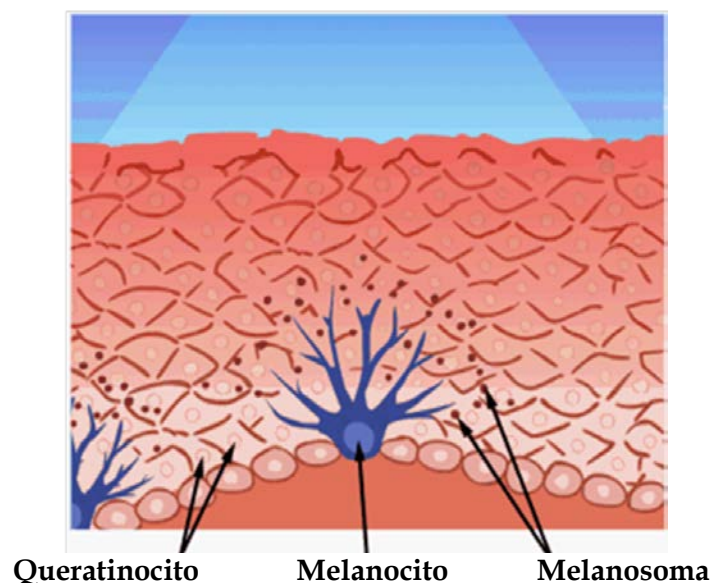


Figura 2. Unidad melano-epidérmica. Melanocitos y queratinocitos localizados en la capa basal epidérmica (www.clinuvel.com/en/science-of-skin).

1.2. Etiopatogenia

El melanoma resulta de las alteraciones moleculares en genes involucrados en la regulación, proliferación, diferenciación, adhesión celular y apoptosis celular (Gogas y cols., 2009). Las células sufren alteraciones en los mecanismos habituales de reproducción y crecimiento, lo que les impide responder a las señales reguladoras encargadas de mantener estos procesos dentro de los límites normales.

El melanoma tiene un comportamiento biológico que determina el pronóstico de la enfermedad, ya que presenta dos fases de crecimiento, una radial o intraepidérmica y otra vertical o intradérmica. La fase de crecimiento radial (*Radial Growth Phase, RGP*) puede durar meses o años; la tumoración está limitada a la epidermis y no presenta capacidad de producir metástasis. En esta situación la extirpación quirúrgica es curativa. En la fase de crecimiento vertical (*Vertical Growth Phase, VGP*), la tumoración que crece en profundidad puede invadir la dermis y la hipodermis adquiriendo la capacidad de producir metástasis linfáticas o sanguíneas. Las células tumorales entran en el torrente sanguíneo y pueden alcanzar e invadir algún órgano del cuerpo produciendo metástasis a distancia.

El desarrollo del melanoma a partir de una lesión melanocítica tiene lugar a través de diferentes niveles de progresión tumoral desde el *nevus* melanocítico hasta el melanoma (Figura 3). En la fase de *nevus* melanocítico, los melanocitos situados en la parte basal de la epidermis empiezan a dividirse aumentando en número y dando lugar a un *nevus* (lesión benigna) que se caracteriza por tener un crecimiento limitado. Este *nevus* puede sufrir variaciones de tamaño, forma y color, dando lugar a un *nevus* atípico o displásico (lesión premaligna) con una distribución irregular de las células. La fase de crecimiento radial del melanoma se caracteriza por una marcada atipia, una disminución de la diferenciación y una proliferación clonal, pero también por la incapacidad de

metastatizar. Sin embargo, en la fase de crecimiento vertical, las células tumorales invaden la dermis adquiriendo la capacidad de producir metástasis.

Actualmente el buen pronóstico de los pacientes con melanoma depende de que se realice el diagnóstico en estadios iniciales de la enfermedad. En el melanoma metastático ya existe un crecimiento dissociado del tumor primario con una proliferación tumoral en diferentes órganos a distancia del tumor primario.

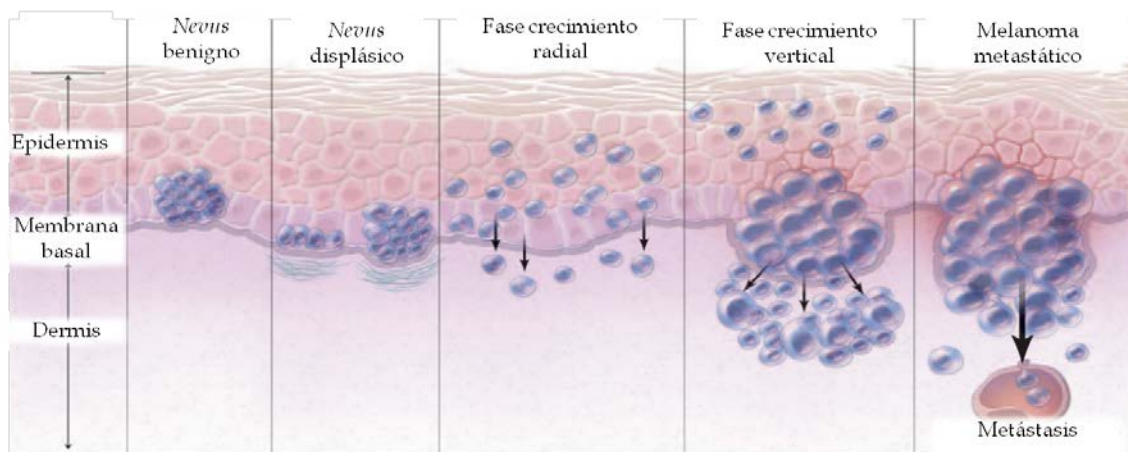


Figura 3. Representación de los niveles de progresión del melanoma (adaptado de Miller y Mihm, 2006).

1.3. Epidemiología

La incidencia y mortalidad del melanoma maligno cutáneo ha aumentado de forma espectacular en las últimas décadas. El incremento anual en las cifras de incidencia varía entre las diferentes poblaciones, pero desde principios de los años 60 del pasado siglo se ha detectado un incremento sostenido de la incidencia del melanoma de entre un 3-7% anual en la mayoría de los países occidentales (Bevona y Sober, 2002). Dentro de los cánceres de piel el melanoma representa aproximadamente un 4%; sin embargo, es responsable

del 80% de las muertes por cáncer cutáneo, lo que evidencia su agresividad y capacidad metastática (Acosta y cols., 2009).

A pesar de que la incidencia del melanoma humano está creciendo constantemente en todo el mundo, la mortalidad ocasionada por este tumor no ha sufrido un aumento paralelo (De Giorgi y cols., 2012). Este hecho se debe al mayor conocimiento y concienciación social sobre el melanoma en la población, lo que conlleva un mayor número de detecciones y diagnósticos tempranos de la enfermedad. Gracias al diagnóstico precoz en estadios muy iniciales de la enfermedad, el número de muertes por melanoma no aumenta en la misma medida que los diagnósticos.

Actualmente se diagnostican unos 200.000 casos de melanoma al año en todo el mundo. En Europa se diagnostican 88.000 casos de melanoma al año, encontrándose la máxima incidencia en Suiza (Lamberg, 2002). En España se diagnostican unos 3.600 casos anuales (Asociación Española Contra el Cáncer, AECC). Se registran casos prácticamente a cualquier edad, pero el rango que mayor número de casos abarca es el comprendido entre los 40 y 70 años. Al igual que en el resto de Europa, en España es un tumor más frecuente entre las mujeres que entre los hombres. En el País Vasco, entre 1986 y 2006, según el Registro del Cáncer, las tasas de incidencia pasaron de 3,1 a 8,9 por cada 100.000 hombres y de 4,6 a 10,7 por cada 100.000 mujeres. La tasa de mortalidad ha aumentado en los hombres con un promedio anual de 2,8%, mientras que no se ha producido un cambio significativo en las mujeres (Figura 4).

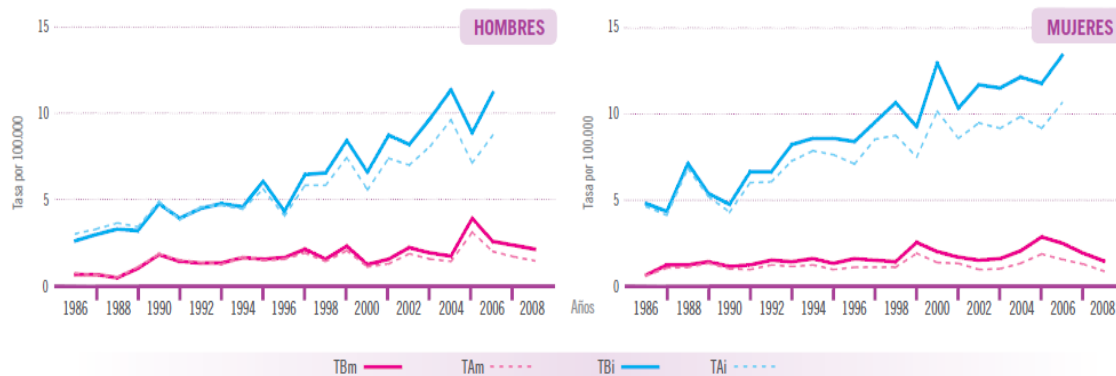


Figura 4. Evolución de la incidencia y mortalidad del melanoma cutáneo por sexo y año en la Comunidad Autónoma del País Vasco. TBm: Tasa Bruta de mortalidad por 100.000 habitantes, TAm: Tasa Ajustada con la población europea de mortalidad por 100.000, TBi: Tasa Bruta de incidencia por 100.000 habitantes, TAi: Tasa Ajustada con la población europea de incidencia por 100.000. (Departamento de Sanidad y Consumo. Gobierno Vasco. 2010).

Afortunadamente, la supervivencia de los pacientes con melanoma ha aumentado en ambos sexos, aunque con un incremento mayor en los hombres, en los que la supervivencia relativa a cinco años ha pasado del 61,5% en el periodo 1986-1989 al 78,9% en el periodo 2000-2004. En las mujeres el incremento de la supervivencia ha sido menor, del 81,7% al 90,8% para los mismos periodos (Figura 5). No obstante, la supervivencia depende en gran medida del estadiaje del tumor en el momento del diagnóstico. La supervivencia media a los cinco años en estadio I es superior al 90%; en estadio II se sitúa entre el 45-80%; en estadio III se sitúa entre el 25-70%; y en el estadio IV los valores bajan hasta entre el 6,7-18,8% (Rogers y Braun, 2002; Balch y cols., 2001).



Figura 5. Evolución de la supervivencia (%) a los cinco años del melanoma cutáneo por sexo en la Comunidad Autónoma del País Vasco (1986-2004). Supervivencia observada y Supervivencia relativa. (Departamento de Sanidad y Consumo. Gobierno Vasco. 2010).

1.4. Etiología

La etiología del melanoma, como en la mayoría de tumores, sigue siendo en gran parte desconocida. El melanoma se produce como resultado de complejas interacciones de factores genéticos y ambientales. El riesgo individual para el desarrollo de la enfermedad está determinado por factores dependientes del individuo y por factores exógenos que se pasan a describir a continuación.

1.4.1. Factores dependientes del individuo

- **Edad:** el riesgo de desarrollar melanoma aumenta con la edad. La edad promedio de diagnóstico son 57 años. Este tumor se desarrolla típicamente en adultos; sin embargo, la incidencia está aumentando en individuos jóvenes.
- **Sexo:** el melanoma es un tumor que aparece más en mujeres que en hombres, siendo la proporción 2:1. Sin embargo, las estadísticas que incluyen el sexo señalan mayor supervivencia en las mujeres. Esto se atribuye a la localización del tumor primario, ya que en las mujeres es más frecuente que se desarrolle en zonas de bajo riesgo.

- Fototipo cutáneo: el riesgo de desarrollar melanoma guarda relación con los fototipos bajos, es decir, personas de piel blanca, ojos claros, pelo rubio o rojizo y abundantes pecas. La frecuencia de melanoma es mayor cuando estas personas se exponen intermitentemente a una intensa radiación solar (Kanavy y Gerstenblith, 2011). En las personas de piel negra la enfermedad suele tener peor diagnóstico, ya que cuando es detectado el estadio suele ser más avanzado y por lo tanto la supervivencia se ve comprometida.
- Factores genéticos: el 90-95 % de casos de melanoma son esporádicos, aunque un pequeño porcentaje tiene un componente hereditario. En los casos hereditarios, lo que se transmite es un aumento en el riesgo de desarrollar la enfermedad.
- Presencia de *nevus*: la existencia de un número elevado de *nevus* pigmentocelulares se correlaciona con una mayor probabilidad de padecer melanoma, especialmente si estos *nevi* son atípicos.
- Existencia previa de un melanoma: el riesgo relativo a desarrollar un segundo melanoma es 70 veces superior al de desarrollar un primer melanoma.
- Inmunosupresión: los pacientes con inmunodeficiencias o con tratamientos inmunosupresores presentan un riesgo mayor de desarrollar melanoma (Sullivan y cols., 2012).

1.4.2. Factores exógenos al individuo

- Radiación solar (UV): actualmente se considera que la exposición a la radiación ultravioleta es uno de los principales factores etiológicos del melanoma. La radiación ultravioleta es un factor de riesgo para el desarrollo de melanoma, ya que produce roturas cromosómicas y alteraciones en la estructura del ADN celular que favorece la

transformación maligna (Kovalyshyn y cols., 2009; Volkovova y cols., 2012).

- Factores químicos: existe una asociación positiva entre el desarrollo de melanoma y la administración de fármacos como el clomifeno, la gonadotropina coriónica humana, la levadopa y los beta-bloqueantes (Siple y cols., 2000; Young y cols., 2001). También la exposición a ciertos compuestos químicos como bifenilos policlorados (PCB) y cloruro de polivinilo (PVC) se ha asociado a la aparición de melanoma (Balch y cols., 1998).

1.5. Diagnóstico y estadiaje

El diagnóstico clínico de melanoma se basa en el reconocimiento de las características clínicas de las formas de melanoma, es decir, la observación de una lesión pigmentada. El mejor método para prevenir la enfermedad metastática es el diagnóstico en las fases iniciales con el fin de eliminar rápidamente el tumor primario, ya que el melanoma localizado únicamente en la epidermis presenta una curación próxima al 100%.

La utilización sistemática de los criterios clínicos resumidos en el acróstico ABCD descrito por Friedman en 1985 es útil para discriminar entre las lesiones benignas y aquellas sobre las que existe un grado de sospecha (Friedman y Rigel, 1985). Este método se basa en el análisis de las siguientes características: Asimetría de la lesión pigmentada (A), Bordes irregulares (B), Color heterogéneo (C), Diámetro de la lesión pigmentada (D) (Figura 6).

En los últimos años se ha sugerido ampliar el acróstico de ABCD a ABCDE, añadiendo la E por *evolving*, cuya correcta traducción sería la evolución o transformación y hace referencia a los cambios de tamaño, la forma o el color, los síntomas o la superficie (Abbasi y cols., 2005).

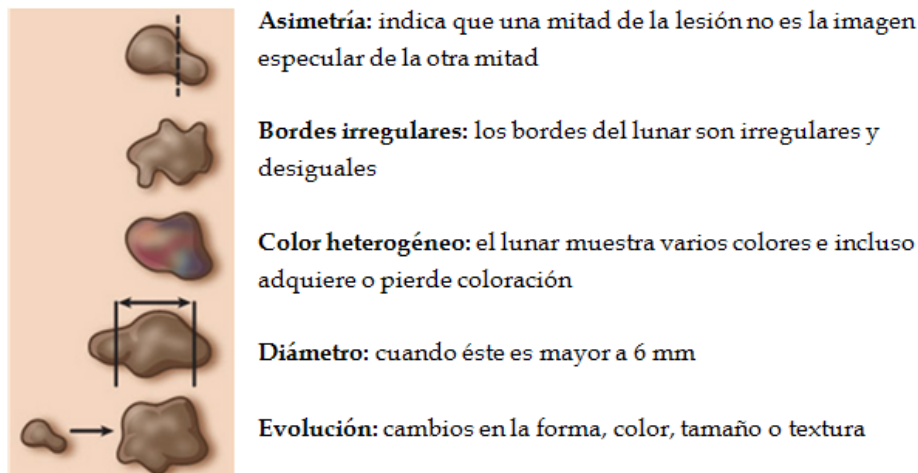


Figura 6. Criterios clínicos de diagnóstico del melanoma (ABCDE) (adaptado de <http://www.headandneckcancerguide.org>).

Estos criterios en ocasiones no son suficientes, lo que ha llevado a la búsqueda de nuevos criterios de diagnóstico. Actualmente, los principales parámetros histológicos que permiten valorar el diagnóstico y estimar el riesgo de la lesión son los denominados niveles de invasión de Clark y las medidas de grosor tumoral de Breslow (Clark y cols., 1969; Breslow, 1980).

Clark describió dos fases en el desarrollo del melanoma: fase radial y fase vertical. El crecimiento radial es superficial, con escasa capacidad de metastatizar y curable mediante cirugía, mientras que el crecimiento vertical comprende la proliferación y propagación de las células tumorales hacia la dermis y/o la hipodermis. Los niveles de invasión definidos por Clark reflejan el grado de profundidad y la penetración de las células tumorales en las estructuras de la piel (Figura 7).

El método Breslow mide el grosor de la lesión en milímetros desde la parte más superficial de la capa granular de la epidermis hasta el lugar donde se localiza la célula más profunda del tumor. Ésta es una técnica reproducible y se correlaciona adecuadamente con el pronóstico y el riesgo de desarrollar metástasis.

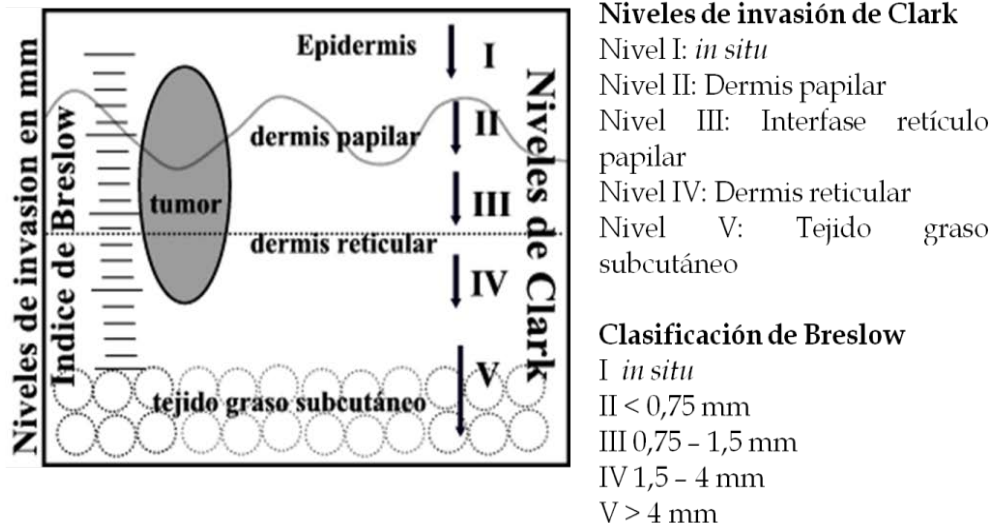


Figura 7. Niveles de invasión de Clark e índice de Breslow. Niveles de invasión de Clark basados en la invasión tumoral de los tejidos e índice de Breslow basado en la medición milimétrica de la profundidad del tumor (imagen original del Dr. Alegre de Miguel, Universidad de Valencia).

Los criterios para la clasificación del melanoma maligno se han modificado en gran medida a lo largo de los años. Al igual que en la mayoría de neoplasias malignas, el personal sanitario utiliza el sistema del tumor, nódulo linfático y metástasis (TMN) desarrollado por la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) para establecer las etapas de la mayoría de los cánceres (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación TNM según AJCC. 8ª Edición, 2009.

Tumor primario (T)	
Tx	El tumor no puede ser evaluado
T0	Sin evidencia del tumor primario
Tis	Melanoma <i>in situ</i>
T1	≤1,0 mm a) sin ulceración y mitosis <1/mm ² b) con ulceración o mitosis ≥1/mm ²
T2	1,01 - 2,0 mm a) sin ulceración b) con ulceración
T3	2,01 - 4,0 mm a) sin ulceración b) con ulceración
T4	>4,0 mm a) sin ulceración b) con ulceración

Ganglio linfático regional (N)	
Nx	Los ganglios linfáticos regionales no pueden evaluarse
N0	Ganglios regionales negativos
N1	1 ganglio linfático afectado a) micrometástasis b) macrometástasis
N2	2 - 3 ganglio linfáticos afectados a) micrometástasis b) macrometástasis c) metástasis en tránsito o lesiones satélites
N3	4 o más ganglios afectados

Metástasis a distancia (M)	
M0	Ausencia de metástasis a distancia
Mx	Metástasis no evaluables
M1a	Metástasis cutáneas, subcutáneas o ganglionares a distancia. Lactato deshidrogenasa (LDH) normal
M1b	Metástasis pulmonares. LDH normal
M1c	Metástasis en otras vísceras con LDH normal o metástasis a distancia con LDH elevada

Este sistema se basa en la evaluación de tres componentes: la extensión del tumor primario, la ausencia o presencia de afectación neoplásica de ganglios linfáticos regionales y la ausencia o presencia de metástasis a distancia. El estudio de la extensión del melanoma primario (T) se basa en la medida en milímetros de su espesor, además de la presencia o ausencia de ulceración. El siguiente parámetro es el ganglio centinela, que es el primer ganglio linfático regional (N) que recibe la linfa de la zona donde se localiza el tumor primario. Si el ganglio centinela es positivo, significa que presenta metástasis que pueden ser microscópicas o macroscópicas. Además, también se diferencia entre lesiones satélite, que hace referencia a la presencia de agrupaciones de células tumorales de más de 0,05 mm de tamaño en la misma sección histológica que el tumor primario, y metástasis en tránsito, que son lesiones neoplásicas a más de 3 cm del tumor primario pero que no han llegado al ganglio linfático de drenaje. El último parámetro se determina con la presencia y localización de metástasis a distancia (M), e incluye también los niveles séricos de lactato deshidrogenasa (LDH) (Balch y cols., 2001).

La combinación de las diferentes categorías TNM dio lugar al sistema de estadiaje AJCC en el año 2009, donde la incorporación de datos de mapeo linfático con la biopsia del ganglio centinela y la enfermedad micrometastática permiten categorizar a los pacientes en estadios tanto clínicos como patológicos (Sabel y cols., 2000; Balch y cols., 2009) (Tabla 2).

El estadiaje clínico incluye el microestadiaje del melanoma primario y la valoración clínica y radiológica de la presencia de metástasis. El estadiaje anatómo-patológico incluye el microestadiaje del melanoma primario y la información patológica de los ganglios linfáticos regionales tras la linfadenectomía parcial o completa. Los pacientes con el estadio 0 ó IA no requieren estudio patológico de los ganglios linfáticos.

Tabla 2. Sistema de estadiaje AJCC 2009.

Estadiaje Clínico				Estadiaje Patológico			
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
III	Cualquier T	≥N1	M0	IIIA	T1-4a	N1a	M0
					T1-4a	N2a	M0
				IIIB	T1-4b	N1a	M0
					T1-4b	N2a	M0
					T1-4a	N1b	M0
					T1-4a	N2b	M0
					T1-4a	N2c	M0
				IIIC	T1-4b	N1b	M0
					T1-4b	N2b	M0
					T1-4b	N2c	M0
	Cualquier T	N3	M0				
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1	IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

1.6. Tipos de melanoma

Clásicamente se describen 4 formas clínico-patológicas de melanoma cutáneo en relación a su localización anatómica y a su evolución (Figura 8).

1.6.1. Melanoma de extensión superficial (MES)

El melanoma de extensión superficial es la forma más frecuente en la población caucasoide y representa el 70% de los casos de melanoma. El MES es una lesión plana, asimétrica e hiperocrómica que se diagnostica en pacientes con edades comprendidas entre 30 y 50 años. Se asocia a exposición solar intermitente y se localiza indistintamente en cualquier parte del cuerpo, siendo más frecuente en el torso de los hombres y en las extremidades inferiores de las mujeres. La lesión clínica suele presentarse como una lesión pigmentada, de más de 5 mm de diámetro, de color marrón oscura, negra o heterocroma.

1.6.2. Melanoma nodular (MN)

El melanoma nodular es la segunda forma de melanoma en cuanto a frecuencia en la población y comprende entre el 10 y el 30% de los casos. Los pacientes diagnosticados suelen tener entre 40 y 60 años. Clínicamente la lesión se manifiesta como una lesión papulo-nodular pigmentada con un crecimiento rápido y con tendencia a ulceración. El crecimiento rápido hacia la profundidad de la dermis la identifica como la forma más agresiva y con mayor capacidad metastática.

1.6.3. Lentigo maligno de melanoma (LMM)

Esta forma de melanoma representa el 10 o 15% de los melanomas. Normalmente aparece en pacientes de edades avanzadas, ya que este tipo de melanoma se asocia a largos periodos de exposición solar. Las lesiones de LMM se localizan principalmente en áreas expuestas, especialmente en cabeza y cuello. La lesión inicial es una mácula asimétrica de color pardo con crecimiento radial lento y bordes irregulares, la cual se va oscureciendo a lo largo de la evolución. Generalmente, tras su extirpación quirúrgica completa, la supervivencia es larga y libre de metástasis.

1.6.4. Melanoma lentiginoso acral (MLA)

El melanoma lentiginoso acral es el menos frecuente en la población caucasoide, representando un 2-8% de los melanomas; sin embargo, es la forma más frecuente en personas de raza negra o asiática (Clarks y cols., 1986). Esta forma de melanoma es más frecuente en individuos a partir de 65 años. El MLA se localiza especialmente en palmas de las manos y plantas de los pies, así como en mucosas y en las uniones mucocutáneas oral y genital. Las lesiones muestran bordes irregulares, ulceración de forma frecuente y un diámetro que oscila entre 2 y 3 cm en el momento del diagnóstico.



Figura 8. Fotografías de los tipos de melanoma cutáneo más comunes. MES: Melanoma de Extensión Superficial, MN: Melanoma Nodular, LMM: Lentigo Maligno melanoma, MLA: Melanoma Lentiginoso Acral (www.dermis.net).

Asimismo, existen formas menos frecuentes de melanoma como melanoma spitzoide, melanoma de células pequeñas, *nevus* azul marino, melanoma desmoplásico, melanomas oculares (conjuntivales o uveales), mucosos y sarcoma de células claras entre otros, que únicamente mencionamos por tratarse de tipos histológicos mucho menos frecuentes que los anteriormente descritos (Barnhill y Gupta, 2009).

1.7. Alteraciones genéticas asociadas a melanoma

El melanoma es una enfermedad poligénica multifactorial en la que intervienen factores ambientales que actúan sobre una predisposición o susceptibilidad genética (Bertolotto, 2013). La predisposición genética a padecer la enfermedad se explica en gran medida por la existencia de mutaciones germinales, que se transmiten de generación en generación, a diferencia de las mutaciones somáticas, que se adquieren con posterioridad al nacimiento y no se heredan. Actualmente se conocen más de 600 genes, relacionados directa o indirectamente con la patogenia del melanoma, que interactúan de manera compleja y que intervienen en el desarrollo tumoral (Hocker y cols., 2008).

En la tabla 3 se muestran los principales genes asociados a la génesis y progresión del melanoma. De forma general, existen dos tipos de mutaciones: las mutaciones germinales y las mutaciones somáticas.

Tabla 3. Características de los principales genes involucrados en la génesis y progresión del melanoma (adaptado de González, 2010).

Gen	Funciones	Características
<i>CDKN2A</i>	Regula la apoptosis y el ciclo celular. Actúa a través de p53 y Rb	Mutación germinal. Mayor gen de susceptibilidad al melanoma. Alta penetrancia. Riesgo alto para melanoma
<i>CDK4</i>	Oncogén. Actúa a través de Rb	Mutación germinal. Riesgo alto para melanoma
<i>MCR1</i>	Regula la melanogénesis y la proliferación del melanocito	Mutación germinal. Gen de baja penetrancia. Riesgo bajo a moderado para melanoma
<i>RAF/RAS</i>	Vía señalización MAPK. Activan proliferación, supervivencia e invasión celular	Mutación somática. B-RAF: mutado 20-80% melanomas RAS: mutado 25-50% melanomas
<i>PTEN</i>	Gen supresor tumoral. Inhibe PI3K/AKT. Inhibe proliferación celular y estimula apoptosis	Mutación somática. Mutado en 15-45% melanomas
<i>TP53</i>	Regulación apoptosis	Mutación somática. Mutado en 10% melanomas
Familia <i>BCL-2</i>	Regulación apoptosis	Mutación somática. Componentes pro- y anti-apoptóticos
<i>MITF</i>	Regulación supervivencia y melanogénesis	Mutación somática. Interrelacionado con CDKN2A, CDK2, BCL-2, ERK, B-RAF y otros
<i>cKIT</i>	Protooncogén. Regula la proliferación y apoptosis	Mutación somática. Amplificado/mutado en 20% melanomas

1.7.1. Mutaciones germinales asociadas a melanoma

El melanoma mayoritariamente se presenta como casos esporádicos; sin embargo, existe un porcentaje entre 5 y 10% de casos denominados melanoma familiar con un claro componente hereditario. En el melanoma familiar se ha demostrado la existencia de un patrón de herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta. Esta susceptibilidad a melanoma se expresa con la presencia de múltiples casos de melanomas en familiares de primer o segundo grado, habitualmente asociado a múltiples *nevus* o *nevus* displásicos. Mediante estudios citogenéticos, moleculares y de ligamiento se han identificado dos genes de alta penetrancia, *CDKN2A* y *CDK4*, y algunos genes de baja o media penetrancia, como el gen *MCR1* (Thompson y cols., 2009; Tsao y cols., 2012).

Respecto a los genes de alta penetrancia, el primer gen asociado a melanoma familiar fue el gen *CDKN2A* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 24*), que es el mayor gen de susceptibilidad al melanoma, y posteriormente se identificaron mutaciones en el gen *CDK4* (*Cyclin-dependent kinase 4*). La frecuencia de mutaciones en ambos genes es baja en la población general, pero cuando aparecen el patrón de herencia es mendeliano, y confieren un riesgo muy elevado a padecer melanoma.

Las mutaciones en los genes de baja penetrancia se asocian a riesgos menores de desarrollar melanoma, pero al detectarse con mayor frecuencia en la población, su determinación tiene un mayor impacto en términos de prevención sanitaria y seguimiento de pacientes con riesgo. Este grupo de genes son: *MC1R* (*Melanocortin 1 Receptor*), *ASIP* (*Agouti Signaling Protein*), *OCA2* (*Oculocutaneous albinism II*), *HERC2* (*HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2*), *TYR* (*Tyrosinase*), *TYRP1* (*Tyrosinase-related protein 1*) y *SLC45A2* (*Melanoma antigen AIM1*).

1.7.2. Mutaciones somáticas asociadas a melanoma

Como prácticamente en todos los tumores malignos, durante el desarrollo del melanoma tiene lugar una acumulación progresiva de anomalías en el ADN que genera inestabilidad genética, que finalmente conduce a la transformación maligna. Muchas de las mutaciones somáticas asociadas a melanoma provocan alteraciones en rutas de señalización como la ruta de señalización de las MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) o PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase) (Figura 9). A continuación describiremos las mutaciones que actualmente tienen mayor relevancia.

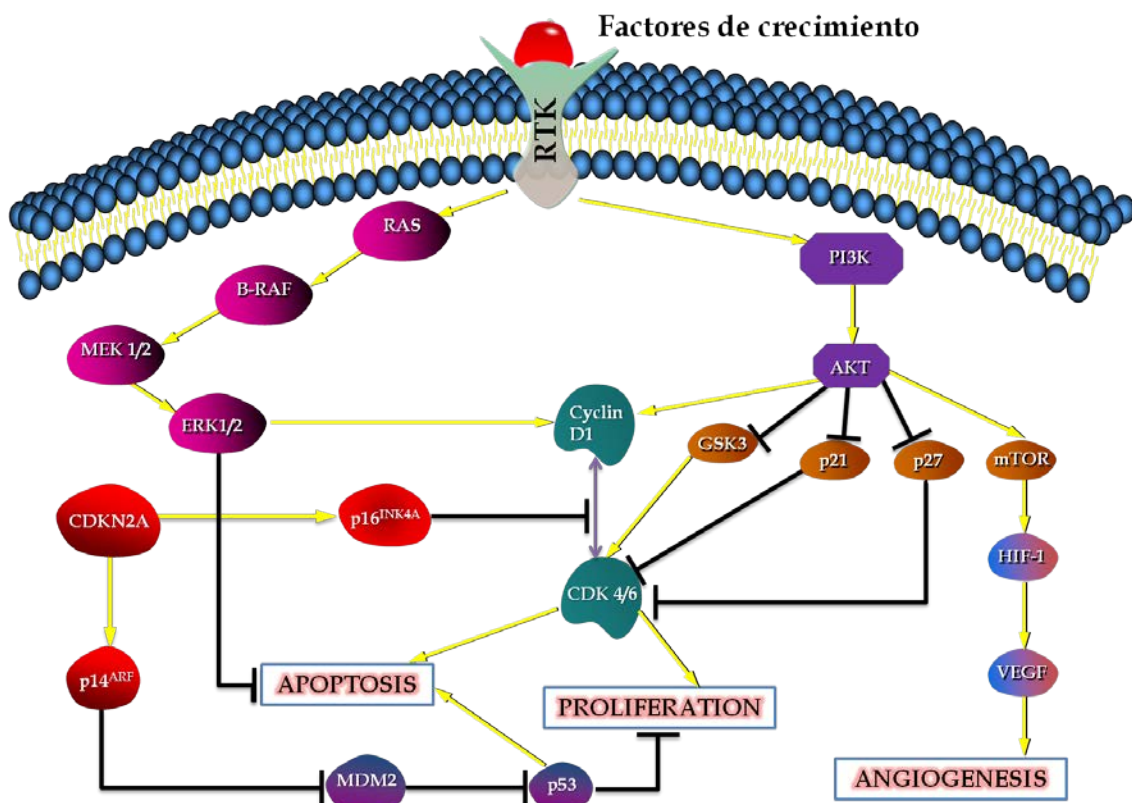


Figura 9. Vías de señalización implicadas en el desarrollo del melanoma (adaptado de Regard, 2013).

La vía MAPK es el centro de numerosos estudios desde que se describió su frecuente sobreactivación en el melanoma maligno y además incluye NRAS-B-RAF-MEK (*Mitogen-activated kinases*) y ERK (*Extracellular-related kinases*) (Meyer y cols., 2003; Meier y cols., 2005; Yajima y cols., 2012). La vía MAPK interviene en la proliferación, supervivencia e invasión celular, y existen mutaciones en distintos componentes de la vía, principalmente en los miembros de la familia RAS, muy asociados al melanoma. Dentro de esta familia de proteínas, NRAS se encuentra alterado en el 95% de los melanomas familiares y el 26% de los casos de melanoma esporádico (Hocker y Tsao, 2007). El gen *RAF*, un protooncogén, genera 3 isoformas: A-RAF, B-RAF y C-RAF. De las tres isoformas, B-RAF es el más potente activador de MEK y es el oncogén más frecuentemente mutado en cáncer, incluyendo al melanoma. La mutación somática más frecuente en B-RAF es la denominada V600E, que se presenta en un 90% de los melanomas (Russo y cols., 2009).

La ruta PI3K es otra de las vías de señalización comúnmente alterada en los tumores humanos. Se ha observado un incremento de la expresión de PI3K y de AKT durante la progresión desde *nevus* benigno a melanoma temprano, aumento que es significativamente mayor en casos de melanoma metastático (Davies, 2012). Aunque las mutaciones en PI3K son poco comunes (aproximadamente en 1% de melanomas) se han descrito mutaciones en otros componentes de la ruta como AKT, que parece tener un papel importante en la progresión tumoral, o como PTEN, que aproximadamente entre el 30 y 50% de los melanomas presentan mutaciones o pérdidas alélicas del gen (Dai y cols., 2005; Fecher y cols., 2007; Hocker y cols., 2008).

1.8. Tratamiento del melanoma

El tratamiento del melanoma está condicionado por el tipo y el estadio del tumor, además de por otros factores como el estado de salud y la edad del paciente. El diagnóstico precoz es esencial para la curación del melanoma, ya que no existen tratamientos efectivos para el melanoma metastático. Actualmente existen cuatro tipos de tratamiento que pueden utilizarse de forma combinada: cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia.

1.8.1. Tratamiento quirúrgico del melanoma primario

La cirugía es el tratamiento más común del melanoma primario. Establecido el diagnóstico de melanoma primario y el nivel de invasión (índice de Breslow), se planifica la exéresis completa de la lesión tumoral hasta la fascia muscular adyacente y una parte del tejido sano que hay a su alrededor para evitar que el cáncer se reproduzca en caso de que haya invadido otras zonas cercanas. Los márgenes de resección apropiados deben estar en relación con el grosor tumoral (Tabla 4) (Veronesi y cols., 1988; Balch y cols., 2001).

Tabla 4. Márgenes quirúrgicos para la exéresis del melanoma primario en relación al espesor tumoral (tomado de *Cancer of the skin, 2nd Edition*, 2011).

Espesor tumoral	Margen de resección (cm)
<i>In situ</i>	0,5-1
≤ 1 mm	1
1 - 2 mm	2
2-4 mm	2
≥ 4 mm	2 - 3

Cuando el melanoma se diagnostica precozmente, es decir, no ha sobrepasado la fase de crecimiento radial, la escisión quirúrgica permite la curación. Sin embargo, cuando el melanoma ha alcanzado la fase de crecimiento vertical, es decir, que el tumor tiene capacidad metastática, el tratamiento con cirugía no es tan eficaz y han de combinarse varios tratamientos.

1.8.2. Biopsia del ganglio centinela

La evolución clínica del melanoma se caracteriza por su tendencia a metastatizar. En caso de tener lugar, las primeras metástasis en aparecer suelen ser las metástasis linfáticas, bien alrededor del tumor inicial (satelitosis), en el trayecto entre el tumor y los ganglios regionales (metástasis en tránsito), o en los ganglios linfáticos regionales (metástasis ganglionares), apareciendo en último lugar metástasis generalizadas a través de dispersión vía hemática.

La presencia o no de metástasis linfáticas regionales en los pacientes con melanoma tiene un valor pronóstico en relación a la supervivencia. Si existen metástasis linfáticas, la supervivencia a los 5 años se reduce a un 30-50%. La técnica conocida como Biopsia del Ganglio Centinela (BGC) permite diferenciar aquellos pacientes con afectación ganglionar. Esta técnica desarrollada por Morton se basa en el concepto de que un ganglio denominado centinela sería el primer ganglio en recibir el drenaje linfático de un tumor y sería el primero en mostrar metástasis (Morton y cols., 1992). Mediante el uso de colorantes o isótopos inyectados en la zona del tumor primario, se puede localizar dicho ganglio y estudiarlo histológicamente, lo que permite identificar aquellos pacientes en los que existen metástasis linfáticas clínicamente ocultas (Figura 10). La BGC requiere de un equipo multidisciplinar formado por cirujanos, médicos nucleares y patólogos. En manos expertas se identifican un 95% de los

ganglios centinelas con menos de un 5% de falsos positivos (Balch y Gershenwald, 2014).

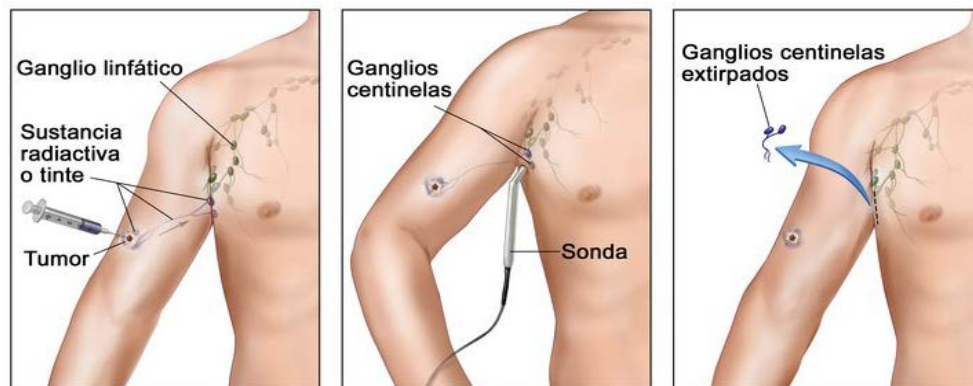


Figura 10. Representación del estudio del ganglio centinela (tomado de Terese Winslow, 2008).

1.8.3. Radioterapia

El melanoma maligno se ha considerado como relativamente radorresistente. Sin embargo, algunos estudios sugieren que en este tipo de cáncer la dosis total administrada sería menos importante que el hecho de administrar una dosis alta en cada sesión (Ang y Ballo, 2003).

Actualmente, el papel de la radioterapia se limita al tratamiento paliativo de metástasis óseas y cerebrales de melanoma, a los casos de compresión medular, y a aquellos casos en los que haya mal control de la enfermedad cutánea y la cirugía esté contraindicada (Bichakjian y cols., 2011). Sus efectos secundarios son múltiples y dependen tanto de la dosis administrada como del tipo de radiación y de la zona anatómica a irradiar.

1.8.4. Quimioterapia

Clásicamente, el melanoma maligno se ha considerado como un tumor quimiorresistente debido al limitado número de agentes citotóxicos que han demostrado eficacia en esta patología. La administración de quimioterapia se utiliza cuando el melanoma se ha extendido desde el

lugar de origen a otras partes del cuerpo, aunque la media de supervivencia para pacientes con melanoma metastático (estadio IV) es menor de un año.

La quimioterapia con dacarbazina (DTIC) se considera de elección en el melanoma metastático, pese a tener un índice de respuesta muy bajo, de entre el 10 y 20%, con una duración media de la respuesta entre 4 y 6 meses (Tarhini y Agarwala, 2006). Se trata de un agente alquilante que se administra de forma intravenosa y que tiene como efectos secundarios más importante el producir náuseas y vómitos, además de cefalea, cansancio y en ocasiones diarrea.

Hace algunos años se introdujo la temozolamida (TMZ), un fármaco que se puede administrar por vía oral y que da lugar al mismo metabolito activo que la dacarbazina tras su absorción; es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que se utiliza en pacientes con metástasis cerebrales (Algazi y cols., 2010). Muchas otras drogas se han utilizado solas o en combinación con DTIC en melanoma sin que ninguno haya mostrado mayor eficiencia que la DTIC en monoterapia (Tsao y cols., 2004).

1.8.5. Inmunoterapia

La capacidad del melanoma para generar una respuesta inmune efectora, junto a su alta resistencia a la quimioterapia y radioterapia han conducido a la búsqueda de soluciones terapéuticas en la modulación del sistema inmunitario. Existen numerosas evidencias del carácter inmunogénico del melanoma, por ello la inmunoterapia es un tratamiento adyuvante muy utilizado en pacientes con melanoma. En los últimos años, se ha producido un incremento en los ensayos clínicos y se han estudiado múltiples agentes inmunoterapéuticos: vacunas derivadas de las células de melanoma o lisados celulares, transferencia de linfocitos autólogos infiltrantes del tumor pre-estimulados *in vitro*, antígenos de

melanoma como MART-1 o tirosinasa, entre otros (Algazi y cols., 2010; Tronnier y Mitteldorf, 2014).

En la contribución de la inmunoterapia en el tratamiento del melanoma destaca la aprobación por la FDA (*US Food and Drugs Administration*) y por la EMEA (*European Medicines Agency*) de dos anticuerpos monoclonales dirigidos a moléculas inmunomoduladoras tales como ipilimumab para CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4*) y pembrolizumab para PD-1 (*programed death-1*) (Aris y Barrio, 2015). El ipilimumab fue aprobado por ambas agencias en 2011 y el pembrolizumab fue aprobado por la FDA en septiembre de 2014, proporcionando ambas mejoras en el tratamiento de melanomas avanzados y sin tratamiento quirúrgico (Robert y cols., 2014). Por otro lado, las citocinas han demostrado eficacia terapéutica en el tratamiento del melanoma; se están utilizando en clínica el interferón alfa ($IFN\alpha$) y la interleucina 2 (IL-2), aunque su uso sigue siendo controvertido (Jha y cols., 2014).

1.8.6. Terapia dirigida

La identificación de mutaciones en el gen *B-RAF* en un alto porcentaje de los melanomas ha abierto la puerta a la investigación en terapia dirigida. Se han desarrollado múltiples inhibidores de la actividad de B-RAF muy potentes y selectivos entre los que destaca PLX4032 (verumafenib) y GSK2118436 (dabrafenib). PLX4032 es un nuevo inhibidor de tirosina-quinazas con especificidad para B-RAF cuando presenta la mutación V600E (Algazi y cols., 2010). Ensayos clínicos han demostrado la eficacia en la reducción del tumor y una mayor tasa de supervivencia de los pacientes con el tratamiento del melanoma con PLX4032. El tratamiento con GSK2118436 también ha mostrado ser eficaz en los ensayos clínicos (Johnson y cols., 2014). El estudio de Johnson y colaboradores propone, además, que la combinación de inhibidores de B-RAF (dabrafenib) e

inhibidores de MEK (trametinib) parece ser más apropiada, ya que proporciona un beneficio clínico en pacientes con melanoma (Johnson y cols., 2014).

En resumen, en poco más de 5 años, varios fármacos han demostrado una ventaja en la supervivencia para el tratamiento del melanoma. En la actualidad, hay cinco categorías de fármacos aprobados por la FDA (*US Food and Drug Administration*), incluyendo la quimioterapia con dacarbazina, las citoquinas (IL-2 y IFN α), medicamentos de terapia dirigida incluyendo inhibidores de B-RAF (vemurafenib y dabrafenib) e inhibidores de MEK (trametinib), agentes de inmunoterapia anti-CTLA-4 (ipilimumab) o anti-PD1 (pembrolizumab) y la combinación de varios de ellos (dabrafenib y trametinib) (Figura 11) (Ascierto y cols., 2014).

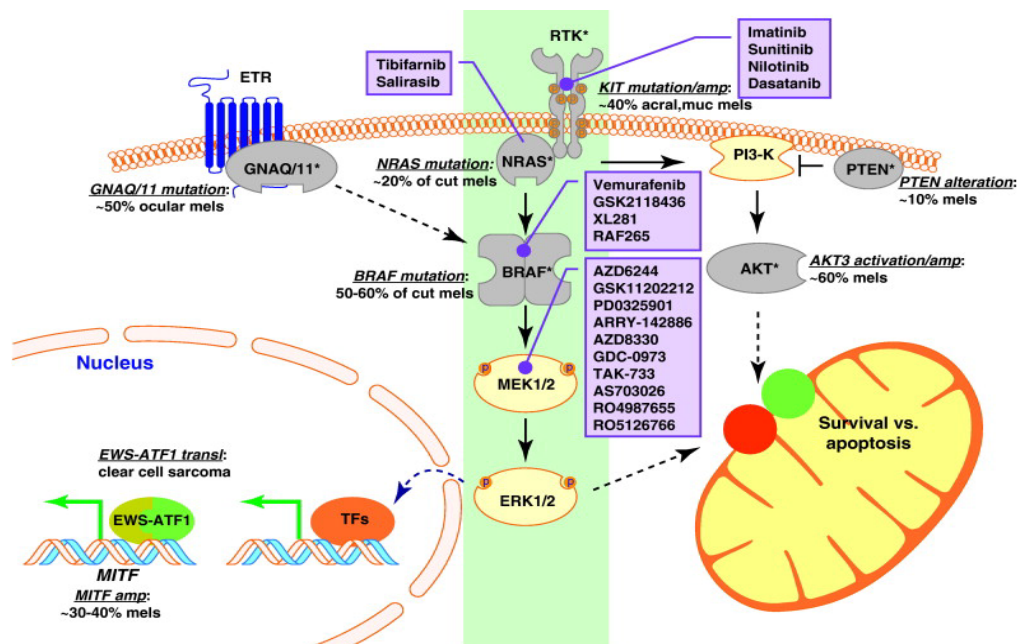


Figura 11. Mutaciones clave del desarrollo de melanoma y sus dianas terapéuticas (tomado de Ji y cols., 2012).

2. Migración celular y desarrollo del potencial invasivo

Las células de melanoma muestran una amplia variedad en las características fenotípicas y conductuales, siendo capaces durante la metástasis de adquirir cambios en las propiedades de la motilidad e invasión (Hoek y cols., 2008). A pesar de ser considerable el conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a la progresión tumoral, existe un conocimiento limitado de los mecanismos que rigen la motilidad y capacidad invasiva de las células de melanoma.

A nivel celular, la capacidad invasiva del melanoma es la combinación de varios mecanismos: la denominada transición epitelio-mesénquima, la pérdida o alteraciones en la adhesión intercelular, la pérdida de adhesión a la matriz extracelular, la degradación de la matriz y la migración celular (Haass y cols., 2014). Todos estos procesos celulares están muy regulados y estrechamente interconectados mediante diversas rutas de señalización como la vía MAPK, PI3K (Figura 12) y Wnt/ β -catenina (Larue y Beermann, 2007).

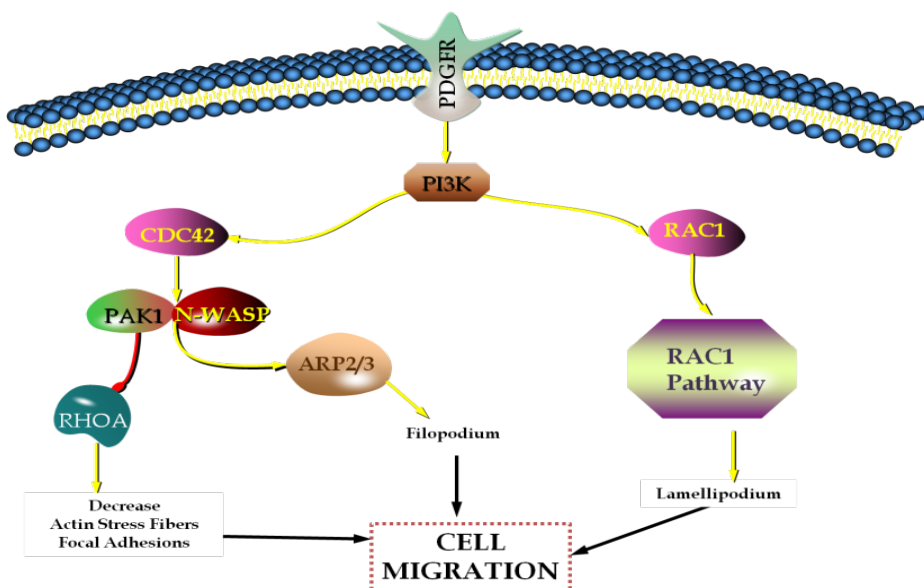


Figura 12. Papel de PI3K en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina y la migración celular (adaptado de BioCarta).

La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un complejo proceso biológico presente durante la embriogénesis, carcinogénesis, metástasis y recurrencia tumoral de los cánceres epiteliales (Li y cols., 2015). En este proceso las células epiteliales, que normalmente interactúan con la membrana basal a través de su superficie basal, pierden sus características epiteliales y adquieren un fenotipo mesenquimal, lo que conduce a un aumento de las propiedades migratorias y e invasivas sobre los tejidos circundantes (Kalluri y Weinberg, 2009; Zaravinos, 2015; Li y cols., 2015). La TEM desempeña un papel clave ya que confiere propiedades metastáticas en múltiples tumores sólidos mediante la alteración de la integridad de las uniones celulares con la disminución de la expresión de proteínas implicadas en la interacción célula-célula, como la E-Cadherina y la γ -Catenina, y con el aumento de expresión de marcadores mesenquimales, tales como Vimentina, N-Cadherina y fibronectina, así como promoviendo la activación de algunas metaloproteasas de matriz y una fuerte reorganización del citoesqueleto de actina (Yilmaz y Christofori, 2009; Nakamura y Tokura, 2011; De Craene y Berx, 2013).

La adquisición de la capacidad de las células tumorales para migrar representa una característica clave en la metástasis del cáncer, pero también la migración celular es fundamental en procesos tan importantes como la embriogénesis y la homeostasis de organismos multicelulares (Eccles y cols., 2013). Estudios recientes sugieren que las células de melanoma readquieren aspectos del programa embrionario en cuanto a la expresión de genes implicados en la migración de células de la cresta neural para facilitar la plasticidad del desarrollo y la metástasis (Bailey y cols., 2012). Es más, numerosos factores implicados en el proceso de diferenciación de los melanocitos también se encuentran implicados en el control de la migración celular.

Una de las características del proteoma de los melanomas más migratorios es la aparición de cambios en la regulación y en la dinámica del citoesqueleto de actina (Maes y cols., 2014). La reorganización del citoesqueleto de actina posee un papel clave en la migración celular y la invasión, ya que los procesos de

polimerización de actina proporcionan la fuerza motriz necesaria para la protrusión de la membrana plasmática de las células que migran (Park y cols., 2012). Este proceso está regulado por los miembros de la familia de Rho GTPasas, por proteínas del síndrome Wiskott-Aldrich (WASP) y por el complejo Arp2/3 (Pollard y Borisy, 2003). Las proteínas de la familia Rho, en particular RAC1 y CDC42, se activan en respuesta a diversos estímulos extracelulares que transmiten a través de las proteínas de la familia WASP hacia el complejo Arp2/3. Por lo tanto, cuando las células reciben estímulos extracelulares, las proteínas WASP activan el complejo Arp2/3 e inducen una polimerización rápida de actina que conduce a la migración celular y a la invasión (Figura 13).

Además de los reguladores de la reorganización del citoesqueleto de actina ampliamente descritos como WASP y RAC1, existen otras moléculas que se relacionan directa o indirectamente con esta regulación. Son muchos los trabajos que vinculan a un GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*), denominado ARHGEF7 o β -PIX con la dinámica de la membrana en el contexto de la migración celular (Frank y Hansen, 2008; Van Buul y cols., 2014). ARHGEF7 destaca por su cooperación en la formación de lamelipodios y por mediar en la dispersión celular a través de la activación de RAC1 (Rosenberger y Kutsche, 2006). Por otro lado, destaca PTK2 β , conocida también como PYK2, que pertenece a la familia de proteínas FAK (*Focal Adhesion Kinase*). Estas proteínas interactúan con RHO, RAC1, CDC42 y también con el complejo N-WASP (Tai y cols., 2015), y múltiples estudios evidencian su control sobre la reorganización del citoesqueleto de actina (Wu y cols., 2004; Yilmaz y Christofori, 2009) y, por consiguiente, con la invasión tumoral (Kornberg, 1998; Steeg, 2006; Li y cols., 2015).

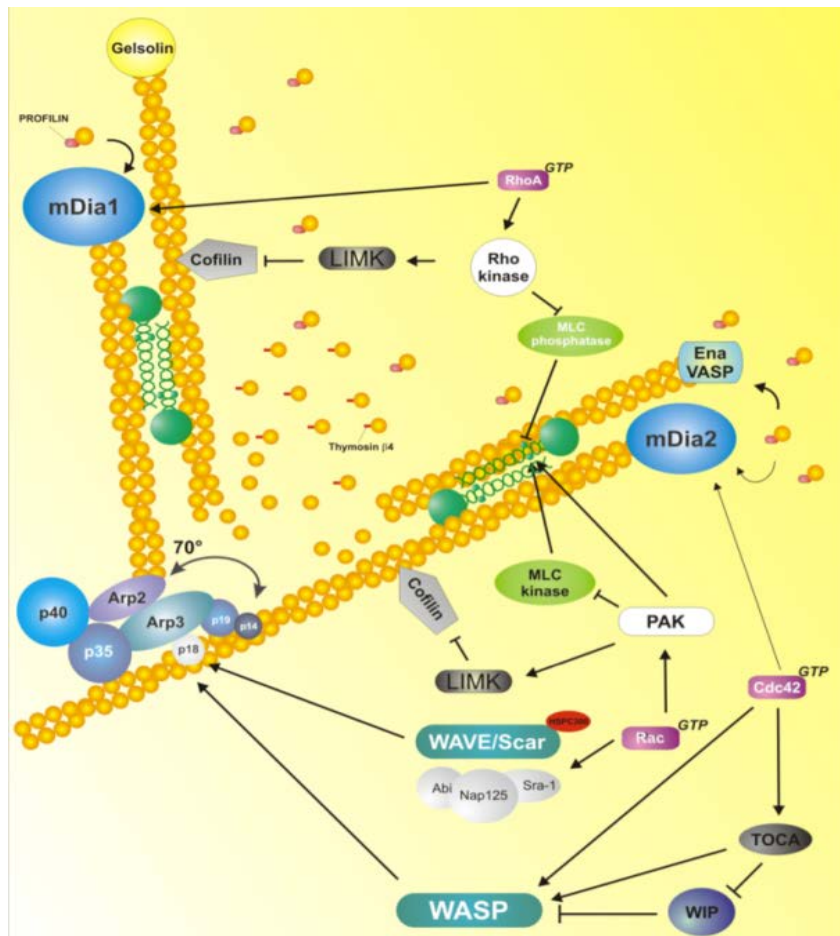


Figura 13. Esquema de los principales mecanismos y moléculas implicadas en la regulación del citoesqueleto de actina (tomado de Vicente-Manzanares y cols., 2005).

Además de cambios en la capacidad migratoria, para que tenga lugar una metástasis, las células de melanoma tienen que modificar su adhesión a la matriz extracelular, sus interacciones con las células del estroma y su capacidad proteolítica para superar las barreras fisiológicas tales como las membranas basales.

La invasión de las células de melanoma tanto a nivel local como a distancia del tumor primario es un proceso complejo y dinámico que depende en gran medida de la expresión de proteasas que degradan la matriz extracelular. La mayoría de estas proteasas pertenecen al sistema del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), a la familia de cisteinproteinasas y, especialmente, a la familia de las metaloproteasas de la matriz (MMP). Las MMP tienen gran importancia ya que son capaces de degradar la práctica

totalidad de los componentes de la matriz extracelular, lo cual es clave en procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario, la reparación de tejidos o la angiogénesis. Del mismo modo, las MMP también intervienen en procesos patológicos como es el caso de la artritis reumatoide, la aterosclerosis, la osteoartritis, la periodontitis, enfermedades neuroinflamatorias y, especialmente, en la invasión tumoral y la metástasis (Amălinei y cols., 2010). Las MMP no sólo se relacionan con la progresión tumoral del melanoma, sino que también con otros tipos de cáncer como el cáncer de esófago (Grobewska y cols., 2012), el cáncer oral (Pereira y cols., 2012) o el cáncer de mama (Radisky y cols., 2010). Pero no sólo las MMP son determinantes en la progresión tumoral; estudios recientes confieren un papel clave al equilibrio entre las MMP y sus inhibidores tisulares (TIMP) (Hofmann y cols., 2000) (Figura 14).

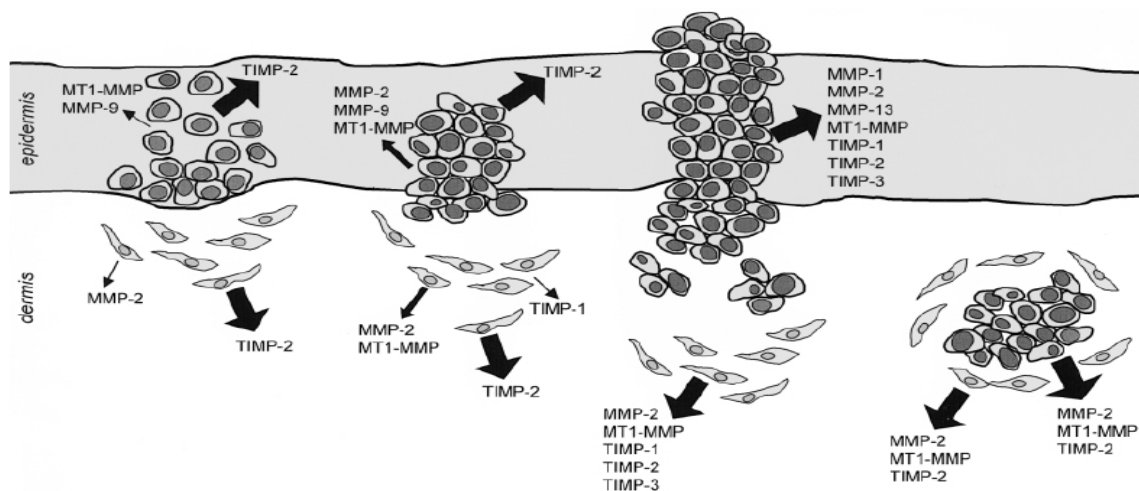


Figura 14. Expresión de MMP y TIMP en la progresión maligna del melanoma (tomada de Hofmann y cols., 2000).

Los TIMP son reguladores endógenos naturales de la actividad proteolítica de las MMP (Benjamin y Khali, 2012). En humanos, esta familia está compuesta por 4 miembros: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 (Murphy, 2011). Actualmente, los TIMP están adquiriendo relevancia en las investigaciones, ya que representan una potencial herramienta de pronóstico y una posible diana terapéutica debido a su implicación en la angiogénesis, en la invasión y metástasis, en la transición epitelio-mesénquima y en la supervivencia celular (Sampieri y cols., 2013).

3. Anexinas

Las anexinas constituyen una superfamilia multigénica de proteínas muy conservadas evolutivamente y caracterizadas por su habilidad para interactuar con las membranas biológicas de un modo dependiente de calcio (Ca^{+2}). Éstas se expresan en todos los organismos, desde protistas hasta eucariotas superiores, incluyendo las plantas (Gerke y Moss, 2002). El nombre de las anexinas se deriva del griego *annex* que significa “mantener unido”, y describe la propiedad principal de la mayoría de miembros de esta familia, es decir, la unión a ciertas estructuras biológicas, en particular, a las membranas.

En 1999, con la ayuda de análisis genómicos comparativos, se estableció, para estas proteínas, un sistema de nomenclatura acorde a su filogenia molecular. De acuerdo al mismo, las anexinas cuyo nombre está seguido de una “A” mayúscula son anexinas humanas y sus ortólogos afines (Tabla 5) (Mussunoor y Murray, 2008).

En los vertebrados las anexinas están compuestas por cuatro dominios homólogos de aproximadamente 70 aminoácidos (excepto la anexina A6, que contiene ocho dominios), generalmente con forma de anillo arqueado sobre un poro hidrofóbico. Estas proteínas interactúan principalmente con los ácidos fosfolipídicos, como puede ser la fosfatidilserina, pero se han encontrado

diferencias en los requerimientos de lípidos y calcio para estas interacciones (Lizarbe y cols., 2013).

Tabla 5. Nomenclatura y caracterización de las anexinas humanas (Mussunoor y Murray, 2008).

Anexina (Sinónimos)	Localización cromosómica	Masa Molecular, kDa
Anexina 1 (lipocortin I, calpactin II)	9q12-q21.2	38,71
Anexina 2 (lipocortin II, calpactin I)	15q21-q22	38,69
Anexina 3 (lipocortin III, placentar anticoagulant protein III)	4q13-q22	36,37
Anexina 4 (lipocortin IV, endonexin I)	2p13	35,88
Anexina 5 (lipocortin V, endonexin II, placentar anticoagulant protein I)	4q28-q32	35,93
Anexina 6 (lipocortin VI, calelectrin)	5q32-q34	75,87
Anexina 7 (synexin)	10q21.1-q21.2	52,73
Anexina 8 (vascular anticoagulant- β)	10q11.22	30,69
Anexina 9 (pemphaxin)	1q21	38,36
Anexina 10 (annexin 14)	4q33	37,27
Anexina 11 (calcyclin-associated Annexin 50)	10q23	54,39
Anexina 13 (Annexin-intestine-specific)	8q24.13	34,46

Las anexinas divergen significativamente, a pesar de su estructura similar, en términos de su regulación génica, los patrones de expresión en los diferentes tejidos, la localización subcelular de las diferentes isoformas y las características propias de subfamilias (Van Heerde y cols., 2004). Estas proteínas están implicadas en un gran número de procesos biológicos, tanto intracelulares como extracelulares, principalmente relacionadas con la capacidad conservada para unirse a las bicapas fosfolipídicas, que incluye procesos tan fundamentales como: transporte en las membranas, exocitosis, endocitosis, interacciones en el anclaje membrana-citoesqueleto, regulación de la dinámica de las proteínas de membrana, migración celular, proliferación, apoptosis, transducción de señales, regulación y actividad de los canales de

iones (Figura 15) (Van Genderen y cols., 2008; Monastyrskaya y cols., 2009). Entre las funciones intracelulares de las anexinas, destaca que varios miembros de esta superfamilia interactúan con el citoesqueleto, principalmente con la actina (Gerke y cols., 2005). Anexina A2 fue la primera anexina en la que se describió una unión de ésta con los filamentos de actina de forma dependiente de Ca^{+2} . Por otro lado, esta anexina posee la capacidad de compactar los filamentos de actina y juega también un papel importante en su polimerización (Hayes y cols., 2004; Morel y cols., 2009). Las interacciones de ANXA5 con la actina también han sido descritas en las plaquetas, donde se presentan como un regulador clave del proceso de coagulación (Tzima y cols., 2000).

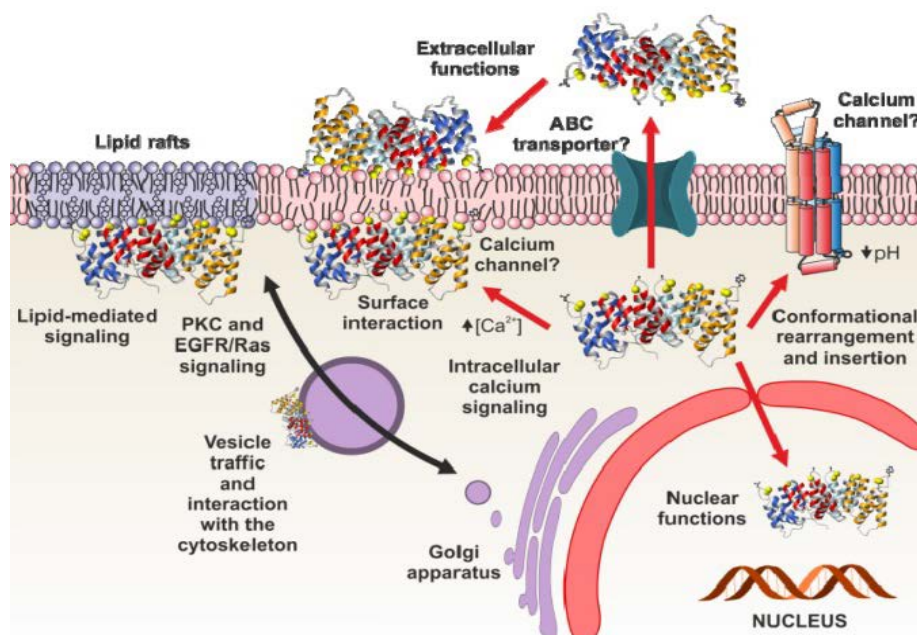


Figura 15. Funciones intracelulares y extracelulares de las anexinas (tomado de Lizarbe y cols., 2013).

Aunque las anexinas son principalmente citosólicas, pueden encontrarse como proteínas extracelulares ejerciendo funciones adicionales como proteínas anticoagulantes y autoinmunes o mediante interacciones con otras proteínas extracelulares (Raynal y Pollard, 1994).

Nuestro interés se centra en la proteína ANXA5, que fue el primer miembro de esta familia cuya estructura se estudió por difracción de rayos X y se obtuvo su cristalización (Huber y cols., 1990; Lewit-Bentley y cols., 1992). Ésta es una fosfolipasa A2, cuyo gen tiene un tamaño de 29 kb compuesto por 13 exones y que codifica un único transcrito de aproximadamente 1,6 kb que da lugar a una proteína con un peso molecular aproximado de 36 kDa. La proteína ANXA5 destaca por poseer la capacidad de unirse con alta afinidad a las membranas que contienen fosfatidilserina (PS), y basándose en esta capacidad se ha usado ampliamente ANXA5 como reactivo para visualizar PS en la superficie de las células apoptóticas (Van Genderen y cols., 2008). Una de las técnicas más comunes y no invasivas para la detección de apoptosis es el uso de ANXA5 marcada fluorescentemente (comercialmente conocida como anexina V). Esta técnica es capaz de discriminar entre células apoptóticas y células necróticas, por lo que es muy útil para la comprensión del proceso de muerte celular en patologías como infartos, apoplejía cerebral, aterosclerosis, así como para la medición de la respuesta a fármacos en pacientes con cáncer (Lizarbe y cols., 2013). De hecho, se han desarrollado derivados radiomarcados de ANXA5 para su uso como herramienta de diagnóstico y como evaluador de tratamientos y terapias (Boersma y cols., 2005; Bauwens y cols., 2011; Demchenko, 2013).

3.1. Anexinas y cáncer

Son muchas las enfermedades en las que sin ser las anexinas la principal causa de éstas, desempeñan un papel importante. Existen evidencias de que las anexinas, a través de cambios de expresión, propiedades o localización, pueden contribuir a la patofisiología de multitud de enfermedades. Varios estudios relacionan los niveles circulantes de anexinas con enfermedades tales como la enfermedad cardíaca, la fibrosis quística y la trombosis (Rand y cols., 2006).

Recientes estudios han destacado que la mayoría de cánceres humanos están asociados con alteraciones significativas en los patrones de expresión de las anexinas (Figura 16) (Mussunoor y Murray, 2008).

Las anexinas participan principalmente alterando la proliferación celular, reprimiendo la apoptosis y promoviendo la invasión de las células tumorales, lo que contribuye a los procesos metastáticos en distintos tipos de cáncer como cáncer de mama, cáncer gástrico, carcinoma de esófago, cáncer de hígado y carcinoma nasofaríngeo (Deng y cols., 2013). En ciertos tejidos tumorales, algunas anexinas se encuentran reprimidas mientras que otras anexinas se pueden encontrar sobreexpresadas.

Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de las anexinas contribuyen a la invasión y la metástasis de las células tumorales, y cada miembro de la familia de anexinas afecta principalmente a un tipo de tumor. Nuestro interés se focaliza en el miembro de la familia ANXA5, cuyas funciones fisiológicas en las células son prácticamente desconocidas, pero los datos publicados hasta la fecha indican un potencial papel en la transducción de señales celulares, en procesos inflamatorios, en el crecimiento y diferenciación celular. En la última década se ha relacionado ANXA5 con una potencial función en la proliferación, la migración y la invasividad de las células tumorales (Wehder y cols., 2009; Hong y cols., 2014; Park y Chung, 2014; Wang y cols., 2014; Wu y cols., 2014).

Sin embargo, la asociación de otras anexinas con el cáncer es más conocida; la anexina A1, por ejemplo, está relacionada con el cáncer de esófago, mientras que anexina A2 está relacionada con el cáncer de mama (Wang y cols., 2006 y Sharma y cols., 2010). Existe también una correlación entre la expresión de anexina A6 y la supresión del crecimiento del melanoma, identificándose una represión de anexina A6 en la transición de un fenotipo no metastático a uno metastático (Francia y cols., 1996). Todos estos datos previos indican que un tipo específico de célula tumoral podría verse afectado por una anexina en

concreto, la cual desempeñaría un papel fundamental en el desarrollo y la progresión tumoral.

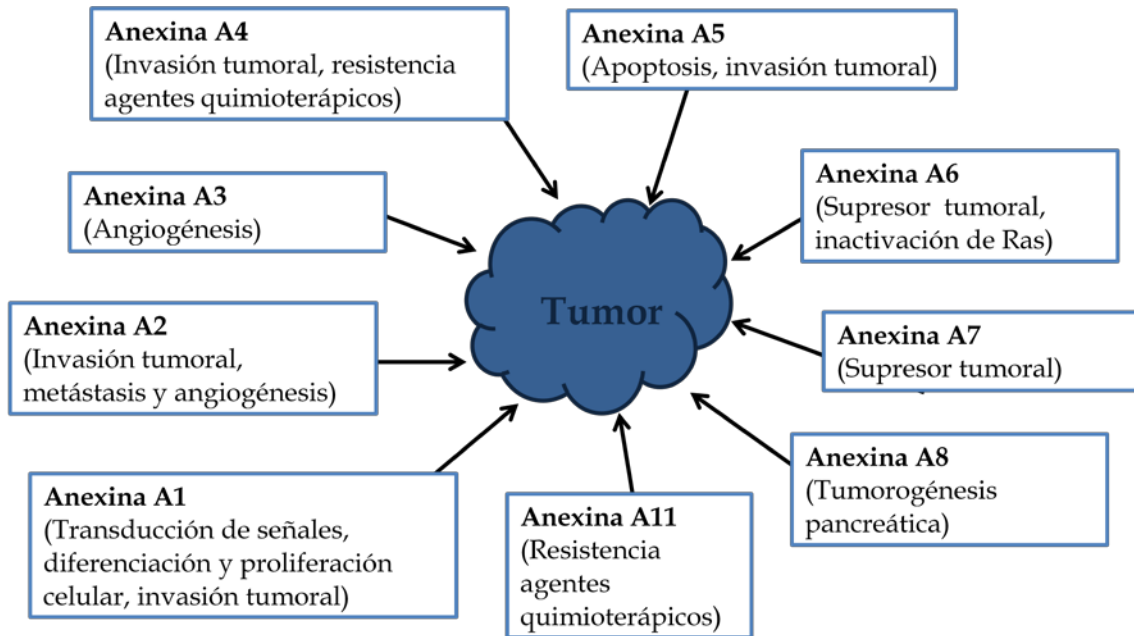


Figura 16. Funciones generales de las anexinas en la génesis tumoral (adaptado de Mussunoor y Murray, 2008).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El melanoma maligno es una neoplasia que se caracteriza por su rápida progresión, mal pronóstico y continuo aumento de incidencia en la población mundial. En los últimos años se están llevando a cabo multitud de estudios con el fin de conocer los mecanismos involucrados en el proceso de metastatización del melanoma, ya éste muestra generalmente resistencia a los tratamientos antitumorales. Así pues, el conocimiento de las proteínas y rutas involucradas en los procesos de migración e invasión de las células de melanoma abriría un abanico de posibles dianas terapéuticas.

Los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio apuntan a la proteína ANXA5 como factor destacable en el desarrollo del melanoma, ya que sus niveles de expresión son variables en diferentes líneas de melanoma humano en función de su habilidad invasiva. Además, nuestros resultados muestran un SNP de la región intrónica del propio gen asociado a la predisposición de padecer la enfermedad (Arroyo-Berdugo y cols., 2014). Estos resultados nos llevaron a buscar más estudios sobre ANXA5 y su implicación en las patologías tumorales, encontrando escasas publicaciones que relacionaran esta proteína con el melanoma.

Todo en conjunto nos llevó a plantear la siguiente hipótesis de partida:

ANXA5 puede desempeñar un papel importante en la progresión maligna del melanoma aumentando la capacidad de las células para migrar e invadir los tejidos circundantes. Además, los niveles séricos de ANXA5 podrían representar un buen marcador pronóstico de mala evolución tumoral.

Objetivos

Por todo lo descrito anteriormente, el objetivo general del presente trabajo ha sido determinar el papel de ANXA5 en líneas celulares de melanoma humano, ya que la acumulación de evidencias indica que esta proteína puede desempeñar funciones clave en el desarrollo del tumor y en la progresión de la enfermedad.

El objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos concretos:

1. Comparar los niveles de expresión de ANXA5 entre diferentes líneas celulares de melanoma humano.
2. Evaluar la relación entre los niveles de expresión de ANXA5 y la capacidad migratoria e invasiva de las líneas celulares de melanoma humano.
3. Estudiar el efecto del silenciamiento de la proteína ANXA5 sobre la capacidad migratoria e invasiva de las células de melanoma humano.
4. Estudiar los efectos del silenciamiento de la proteína ANXA5 sobre genes asociados a la movilidad celular.
5. Analizar los niveles de la proteína ANXA5 en sueros de pacientes diagnosticados de melanoma en diferentes estadios y evolución clínica con el fin de evaluar su importancia como marcador de mal pronóstico.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Líneas celulares

En el presente trabajo se emplearon líneas celulares comerciales de melanoma humano.

- **A375** (ATCC CRL-1619): línea celular de melanoma, obtenida a partir de un tumor maligno de una mujer de 54 años de edad, aislada por Giard (Giard y cols., 1973). Esta línea presenta un cariotipo hiperploide con un número modal de 62 cromosomas, y es capaz de producir tumores subcutáneos amelanocíticos cuando es inoculada en ratones atímicos. Fue adquirida a través del *American Type Culture Collection* (ATCC).
- **COLO-800** (DSM ACC193): línea celular de melanoma aislada por Moore a partir de un nódulo subcutáneo de un tumor de un varón de 14 años de edad (Moore y cols., 1990). Las células muestran un *blebbing* muy marcado y su morfología es fibroblástica. Fue adquirida a través del *Institute DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (DSMZ).
- **HT-144** (ATCC HTB-63): línea celular de melanoma obtenida de una lesión metastásica subcutánea de un hombre caucásico de 29 años, aislada por Fogh (Fogh y cols., 1977). Es una línea celular de melanoma maligno que muestra morfología fibroblástica. Fue adquirida a través de la ATCC.
- **MEL-HO** (DSM ACC62): línea celular de melanoma derivada de un tumor primario de una mujer de edad desconocida, aislada en 1976 por Ziegler-Heitbrock. Su morfología es epitelial y sus cuerpos celulares frecuentemente presentan prolongaciones citoplasmáticas. Fue adquirida a través del DSMZ.

2. Cultivos celulares

Los cultivos de células *in vitro* consisten en un sistema formado por células provenientes de un órgano o un tejido, normal o tumoral, mantenidas en medios de cultivo de composición química definida y adecuada a las necesidades de las células, y en condiciones de temperatura, pH, aireación y humedad controladas. Este sistema permite el estudio del comportamiento de las células y asegura su supervivencia y multiplicación.

2.1. Mantenimiento de las líneas celulares

El primer paso tras la adquisición de una línea celular o tras la puesta en marcha de un cultivo a partir de un *stock* es la descongelación de las células. Los viales de congelación en los que se encuentran las células se atemperan a 37 °C en el menor tiempo posible. Cada vial contiene aproximadamente 1 ml, éste se diluye con 5 ml de medio y la suspensión se centrifuga a 200 x g durante 5 min en una centrifuga (Megafuge 40R, Thermo Scientific). A continuación, se elimina el sobrenadante y el *pellet* se resuspende en 1 ml de medio de cultivo. Este volumen de la suspensión celular se añade a un frasco de cultivo de 25 cm² y se completa con medio y 10% de suero bovino fetal (SBF) hasta un volumen final de 5 ml. Todo el manejo de las células se lleva a cabo en una cabina de flujo laminar (SafeFast Premium, Faster) con el fin de mantener unas condiciones estériles libre de bacterias y levaduras que contaminen el cultivo celular.

Las líneas celulares se mantienen en cultivo en incubadores (HeraCell 150i, Thermo Scientific) en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂ y una temperatura constante de 37 °C. Todas las líneas celulares utilizadas en el estudio son adherentes por lo que el cultivo se lleva a cabo en frascos de cultivo en posición horizontal. Cuando las monocapas celulares recubren toda la superficie del frasco, es decir, alcanzan el estado de confluencia, se disocian con una solución enzimática de Tripsina-EDTA (Lonza, LTD) durante un máximo de 5 minutos a 37

°C. Se comprueba con un microscopio óptico invertido (TS100 Eclipse, Nikon) que las células se hayan despegado, y se inactiva la Tripsina-EDTA añadiendo SBF. Las células se centrifugan durante 5 minutos a 200 x g y se siembran a una determinada concentración celular en medio de cultivo fresco. El número de células a sembrar se ajusta para cada tipo celular y tamaño de frasco de cultivo, con el fin de conseguir el estado de confluencia cada 3 ó 4 días. Cada línea celular presenta unos requerimientos nutricionales diferentes, por lo que cada una requiere unas condiciones de cultivo específicas que se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de cultivo de las líneas celulares utilizadas.

Línea celular	Condiciones de cultivo
A375	Medio DMEM (Sigma-Aldrich) 10% SBF (Lonza) 2 mM L-Glu (Sigma-Aldrich) 100 UI/ml Penincilina (Gibco®) 100 µg/ml Estreptomicina (Gibco®)
HT-144	Medio McCoy's 5 ^a (Gibco®) 2 mM L-Glu (Sigma-Aldrich) 10% SBF (Lonza) 100 UI/ml Penincilina (Gibco®) 100 µg/ml Estreptomicina (Gibco®)
MEL-HO, COLO-800	Medio RPMI 1640 con GlutaMax (Gibco®) 10% SBF (Lonza) 100 UI/ml Penincilina (Gibco®) 100 µg/ml Estreptomicina (Gibco®)

Con el fin de evitar problemas derivados del cultivo ininterrumpido de las líneas celulares, como pueden ser alteraciones genéticas y/o contaminaciones, se mantienen en cultivo durante un periodo limitado de pases (2 meses, aproximadamente 20 pases). Tras este periodo se retiran y se sustituyen por células nuevas. Por ello se mantiene un *stock* de células congeladas que nos permiten reponer la línea celular en cualquier momento que lo necesitemos.

La congelación de células requiere que éstas se encuentren en fase de crecimiento exponencial. Se disgregan las células y se centrifugan a 200 x g durante 5 minutos a 4 °C. El *pellet* celular se resuspende a una concentración de 2-4 x 10⁶ células/ml

en SBF con dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) al 10%. Los viales con 1 ml de la suspensión celular se congelan gradualmente con la ayuda de un contenedor de viales (Mr. Frosty, Thermo Scientific) que contiene isopropanol; éste enfría los viales a razón de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ hasta alcanzar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por último se almacenan en nitrógeno líquido donde se mantienen a $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2. Viabilidad y recuento celular

En todos los casos, antes de la realización de experimentos, se lleva a cabo el recuento y la determinación de la proporción de células vivas. Para ello se utiliza una cámara de recuento Burker (Blaubrand) y el colorante azul tripán (Sigma-Aldrich). El azul tripán es un colorante vital que solo tiñe las células muertas, porque es capaz de atravesar las membranas rotas, de forma que solamente aparecen teñidas las células muertas, mientras que las células vivas no incorporan el colorante. El dato obtenido corresponde a número de células/ml y los experimentos siempre se realizan con una viabilidad celular superior al 95% y siempre que las células se encuentren en fase de crecimiento exponencial.

2.3. Detección de Micoplasma

Los cultivos celulares ocasionalmente se contaminan con bacterias y/u hongos. Estas infecciones de los cultivos son relativamente fáciles de detectar, prevenir y tratar en caso de necesidad, pero la contaminación por Micoplasmas representa un problema mucho mayor en términos de incidencia, detección, prevención, erradicación y efectos. Se estima que entre el 5 y el 35% de los cultivos celulares en uso están infectados por Micoplasmas (Rivera-Tapia y Rodríguez-Preval, 2006).

Los efectos de la contaminación por Micoplasma en las líneas celulares son múltiples y pueden afectar a la velocidad de crecimiento, crear aberraciones cromosómicas, alteraciones en el metabolismo celular y cambios en la viabilidad

celular. Por todo ello, en el laboratorio tenemos establecida una comprobación periódica de los cultivos celulares.

Los métodos para detectar la contaminación por *Mycoplasma* incluyen el cultivo microbiológico, técnicas de microscopia, métodos bioquímicos y uso de técnicas de biología molecular. Esta última es la seleccionada por nuestro grupo de investigación ya que posee mayor precisión, es más sensible y el tiempo de realización es menor. Se utilizó el kit *Venor®GeM One Step* (Minerva Biolabs) que mediante PCR (*Polimerase Chain Reaction*) evalúa las muestras para 10 especies distintas de *Mycoplasma*. Finalizada la PCR se comprueban los amplificadores en un gel de agarosa al 2%. La contaminación por *Mycoplasma* se detecta con un amplificador de 267 pb, mientras que una banda de 191 pb es un control interno propio del kit comercial. En caso de detectar contaminación, se procede a la eliminación de la línea celular contaminada y se recurre al *stock* de cultivos celulares para reemplazarla por otro vial sin contaminación de *Mycoplasma*.

3. Estudio de proliferación celular mediante el método colorimétrico XTT

La proliferación celular de los cultivos se determinó mediante el kit estandarizado de XTT (Roche). Este ensayo se basa en la capacidad de las células viables de metabolizar la sal de tetrazolio XTT, de color amarillo, en formazán, de color naranja (absorbancia a 490 nm), en presencia de un reactivo reductor. Puesto que este proceso ocurre exclusivamente en las células viables, es decir metabólicamente activas, la cantidad de formazán dependerá del número de células viables presentes en el cultivo y ésta es fácilmente cuantificable mediante colorimetría. Se sembraron en microplacas de 96 pocillos, a razón de 100 µl de medio de cultivo por pocillo y a una densidad celular de $1,5 \times 10^5$ células/ml. Una vez finalizados los tiempos de incubación, se añadió 50 µl de la mezcla del kit (el reactivo reductor y XTT, en una proporción 1:50), se incubaron las placas durante 4 horas a 37 °C, para finalmente realizar la medida de la absorbancia de cada

pocillo a 490 nm en un lector de placas *Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader* (BioTek Instruments Inc.).

4. Ensayos *in vitro* de migración o cierre de herida

La determinación de la capacidad migratoria de las células se realizó mediante ensayos tipo herida (*wound healing*). Se sembraron $1,5 \times 10^5$ células por pocillo en placas de 24 pocillos y se mantuvieron hasta alcanzar el estado de confluencia. En ese momento, se añadió mitomicina C (Sigma) al medio en una concentración final de 0,5 mg/ml y se incubó durante 2 horas. Al tratar las células con mitomicina C, un bloqueante de la fase S del ciclo celular, se induce a las células un estado mitóticamente inactivo. A continuación, se realizó una “herida” o incisión en línea recta de manera transversal en cada pocillo con una punta de pipeta estéril. Seguidamente se lavó suavemente cada pocillo dos veces con PBS (*Phosphate Buffered Saline*) para eliminar las células levantadas y/o muertas, y se añadió 1 ml del medio adecuado a cada tipo celular con 1% SBF. Las placas se mantuvieron en el incubador a 37 °C, con 95% de humedad y 5% de CO₂. Se tomaron fotos en el momento de hacer la herida, que se considera el tiempo 0 y se realizó un seguimiento de la herida durante 48 horas, obteniendo imágenes cada 12 horas con un microscopio de contraste de fases. Para calcular la eficiencia del cierre de la herida en las distintas condiciones de cultivo se midió el área de la herida a los tiempos inicial (0h), un tiempo medio (24h) y final (48h), utilizando el programa ImageJ. Se analizaron 12 campos, y en cada línea celular se repitió tres veces el ensayo con muestras independientes. Los resultados se expresan como porcentaje de cierre a las 48 horas respecto al tiempo 0.

5. Ensayos *in vitro* de invasión

Para evaluar la capacidad invasiva de las células de melanoma se utilizaron cámaras *transwell* de cultivo celular (BD Biosciences), que están constituidas por una cámara superior provista de un filtro de policarbonato con poros de 8 µm de

diámetro, los cuales permiten que las células puedan atravesarlo libremente, y una cámara inferior correspondiente al hueco que queda en el pocillo de la placa de 24 pocillos tras colocar el inserto (Figura 17).

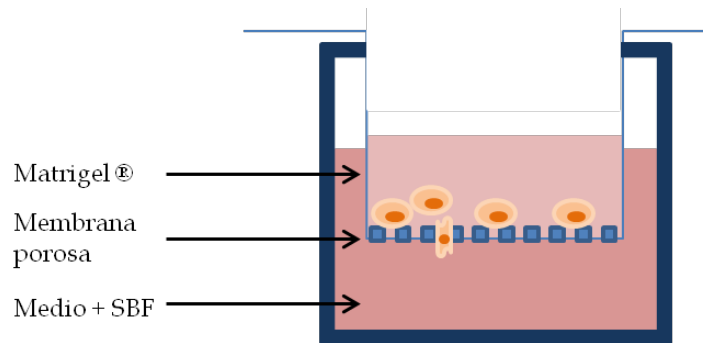


Figura 17. Representación esquemática de los ensayos de invasión.

Actualmente existen matrices extracelulares reconstituidas que presentan una composición homogénea y que se emplean de manera generalizada para los ensayos de invasión *in vitro*. Entre estas matrices destaca el Matrigel® (BD Biosciences), que es una membrana basal biológicamente reconstituida derivada del tumor Engelbreth-Holm-Swarm murino (EHS), que simula la membrana basal presente *in vivo*. El Matrigel contiene colágeno IV, laminina, entactina, heparán sulfato, trazas de factores de crecimiento y proteoglicanos (Albini y Noonan, 2010).

El ensayo de invasión se basa en la preparación de geles de Matrigel sobre las membranas de los insertos. Se partió de un *stock* de Matrigel preparado a una concentración de 9,6 mg/ml conservado a -20 °C. El Matrigel se descongeló lentamente a 4 °C y se manipuló siempre sobre hielo, ya que éste se gelifica rápidamente a temperatura ambiente. El *stock* de Matrigel se diluyó en medio de cultivo sin suero para obtener una concentración de 40 µg/cámara.

Tras recubrir las membranas, las placas se incubaron a 37 °C durante dos horas para la correcta gelificación del Matrigel. Posteriormente, se añadió en el compartimento inferior de los pocillos 1 ml de medio complementado con SBF, y

sobre los geles se añadieron 100 μ l de una suspensión celular de 5×10^5 células/ml en medio de cultivo sin SBF. Estos cultivos se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂.

Finalizado el periodo de incubación, se procedió a marcar y contar las células que habían conseguido alcanzar la superficie inferior de la membrana porosa. Para ello se retiró el medio, el matrigel y las células adheridas en la parte superior de la membrana mediante una torunda. Se realizaron tres lavados con PBS, y después se comprobó al microscopio que no quedasen células en la parte superior de la membrana. A continuación se realizó la fijación de las células añadiendo 1 ml de metanol durante 15 minutos a 4 °C. El núcleo de las células fijadas se tiñó con DAPI durante 15 minutos. Se realizaron posteriormente dos lavados con PBS para retirar el exceso de DAPI, el recuento celular se realizó directamente sobre la cámara con un microscopio confocal de fluorescencia (Olympus Fluoview FV500). Se obtuvieron imágenes que abarcan 0,3 cm² de la membrana y el recuento de las células se llevó a cabo con el software ImageJ. Se analizaron 12 membranas y en cada línea celular se repitió tres veces el ensayo con muestras independientes.

6. Silenciamiento génico mediante siRNA

La tecnología de los siRNA (*short/small interfering RNA*) está basada en la regulación de la expresión génica por los microRNA, que son moléculas pequeñas de doble cadena de RNA que usan las propias células para controlar la activación de los genes, es decir, suprimen la expresión de dicho gen. Así, a través de la interacción de la hebra antisentido del siRNA, incorporada al complejo RISC (*RNA Induced Silencing Complex*), con su secuencia complementaria en el mRNA diana, provoca la fragmentación de dicho mRNA por *Argonaute*, el componente catalítico del complejo RISC (Figura 18).

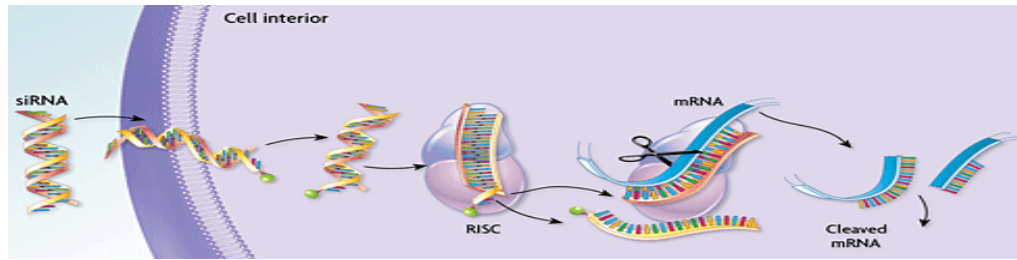


Figura 18. Funcionamiento del RNA de interferencia (tomado de Alnylam Pharmaceuticals).

Los siRNA se han convertido en la actualidad en poderosos reactivos para silenciar genes específicos en cultivos celulares, ya que se puede documentar rápidamente el silenciamiento por microscopía de inmunofluorescencia o por inmunotransferencia de tipo western blot (Elbashir y cols., 2002). Para suprimir la expresión de la proteína ANXA5 se utilizaron dos secuencias distintas de siRNA (s1392 y s1394) (Tabla 7) prediseñadas por Ambion, y el procedimiento se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Estos siRNA son *Silencer® Select Validated* formados por duplos de RNA de 25 nucleótidos que han sido químicamente modificados para hacerlos más estables.

Tabla 7. Secuencias de los siRNA empleados.

<i>Silencer Select Validated siRNA</i>	Secuencia
s1394	Sense 5'-GGAGUGAGAUUGAUCUGUUtt-3' Antisense 5'-AACAGAUCAAUCUCACUCCTGtt-3'
s1392	Sense 5'-GUACAUGACUAUAUCAGGAtt-3' Antisense 5'-UCCUGAUUAUAGUCAUGUACtt-3'

El silenciamiento del gen de interés se realizó mediante transfección transitoria con un agente transfectante que en nuestro caso fue Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). La eficiencia de la transfección se comprobó con SignalSilence® Control siRNA conjugado con fluoresceína, que permite calcular el porcentaje de células transfectadas. Para los experimentos, se sembraron las células a una densidad de 60-70% de confluencia en medio RPMI 1640 sin antibiótico y con 10%

SBF. Transcurridas 24 horas, se cambió el medio y se adicionó el complejo de transfección que fue preparado según las instrucciones del fabricante.

La mezcla de transfección para ambos siRNAs se adicionó lentamente y se distribuyó por el medio de cultivo. La concentración final de la mezcla de transfección utilizada fue de 20 nM. Posteriormente se incubó durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se utilizaron las células para los experimentos. La eficacia del silenciamiento se comprobó a las 48 horas por inmunotransferencia.

7. Técnicas de extracción y análisis de proteínas

7.1. Obtención de extractos celulares

La obtención de extractos proteicos de cada línea celular en las distintas condiciones de estudio se realizó mediante lisis celular en medio hipotónico. Partimos de las células que se tripsinizan, se lavan con PBS y se centrifugan a 200 x g durante 5 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* resultante en PBS para lavar y contar las células. Se repitió de nuevo la centrifugación en las mismas condiciones y se descartó el sobrenadante. La concentración de trabajo fue de 5×10^6 células por cada 250 μ l de tampón de lisis RIPA compuesto por 150 mM de NaCl, 1% de NP-40, 0,5% de desoxicolato, 0,1% de SDS y 80 mM de Tris-HCl a pH 8,0, complementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). El cóctel de proteasas ayuda a mantener la integridad de las proteínas durante el proceso de extracción y purificación, se utiliza a concentración 1X y su composición es 2 mM de AEBSF, 0,3 μ M de Aprotinina, 130 μ M de Bestatina, 1 mM de EDTA, 14 μ M de E-64 y 1 μ M Leupeptina. Tras resuspender las muestras, éstas se mantuvieron en hielo durante 15 minutos. Pasamos los lisados celulares a través de una aguja de insulina (26 G) varias veces con el fin de romper el ADN responsable de la viscosidad de la muestra, y que puede interferir en los experimentos. Finalmente, centrifugamos los lisados celulares a 10.000 x g durante 5 minutos a 4 °C y recuperamos el sobrenadante en el que se encuentra disuelta la proteína celular total. El

sobrenadante es recogido en tubos Eppendorf debidamente etiquetados con la línea celular a la que pertenecen y la fecha de extracción. Los lisados celulares alicuotados se conservan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

7.2. Cuantificación de la concentración de proteína total mediante el método del ácido biciconínico

El método del ácido biciconínico (BCA) está basado en la propiedad de las proteínas de reducir, de manera proporcional a su concentración, el Cu^{+2} a Cu^{+1} . El ácido biciconínico es un cromógeno específico de Cu^{+1} que forma un complejo púrpura cuyo máximo de absorción se encuentra a 562 nm. Por lo tanto, la absorbancia a 562 nm es directamente proporcional a la concentración de proteína. Con los valores de absorbancia obtenidos para concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) realizamos una recta patrón, empleando seis concentraciones crecientes (Tabla 8).

Tabla 8. Elaboración de la recta patrón para la cuantificación de proteínas.

Patrón	BSA (1 mg/ml)	H ₂ O Milli-Q	Concentración de proteína
1	0 μl	50 μl	0 mg/ml
2	10 μl	40 μl	2 mg/ml
3	20 μl	30 μl	4 mg/ml
4	30 μl	20 μl	6 mg/ml
5	40 μl	10 μl	8 mg/ml
6	50 μl	0 μl	10 mg/ml

Las muestras se diluyen 10 veces con agua bidestilada (Milli-Q) obteniendo un volumen final de 50 μl . Una vez preparadas las muestras y la recta patrón, preparamos la mezcla de la reacción, compuesta por 1 volumen de solución de sulfato de cobre pentahidratado al 4% y 50 volúmenes de BCA. Añadimos 1 ml de la mezcla de reacción a cada muestra y a cada muestra patrón, y se incubaron todas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos en oscuridad. La absorbancia de las muestras es medida a 562 nm en un espectrofotómetro *Smart Spec Plus Spectrophotometer* (Bio-

Rad), y se determina la concentración de las muestras a partir de la recta patrón elaborada con concentraciones conocidas de BSA.

8. Identificación de proteínas mediante western blot

El western blot es una técnica que permite separar proteínas en función de su peso molecular en un gel de electroforesis para su posterior detección e identificación mediante inmunomarcaje con anticuerpos específicos, y nos permite establecer una semi-cuantificación relativa de la cantidad de proteína presente en las diferentes muestras de estudio. Esta técnica consta de varios pasos detallados a continuación.

8.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) es una técnica basada en la separación de proteínas desnaturizadas en geles con una matriz de poliacrilamida (Laemmli, 1970). Las proteínas son sometidas a un campo eléctrico de manera que se separan proporcionalmente a su masa. Las muestras se desnaturizan previamente por calor y en presencia de agentes desnaturizantes. El SDS es un detergente desnaturizante cuya unión masiva a las cadenas polipeptídicas desnaturizadas, bloquea la carga propia de la proteína y le confiere una carga neta negativa proporcional a su masa. Esto hace que todas las proteínas migren hacia el ánodo y que la separación sea proporcional a la masa de la proteína; pero no a su forma, ya que las proteínas están desnaturizadas y separadas como cadenas polipeptídicas aisladas; ni a su carga, pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de pesos moleculares conocidos.

Los geles se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador, la bis-acrilamida, en presencia de un iniciador, el ión persulfato, que se añade en forma de persulfato amónico, y un catalizador, TEMED

(N,N,N,N'-tetrametilnediamina). El porcentaje de acrilamida utilizado en la preparación del gel varía dependiendo de la masa molecular de la proteína objeto de estudio (Tabla 9). Cuanto mayor es el porcentaje de acrilamida, menor es el tamaño del poro y mejor la resolución de proteínas de bajo peso molecular. Por el contrario, si se quiere detectar una proteína de elevado peso molecular se debe reducir el porcentaje de acrilamida para obtener poros de mayor tamaño que permiten una mejor resolución de proteínas de gran tamaño. La mayor parte de las proteínas se separan bien en el rango 5-15% de acrilamida.

Tabla 9. Porcentaje de acrilamida utilizado en la separación de las proteínas en función del peso molecular.

% Acrilamida	15%	10%	7,5%	5%
Rango kDa	12-43 kDa	16-68 kDa	36-94 kDa	57-212 kDa

El sistema empleado en el presente estudio fue una cubeta de electroforesis vertical *Mini Protean II Electrophoresis system* (Bio-Rad). Los geles de acrilamida contienen dos regiones: el *running gel*, que es la zona donde las proteínas se separan en función de su peso molecular y tiene una concentración variable de acrilamida dependiendo de la proteína en estudio; y el *stacking gel*, común para todos los geles, y que es la parte inicial de la electroforesis donde se concentran las proteínas para migrar todas a la vez en el *running gel*. La Tabla 10 muestra la composición del *running gel* para los diferentes porcentajes de acrilamida, mientras que la Tabla 11 muestra la composición del *stacking gel*.

Tabla 10. Composición *running gel* para diferentes porcentajes de acrilamida.

<i>Running gel</i>	7,5%	10%	12%	15%
30% Acryl-Bis	3,8 ml	5,0 ml	6,0 ml	7,5 ml
2 M Tris-HCl pH 8,8	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml
H ₂ O Milli-Q	9,0 ml	7,0 ml	6,0 ml	4,5 ml
20% SDS	75 μ l	75 μ l	75 μ l	75 μ l
10% APS	75 μ l	75 μ l	75 μ l	75 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l

Tabla 11. Composición del *stacking gel*.

<i>Stacking gel</i>	4%
30% Acryl-Bis	1 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	750 μ l
H ₂ O Milli-Q	5,75 ml
20% SDS	37,5 μ l
10% APS	62,5 μ l
TEMED	6,25 μ l

Una vez polimerizado el *running gel*, se añadió el *stacking gel* y se colocaron los peines, que son moldes para formar los pocillos donde se cargan las muestras, y se dejó polimerizar. Tras la polimerización, se retiraron los peines y se lavaron los pocillos con el tampón de electroforesis, justo antes de cargar la muestra. Mientras tanto, se procedió a la preparación de las muestras.

Tras determinar concentración de proteína en cada muestra, se mezcla el volumen correspondiente a 40 μ g de proteína total con tampón de carga Laemmli 1X compuesto por 60 mM Tris-HCl a pH 6,8, 2% p/v SDS, 10% glicerol y 0,002% azul de bromofenol con 1 mM DTT, y se añade tampón de lisis RIPA hasta un volumen final de 20 μ l. Las muestras se calientan a 95 °C durante 5 minutos y se cargan en los pocillos del *stacking gel*. El primer pocillo se reserva para el marcador de pesos moleculares *Precision Plus Protein™ Dual Colors Standards* de Bio-Rad. La

electroforesis se realiza aplicando un voltaje de 100 V y 15 mA durante 10 minutos para la migración del *stacking gel*, y después se incrementa el voltaje a 180 V y 20 mA durante una hora aproximadamente, dependiendo tanto del grosor del gel como del porcentaje de acrilamida del *running gel*.

8.2. Transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa

La inmovilización de las proteínas en filtros de nitrocelulosa de 0,2 μm (Schleider & Schüell, Protan BA-83) se realiza mediante transferencia húmeda en una unidad *Mini TransBlot* (Bio-Rad) aplicando 300 mA durante 3 horas. El fundamento es similar al de la electroforesis, pero en este caso se aplica un campo eléctrico horizontal, que hace que las proteínas se adhieran a la membrana de nitrocelulosa. El tampón de transferencia está compuesto por 50 mM de Tris-HCl, 380 mM de glicina, 20% metanol y 0,1% SDS.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se tiñe con Rojo Ponceau al 0,1% (p/v) y ácido tricloroacético al 5% durante 2 minutos en agitación y después es lavada abundantemente hasta visualizar las bandas en la membrana. De este modo, se comprueba que las proteínas se han transferido correctamente. Por último se lava la membrana con TBS Tween-20 (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl y 0,1% v/v de Tween-20) para poder llevar a cabo el inmunomarcaje.

8.3. Inmunomarcaje y revelado

La membrana con las proteínas inmovilizadas se bloquea con una solución al 5% de leche en polvo desnatada en TBS Tween-20 y se mantiene en agitación durante una hora a temperatura ambiente. A continuación se incuba la membrana con el anticuerpo primario específico para la proteína a detectar.

Cada anticuerpo primario se debe utilizar a la concentración recomendada por la casa comercial, diluyéndolo en el mismo tampón TBS Tween-20 utilizado para el bloqueo. Se incuba la membrana durante 8 horas a 4 °C en agitación. Finalizada la incubación, se retira el exceso de anticuerpo primario y se realizan tres lavados de 10 y 15 minutos cada uno con TBS, TBS Tween-20 y TBS. A continuación, se

procede a la incubación de la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente dependiendo del origen del anticuerpo primario. El anticuerpo secundario se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación, y transcurrido este tiempo se retira el exceso de anticuerpo secundario y se realizan de nuevo tres lavados de 10, 15 y 10 minutos cada uno con TBS, TBS Tween-20 y TBS, para finalmente proceder al revelado.

Todos los anticuerpos secundarios utilizados están conjugados con peroxidasa, por lo que la detección de las proteínas en las membranas de nitrocelulosa se realizan mediante el método de quimioluminiscencia ECL (*Enhanced Chemiluminescence assay*), con el kit *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific). La reacción consiste en añadir la mezcla de reactivos en relación 1:1 sobre la membrana, actuando como sustrato de la enzima peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario. La reacción entre la enzima y el sustrato produce luz, la cual es captada de forma digital utilizando una cámara CCD mediante el sistema de documentación de geles *G-BOX* (Syngene) con el programa informático *GeneSnap* (Izasa), que permite que las imágenes obtenidas queden digitalizadas.

El análisis densitométrico de las bandas escaneadas se realizó con el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) utilizando la opción específica para geles. Se cuantificó la intensidad de cada banda, y los valores correspondientes a cada una de las bandas de expresión de proteína se normalizaron con los valores del control actina (β -Actina). A continuación se muestran todos los anticuerpos primarios y secundarios empleados en el presente estudio (Tabla 12 y Tabla 13).

Tabla 12. Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo primario	Referencia	Casa comercial	Origen	Dilución
Anti-Actina	A2066	Sigma-Aldrich	Rabbit monoclonal	1:1.000
Anti-Annexin V	ab54775	Abcam	Mouse monoclonal	1:500
Anti-ARHGGEF7	ab125870	Abcam	Rabbit monoclonal	1:1.000
Anti-FAP α	ab53066	Abcam	Rabbit polyclonal	1:1.000
Anti-N-WASP	ab126626	Abcam	Rabbit monoclonal	1:1.000
Anti-PTK2B	ab81266	Abcam	Rabbit monoclonal	1:1.000
Anti-RAC1	ab33186	Abcam	Mouse monoclonal	1:500
Anti-VEGFA	Sc-152	Santa Cruz Biotechnology	Rabbit polyclonal	1:200

Tabla 13. Anticuerpos secundarios utilizados

Anticuerpo secundario	Referencia	Casa comercial	Origen	Dilución
HRP-F(ab') ₂ AntiMouse IgG(H+L)	STAR105P	AbD Serotec	Goat	1:2000
HRP AntiRabbit IgG (H+L)	STAR124P	AbD Serotec	Goat	1:2000

9. Zimografía

La zimografía es una técnica para el estudio de las enzimas hidrolíticas basada en la degradación de un sustrato (Vandooren y cols., 2013). Esta técnica se realiza en dos etapas; la primera implica la separación de proteínas por electroforesis y la segunda consiste en una incubación sobre el gel para detectar la actividad enzimática de las propias proteínas. Los geles de poliacrilamida empleados incorporan el sustrato adecuado para la actividad enzimática que se quiere detectar, de modo que después de una tinción con azul de Coomassie se observan bandas sin teñir debido a la degradación del sustrato por parte de las enzimas de interés (Kleiner y Stetler-Stevenson, 1994).

Este ensayo se realizó con el objetivo de detectar las proteasas liberadas al medio de cultivo por las células de melanoma. Para ello utilizaron cultivos celulares

confluentes, se lavaron dos veces con PBS para eliminar los restos de SBF, que interfiere en los resultados de la técnica, y se mantuvieron 24 horas más en cultivo en DMEM sin suero. Tras la incubación, se recogió el medio de cultivo de cada línea celular y se centrifugó a $200 \times g$ durante 5 minutos para eliminar los restos celulares que pudieran contener. Posteriormente, se filtraron los medios de cultivo a través de filtros de celulosa de $0,22 \mu\text{m}$ de poro. Para la migración electroforética se cargó el volumen correspondiente a $15 \mu\text{g}$ de proteína con $10 \mu\text{l}$ de tampón de carga (Tabla 14). En este trabajo se realizaron geles para zimografía de gelatina, que incluye 10% de poliacrilamida y 0,1% de gelatina. Además de las muestras a estudio, se incluyó un control negativo que es medio de cultivo sin SBF. La migración proteica del gel se realizó a 200 V.

Tabla 14. Tampón de carga para zimografía

Tampón de carga pH 6,8	
SDS	100 mg/ml
Sacarosa	40 mg/ml
Azul de Bromofenol	0,25%

Finalizada la electroforesis, los geles se lavaron en dos ocasiones durante 30 minutos con Triton X-100 al 2% para eliminar los restos de SDS. Se realizó un lavado adicional con agua destilada durante 5 minutos. Después se introdujeron los geles en el tampón sustrato de metaloproteasas (Tabla 15) y se incubó durante 12 horas a una temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Tras la incubación, se lavaron de nuevo los geles con agua destilada y se tiñeron con azul de Coomassie durante 20 minutos. El último paso consiste en realizar un desteñido del gel hasta la aparición de las bandas, que son unos halos blanquecinos correspondientes con las zonas de actividad lítica de las metaloproteasas sobre la gelatina.

Tabla 15. Tampón sustrato de metaloproteasas

Tampón sustrato de metaloproteasas pH 7,5	
Tris	6,06 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,47 g
NaN ₃	0,2 g

10. Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una técnica basada en la fluorescencia que nos permite visualizar parámetros relacionados con las características antigénicas de las células. Para ello marcamos las células mediante incubación con moléculas fluorescentes, fluorocromos (como el 4'-6'-diamine-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI), o con anticuerpos primarios específicos de antígeno y secundarios conjugados con fluorocromos, que reconocen a los primarios (inmunofluorescencia indirecta). Las moléculas fluorescentes absorben la luz de una determinada longitud de onda y emiten luz de otra longitud de onda más larga. Si un fluorocromo es iluminado a su longitud de onda absorbente y visualizado a través de un filtro que sólo permita pasar la luz de longitud de onda igual a la luz emitida, el componente aparece brillante sobre un fondo oscuro. La intensidad y el color de la luz es una propiedad característica de la molécula fluorescente utilizada. Para analizar el marcaje se emplean microscopios de fluorescencia, que tienen lámparas capaces de excitar las muestras y filtros que seleccionan la longitud de onda de emisión del fluorocromo.

Antes de comenzar el ensayo, preparamos el soporte para las células sobre las que se va a realizar la inmunofluorescencia: cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro. Los cubreobjetos fueron esterilizados en etanol absoluto y expuestos a luz UV durante 15 minutos. En cada pocillo sembramos 500 µl de una suspensión celular de 3×10^5 células/ml. Tras incubar las células en los pocillos, fijamos las células en paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar abundantemente las células con PBS, permeabilizamos las

membranas con SDS al 0,1% en PBS durante 10 minutos. Este paso puede ser obviado si el marcaje que vamos a realizar es de membrana. Una vez lavadas con PBS, bloqueamos las uniones inespecíficas con SBF al 10% diluido en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, y procedimos al marcaje con los anticuerpos.

La técnica que empleamos es especialmente práctica para el ensayo con anticuerpos ya que minimizamos la cantidad de anticuerpo. Sobre una lámina de parafilm, se pone una gota de 30 μ l de la dilución del anticuerpo; sobre ésta se posa el cubreobjetos, exponiendo la superficie con las células a la gota de anticuerpo. Una vez concluido el tiempo de incubación, los cubreobjetos se devuelven a la placa de 24 pocillos, con la superficie con las células hacia arriba, donde se continúa con el protocolo. La incubación se realiza durante 2 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda, para evitar la evaporación del anticuerpo. Después, se lavan las muestras con PBS e se incuban las células con el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Tras lavar concienzudamente las muestras con PBS, se procede al marcaje de los núcleos celulares con DAPI (Sigma) a una concentración 10 μ g/ml en PBS, durante 15 minutos en oscuridad, y de nuevo se lavan con PBS. Por último, se montan los cubreobjetos sobre un portaobjetos con una gota de Fluoromont G (Shandon) y se examinan las muestras mediante un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51).

Los controles para asegurar la especificidad de la inmunofluorescencia se realizaron incubando las células únicamente con el anticuerpo secundario.

11. Análisis de ácidos nucleicos

La técnica asociada al análisis de los ácidos nucleicos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN concreto, fue desarrollada por el grupo del premio Nobel Kary Mullis (Mullis y cols., 1986; Saiki y cols., 1988). Posteriormente, se han

desarrollado variantes de la técnica como la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) que combina la química de la PCR con el uso de moléculas fluorescentes (sondas), con el objetivo de monitorizar la cantidad de productos amplificados que se generan en cada ciclo de la PCR y cuantificar la cantidad de ADN presente en una muestra. En el caso de que el ácido nucleico a analizar sea ARN, es necesario añadir un paso previo conocido como retrotranscripción, en el cual la enzima transcriptasa reversa sintetiza ADN complementario (ADNc) de doble cadena partiendo de ARN monocatenario.

11.1. Extracción y purificación de ADN

La extracción de ADN de las líneas celulares de melanoma comienza disociando las células en cultivo con una solución enzimática de Tripsina-EDTA durante 5 minutos a 37 °C. Se lavan con PBS y tras el recuento, se centrifugan a 200 x g durante 5 minutos y se desecha el sobrenadante. La extracción de ADN se realizó con 5 x 10⁶ células mediante el kit *QIAamp® DNA mini kit* (Qiagen). Este kit se basa en el uso de unas membranas de sílice dispuestas en columnas que atrapan específicamente el ADN. Esta unión a la membrana es reversible y la obtención de ADN se produce por la adición de un tampón alcalino que disminuye la fuerza iónica entre la membrana y el ácido nucleico.

El primer paso a realizar sobre las muestras es la adición de 20 µl de Proteínasa K (Qiagen) y 200 µl de tampón AL incluido en el kit. Se agita con el vórtex durante 15 segundos y se incuba a 56 °C durante 10 minutos. Transcurrida la incubación, se centrifuga la muestra brevemente y se añaden 200 µl de etanol absoluto. Se agita de nuevo durante 15 segundos con el vórtex y se centrifuga brevemente para pasar la muestra a una columna de separación *QiAgen Spin Column*. Se centrifuga a 6.000 x g durante un minuto y se desecha el eluido. A continuación se añaden 500 µl de solución AW1, se centrifuga 1 minuto a 6.000 x g y se añaden 500 µl de solución AW2 para lavar la muestra mediante centrifugación a 8.000 x g durante 3 minutos. Con el objetivo de eliminar completamente la solución AW2 y evitar así

que interfiera en análisis posteriores, se realiza otra centrifugación a 8.000 x g durante un minuto. Por último, se pasa la columna a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se añaden 200 µl de tampón de elución AE. Se incuba a temperatura ambiente durante 2 minutos y se eluye el ADN mediante centrifugación a 6.000 x g durante un minuto. Las muestras correctamente etiquetadas se conservan alicuotadas a -20 °C para asegurar su integridad hasta su análisis.

11.2. Extracción y purificación de ARN

El ARN se extrae de células en cultivo usando el kit *RNeasy mini kit de Qiagen*. El kit combina una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina, diseñada para facilitar la lisis de las muestras y para inhibir las RNasas, y unas membranas de gel de sílice que retienen de manera reversible el ARN hasta el momento de la elución.

Las células en cultivo se disocian con una solución enzimática de Tripsina-EDTA durante 5 minutos a 37 °C. A continuación, se añade SBF para bloquear el efecto de la Tripsina-EDTA y se centrifugan a 200 x g durante 5 minutos a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, las células se resuspenden en PBS para ser contadas. La extracción de ARN se realiza con 8 x 10⁶ células. Se centrifugan a 200 x g durante 5 minutos y se retira el PBS para resuspender las células en 600 µl de una solución que contiene 1 ml de tampón RLT con 10 µl de β-mercaptoetanol. Para obtener una lisis celular completa, se pasa la muestra 10 veces a través de una jeringuilla con una aguja de 26 G. Se añaden 600 µl de etanol al 70% y se pipetea vigorosamente. A continuación, se transfiere la mezcla a una columna de separación del kit y se centrifuga a 8.000 x g durante 15 segundos para que el ARN de la muestra se una a la membrana de gel de sílice. Se desecha el eluido y se coloca la columna en el mismo tubo colector. Para limpiar la columna se añaden 700 µl de tampón RW1 y se centrifuga a 8.000 x g durante 15 segundos, desechando de nuevo el eluido. En este momento se trata la columna con DNasa (Qiagen), para lo que se añade a la columna 80 µl de una solución que contiene 10 µl de DNasa y 70 µl de tampón

RDD. Se incuba a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 15 minutos y transcurrido este tiempo se añaden 700 µl de tampón RW1 antes de centrifugar a 8.000 x g durante 15 segundos. Se pasa la columna a un nuevo tubo colector y se realizan dos lavados con 500 µl de tampón RPE cada uno, centrifugando a 8.000 x g la primera vez durante 15 segundos y la segunda vez durante 2 minutos. Finalmente, se pasa la columna a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se eluye el ARN en 50 µl de agua DEPC, centrifugando a 8.000 x g durante un minuto. Las muestras correctamente etiquetadas y alicuotadas se conservan a -80 °C para asegurar su integridad hasta su análisis.

11.3. Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos se ha realizado en un lector multimodal de placas Synergy HT de BioTek. Este equipo es compatible con placas para microvolúmenes Take-3, que dispone de 16 puntos de lectura para volúmenes pequeños (1,5-3 µl) y permite medir muestras muy concentradas sin necesidad de diluciones. El lector multimodal está conectado a un ordenador donde se visualizan los datos en el programa asociado Gen5™.

Con relación a la ley de Lambert-Beer, existe una relación lineal entre la absorbancia (A) y la concentración de la macromolécula, hasta un máximo de absorbancia 1,2. La absorbancia máxima de las soluciones de ADN y ARN se produce a una longitud de onda de 260 nm, mientras que las soluciones de proteínas lo hacen a una longitud de onda de 280 nm. El cociente de los valores obtenidos a 260 nm y a 280 nm (A_{260}/A_{280}) se utiliza como indicador de la pureza de los ácidos nucleicos contenidos en la muestra. La pureza se considera adecuada cuando el valor de dicho cociente está entre 1,8 y 2. Valores superiores o inferiores a este rango indican contaminación de las muestras. Cada unidad de absorbancia (A) corresponde aproximadamente a 50 µg/ml de ADN de doble hebra y a 40 µg/ml de ARN.

La concentración de ADN obtenida a partir de 5×10^6 células de las diferentes líneas en cultivo oscila entre 50-100 μg . En el caso del ARN extraído de 8×10^6 células en cultivo, se obtuvieron concentraciones que oscilaron entre 60-100 μg de ARN. Además, la integridad del ARN se verificó visualmente tras una electroforesis en gel de agarosa al 2% (m/v) con *GelRed Nucleic Acid Stain* (Biotium), comprobándose la presencia e integridad de las bandas de ARN ribosómico (18S y 28S).

11.4. Retrotranscripción

Una vez aislado el ARN se procedió a la retrotranscripción del ARN a ADNc que servirá como molde en la reacción en cadena de la polimerasa. La retrotranscripción se llevó a cabo con la transcriptasa inversa, una enzima de origen viral. Para la reacción de retrotranscripción se utilizó el kit *iScriptTM cDNA Synthesis* (BioRad) y se siguieron las especificaciones del fabricante. Se partió de 1 μg de ARN total y se mezcló con 4 μl de 5x *iScript Reaction Mix* y 1 μl de *iScript Reverse Transcriptase*, completando con agua DEPC hasta un volumen de 20 μl .

La reacción se lleva a cabo en el termociclador *iCycler MyiQTM Single Color Real-Time PCR Detection System* (BioRad). El protocolo utilizado es el siguiente: durante 5 minutos se somete la mezcla a una etapa inicial de calentamiento a 25 °C, seguido de una etapa de síntesis de ADNc por la enzima transcriptasa inversa que consiste en 30 minutos a 42 °C, para finalizar con una etapa de elongación a 85 °C durante 5 minutos. Opcionalmente se puede completar el protocolo con un paso de mantenimiento a 4 °C hasta que el usuario retira la muestra del termociclador. El ADNc es almacenado a -20 °C hasta el momento del análisis.

11.5. Diseño de cebadores

Un cebador o *primer* es una secuencia corta nucleotídica complementaria a una hebra molde, que sirve como punto de partida para la replicación del ADN. El uso de cebadores es esencial porque la enzima que cataliza la replicación del ADN no

puede empezar a sintetizar una nueva cadena de ADN de la nada, sino que solo puede añadir nucleótidos a una hebra preexistente en su grupo hidroxilo libre en el extremo 3', que es el cebador. El primer paso para el diseño de cebadores es la búsqueda de la secuencia del gen objeto de estudio en la base de datos UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). La secuencia del gen a estudiar en formato FASTA se introduce en el programa Primer3 v 4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) para el diseño de los cebadores. Las condiciones que se establecen en el programa son las siguientes: secuencias de entre 19 y 25 nucleótidos, temperatura de anillamiento óptimo entre 56 y 60 °C, que el contenido de CG esté entre 40-60% y que no presente repeticiones del mismo nucleótido cuatro o más veces.

Para los cebadores utilizados en la PCR cuantitativa, se utilizó la base de datos PrimerBank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>), que almacena los cebadores descritos para la detección y cuantificación de la expresión génica. Una vez seleccionados los cebadores entre los sugeridos, éstos se comprueban en la base de datos UCSC Genome en su herramienta de PCR-*in silico*, para verificar que cumplen los requisitos y su especificidad. Finalizada la selección o diseño de los cebadores, se realiza una búsqueda de tipo BLAST en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>) para verificar que todos los cebadores tienen una única secuencia complementaria en todo el genoma y que, por tanto, son específicos de la posición que se quiere estudiar. Todos los cebadores fueron sintetizados por los laboratorios Conda.

11.6. Reacción PCR convencional

Las reacciones de PCR convencional contienen 12,5 µl de *ImmoMix RedTM* (BioLine), 1 µl de cada cebador de un *stock* de concentración 2 µM, el volumen necesario para 0,1 µg de ADN y agua DEPC hasta alcanzar un volumen final de 25 µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *iCycler MyiQTM Single Color Real-Time PCR Detection System* de BioRad. El programa con las condiciones de

PCR (con pequeñas variaciones de tiempo y temperatura dependiendo de los cebadores y de la longitud del fragmento a amplificar) fue el siguiente: un paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 35 ciclos con un primer paso de desnaturalización parcial a 95 °C durante 30 segundos, un paso posterior de unión de los cebadores a su secuencia complementaria a 55-60 °C (dependiendo de la T_m de los cebadores) durante 30 segundos y una fase de elongación a 72 °C durante un tiempo dependiente de la longitud del fragmento a amplificar, teniendo en cuenta que la polimerasa utilizada añade 1.000 pb en unos 30 segundos. A continuación tiene lugar el paso denominado elongación final, que consiste en un único paso de 10 minutos a 72 °C para asegurar que las cadenas simples de ADN sean totalmente amplificadas. Se concluye la reacción con un paso final de conservación donde los productos amplificados se mantienen a 4 °C hasta que el usuario apaga el aparato. Una vez finalizada la amplificación, se conservan los productos de PCR a -20 °C hasta su análisis en geles de agarosa, en el cual comprobamos que el producto de PCR tiene el tamaño esperado.

El análisis de los productos amplificados en la PCR se realiza mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% (m/v) con *GelRed Nucleic Acid Stain* (Biotium) en tampón TAE, aplicando un voltaje de 100 mA en una cubeta *Run One Electrophoresis Cell* (EmbiTech). La primera calle del gel contiene siempre un marcador de pesos moleculares (100-bp *DNA Ladder Plus*, BioChain) y el resto de las calles se usan para las muestras a analizar. Finalizada la electroforesis, los geles son expuestos en un transiluminador (*High Performance Ultraviolet Transilluminator*, UVP) a luz ultravioleta de longitud de onda de 254 nm, lo que permite la visualización de las bandas y la comprobación de su tamaño.

11.7. RT-qPCR con SYBR Green

Las reacciones de RT-qPCR se realizan en un termociclador *iCycler MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System* de Bio-Rad, utilizando el fluorocromo SYBR Green. Este fluorocromo se une específicamente a ácidos nucleicos de doble hebra

emitiendo fluorescencia a 528 nm, de modo que al aumentar la cantidad de productos de PCR sintetizados, aumenta la intensidad de fluorescencia, lo que permite monitorizar el avance de la reacción de PCR a tiempo real mediante el *software* MyiQ. La mezcla maestra *iQTM SYBR® Green Supermix* de Bio-Rad utilizada incluye también el fluorocromo ROX que actúa como referencia pasiva, ya que no participa en la reacción y emite a 610 nm. Esta referencia pasiva es necesaria para corregir las fluctuaciones de fluorescencia entre los diferentes pocillos.

La mezcla de reacción se compone de 10 µl de la mezcla maestra *iQTM SYBR® Green Supermix*, 8 µl de agua DEPC, 0,5 µl de cada cebador (dilución 1:5 de un *stock* de concentración 10 µM) y 1 µl de ADNc. Las condiciones de amplificación en el termociclador fueron las siguientes: un ciclo inicial para la activación de la polimerasa a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos con un primer paso de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, un paso de anillamiento de los cebadores cuya temperatura es específica para cada pareja de cebadores y varía entre 51-60 °C durante 30 segundos, y un tercer paso de elongación a 72 °C durante 30 segundos. A continuación, hay un ciclo a 95 °C durante un minuto seguido de otro ciclo a 65 °C de otro minuto de duración, para finalizar con una rampa de temperatura de 65 °C a 95 °C, que se consigue en 60 ciclos aumentando la temperatura 0,5 °C en cada ciclo. El proceso finaliza con un paso de conservación donde, al igual que en la PCR convencional, los productos se mantienen a 4 °C hasta que el usuario apaga el aparato.

El protocolo de disociación constituido por la rampa de temperatura donde aumenta gradualmente la temperatura de 65 °C a 95 °C, provoca la separación de las hebras de ADN sintetizadas en la PCR cuando se alcanza la temperatura de fusión (*T_m, Melting Temperature*). Cuando las hebras de ADN se separan, el fluorocromo SYBR Green se separa también y deja de emitir fluorescencia, lo que el equipo interpreta como un pico de fluorescencia. Esta función permite descartar la presencia de múltiples productos de amplificación y detectar la presencia de dímeros de cebadores.

Durante el desarrollo de la RT-qPCR, la emisión de fluorescencia se divide en 4 etapas: la fase inicial, en la cual la fluorescencia de los primeros ciclos es mínima y no rebasa el ruido de fondo. La fase exponencial temprana, en la cual la fluorescencia producida por el producto de PCR rebasa un umbral definido, conocido como *threshold*. El ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el *threshold* se conoce como ciclo umbral (Ct), que es el valor que se utiliza para los cálculos posteriores, ya que es representativo de la cantidad inicial de muestra que hay en la reacción. Cuanto más bajo es el valor Ct, mayor es el número de copias del ADNc. La tercera fase es la denominada lineal, en la cual se alcanza un estado de amplificación óptima y en cada ciclo se duplica la cantidad de producto amplificado. Y finalmente la fase meseta o estacionaria, en la cual los reactivos y el equipo han alcanzado el límite de detección y la reacción ha finalizado (Wong y Medrano, 2005).

Las muestras se amplificaron por triplicado y se incluyeron controles negativos (sin ADNc) para comprobar que no existe amplificación de dímeros de cebadores. Tras comprobar la presencia de productos únicos de amplificación, se procedió a la cuantificación de los niveles transcripcionales de cada gen con los valores de Ct. Estos valores Ct se obtuvieron a través de la representación de la intensidad de fluorescencia normalizada frente a ROX frente al número de ciclos de PCR (ΔR_n vs ciclo). Se realizaron dos experimentos independientes para cada gen de estudio, calculándose la media y la desviación estándar a partir de seis réplicas de cada muestra.

El análisis de la expresión génica requiere mucha precisión, ya que todo el proceso es extremadamente sensible. Por ello, es indispensable la optimización del proceso a distintos niveles. Se deben evitar falsos positivos, generados generalmente por contaminaciones de ADN, y que pueden sobreestimar la cantidad de expresión génica. Además, para cada pareja de cebadores se debe calcular la eficiencia, y esto se realiza con una prueba de dilución seriada de ADNc de una línea celular, A375 en este caso. La eficiencia se calcula empleando la pendiente de la curva estándar lineal generada con la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente de la curva})}$$

$$\text{Eficiencia (\%)} = (E-1) \times 100$$

Todas las parejas de cebadores utilizadas en el estudio han mostrado eficiencia superior al 90%, y los coeficientes de correlación siempre han dado valores por encima de 0,98, lo que indica que el número de Ct varía linealmente con la concentración de ADNc (Tabla 16).

Tabla 16. Cebadores utilizados en los ensayos de RT-qPCR.

Gen	Secuencia cebadores	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Optimización curva estándar
ANXA5	Fw 5'-CAGCGGATGTTGGTGGTTC-3' Rv 5'-CAGCCTGAAATAAAGCCTGAG-3'	102	59	r = 0,999 Ef = 91%
MMP-2	Fw 5'-GATACCCCTTTGACGGTAAGGA-3' Rv 5'-CCTTCTCCCAAGGTCCATAGC-3'	112	60	r = 0,996 Ef = 94,8%
MT1-MMP	Fw 5'-CATCTGTGACGGGAACCTTTGA-3' Rv 5'-GGCAGTGTTGATGGACGCA-3'	163	60	r = 0,999 Ef = 94,9%
TIMP-1	Fw 5'-ACAGACGGCCTTCTGCAATT-3' Rv 5'-ACGCTGGTATAAGGTGGTCTG-3'	88	60	r = 0,999 Ef = 90,7%
TIMP-2	Fw 5'-GCTGCGAGTGCAAGATCAC-3' Rv 5'-TGGTGCCCGTTGATGTTCTTC-3'	109	60	r = 0,998 Ef = 90,7%
β -actina	Fw 5'-AGATGACCCAGATCATGTTTGAG-3' Rv 5'-GTCACCGGAGTCCATCACG-3'	119	60	r = 0,999 Ef = 93%
GADPH	Fw 5'-CCTGTTCGACAGTCAGCCG-3' Rv 5'-CGACCAAATCCGTTGACTCC-3'	102	56	r = 0,999 Ef = 95,5%
Rig/S15	Fw 5'-TTCCGCAAGTTCACCTACC-3' Rv 5'-CGGGCCGCCATGCTTACG-3'	360	60	r = 0,999 Ef = 90%

Se debe tener en cuenta que la cuantificación de la expresión génica es relativa, ya que siempre se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo o control endógeno (*housekeeping*). No existe ningún gen cuya expresión no varíe en ninguna de las condiciones, por lo que se debe valorar cual es el mejor control endógeno para los experimentos. En el presente trabajo, se empleó el programa GeNorm para la

elección de los genes de referencia. Los resultados indicaron que la mejor opción era utilizar los controles endógenos: *GADPH*, *Rig/S15* y *ACTB* (β -actina).

Finalmente, el análisis estadístico se realizó con el programa informático *Gene Expression MacroTM* versión 1.1. Este método se basa en una cuantificación relativa, que además permite tener en cuenta la eficiencia obtenida para cada gen individual a través de las modificaciones realizadas por Pfaffl sobre la ecuación de Livak y Schmittgen (Pfaffl, 2001). Para cada gen, se ha elegido como muestra control la muestra con menor expresión del gen y a éste se le ha asignado un valor 1. A continuación, la macro muestra los valores relativos para el resto de muestras en relación a la muestra control. Las diferencias de expresión entre las líneas celulares se consideraron estadísticamente significativas en un intervalo de confianza al 95%.

11.8. Array de expresión génica

La comparación entre distintos perfiles de expresión genética es una herramienta básica para poder responder a un gran número de cuestiones biológicas. En la actualidad, existen múltiples herramientas que permiten analizar las variaciones en la expresión de genes de forma simultánea para distintas condiciones de estudio. En el presente trabajo, se seleccionó un *array* denominado *RT² Profiler PCR array* (Qiagen), basado en análisis de expresión de genes utilizando la técnica de PCR a tiempo real. El *array* seleccionado se centra en los genes implicados en la motilidad celular (*RT² ProfilerTM PCR Array Human Cell Motility*).

Los genes que se incluyen están involucrados en procesos funcionales como la quimiotaxia, la adhesión celular, la señalización mediada por integrinas, la proteólisis y la formación de proyecciones celulares, entre otras (Tabla 17). Además, la matriz incluye controles de contaminación génica con ADN, controles de retrotranscripción y controles positivos de PCR.

El procedimiento comienza con la retrotranscripción de las muestras de ARN a ADNc utilizando el kit *RT² First Strand*. El uso de este kit es necesario para la obtención de resultados óptimos y para la detección de los controles internos de la retrotranscripción que contiene la matriz. Se partió de una cantidad de 0,5 µg de ARN total para el formato de placas de 96 pocillos. Se realizó un primer paso de eliminación de ADN genómico que consiste en la incubación durante 5 minutos a 42 °C de la muestra de ARN con un *buffer GE* del propio kit. Seguidamente se preparó la reacción de retrotranscripción de acuerdo a lo indicado en la Tabla 18. El protocolo de retrotranscripción consistió en una incubación de 15 minutos a 42 °C seguido de un periodo de 5 minutos a 95 °C para inactivar la reacción. Al producto se le añadieron 91 µl de agua libre de RNasas para obtener la dilución adecuada de ADNc.

Una vez obtenido el ADNc, se prepararon los componentes necesarios para la reacción de PCR, que incluyó la mezcla maestra *RT² SYBR Green*, el ADNc diluido y agua libre de RNasas. En esta mezcla no se incluyeron los *primers*, ya que estos se encuentran inmovilizados en la placa. Seguidamente se llevó a cabo la propia reacción de RT-PCR siguiendo las condiciones del fabricante, y se adquirieron los datos en forma de cuantificación absoluta. Finalmente, los resultados obtenidos fueron analizados mediante un *software* disponible *online* de la casa comercial (www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php).

Tabla 17. Diseño de la matriz de RT² Profiler™ PCR.

ACTN1	ACTN3	ACTN4	ACTR2	ACTR3	AKT1	ARF6	ARHGDI A	ARHGEF7	BAIAP2	BCAR1	CAPN1
CAPN2	CAV1	CDC42	CFL1	CRK	CSF1	CTTN	DIAPH1	DPP4	EGF	EGFR	ENAH
EZR	FAP	FGF2	HGF	IGF1	IGF1R	ILK	ITGA4	ITGB1	ITGB2	ITGB3	LIMK
MAPK1	MET	MMP14	MMP2	MMP9	MSN	MYH10	MYH9	MYL9	MYLK	PAK1	PAK4
PFN1	PIK3CA	PLAUR	PLCG1	PLD1	PRKCA	PTEN	PTK2	PTK2B	PTPN1	PXN	RAC1
RAC2	RASA1	RDX	RHO	RHOA	RHOB	RHOC	RND3	ROCK1	SH3PXD2A	SRC	STAT3
SVIL	TGFB1	TIMP2	TLN1	VASP	VCL	VEGFA	VIM	WASF1	WASF2	WASL	WIPF1
B2M	HPRT1	RPL13A	GADPH	ACTB	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

ACTN1: Actinin α 1

ACTN3: Actinin α 3

ACTN4: Actinin α 4

ACTR2: Actin-related protein 2

ACTR3: Actin-related protein 2

AKT1: V-akt murien thymoma viral oncogene

ARF6: ADP-ribosylation factor 6

ARHGDI A: Rho GDP dissociation inhibitor α

ARHGEF7: Rho guanine nucleotide exchange factor

BAIAP2: BAI 1-associated protein 2

BCAR1: Breast cancer anti-estrogen resistance

CAPN1: Calpain 1

CAPN2: Calpain 2

CAV1: Caveolin 1

CDC42: Cell division cycle 42

CFL1: Cofilin 1

CRK: V-crk

CSF1: Colony stimulating factor 1

CTTN: Cortactin

DIAPH1: Diaphanous homolog 1

DPP4: Dipeptidylpeptidase 4

EGF: Epidermal growth factor

EGFR: Epidermal growth factor receptor

ENAH: Enabled homolog

EZR: Ezrin

FAP: Fibroblast activation protein

FGF2: Fibroblast growth factor 2

HGF: Hepatocyte growth factor

IGF1: Insulin-like growth factor

IGF1R: Insulin-like growth factor 1

ILK: Integrin-linked kinase

ITGA4: Integrin α 4

ITGB1: Integrin β 1

ITGB2: Integrin β 2

ITGB3: Integrin β 3

LIMK: LIM domain kinase 1

MAPK1: Mitogen-activated protein kinase 1

MET: Met proto-oncogene

MMP14: Matrix metalloproteinase 14

MMP2: Matrix metalloproteinase 2

MMP9: Matrix metalloproteinase 9

MSN: Moesin

MYH10: Myosin, heavy chain 10

MYH9: Myosin, heavy chain 9

MYL9: Myosin, light chain 10

MYLK: Myosin light chain kinase

PAK1: p21 protein activated kinase 1

PAK4: p21 protein activated kinase 4

PFN1: Profilin 1

PI3KCA: Phosphoinositide-3-kinase

PLAUR: Plasminogen activator

PLCG1: Phospholipase C γ 1

PLD1: Phospholipase D1

PRKCA: Protein kinase C α

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

PTK2: PTK2 protein tyrosine kinase 2

PTK2B: PTK2 protein tyrosine kinase 2 β

PTPN1: Protein tyrosine phosphatase

PXN: Paxillin

RAC1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

RAC2: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2

RASA1: Ras p21 protein activator

RDX: Radixin

RHO: Rhodopsin

RHOA: Ras, homolog gene family A

RHOB: Ras, homolog gene family B

RHOC: Ras, homolog gene family C

RND3: Rho family GTPase 3

ROCK1: Rho associated

SH3PXD2A: SH3 and PX domains 2A

SRC: V-src sarcoma viral oncogene homolog

STAT3: Signal transducer and activator of transcription

SVIL: Supervillin

TGFB1: Transforming growth factor β 1

TIMP2: Metalloproteinase inhibitor 2

TLN1: Talin 1

VASP: Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VCL: Vinculin
VEGFA: Vascular endothelial growth factor A
VIM: Vimentin
WASF1: WAS protein family 1
WASF2: WAS protein family 2
WASL: Wiskott-Aldrich syndrome-like
WIPF1: WAS/WASL interacting protein family1
B2M: β -2-microglobulin

HPRT1: Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1
RPL13A: Ribosomal protein L13a
GADPH: Glycerol-3-phosphatedehydrognase
ACTB: Actin β
HGDC: Human genomic DNA contamination
RTC: Reverse transcription control
PPC: Positive control

Tabla 18. Composición de la mezcla de retrotranscripción

Compuesto	Volumen
5x Buffer BC3	4 μ l
Control P2	1 μ l
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 μ l
RNase-free water	3 μ l
Volumen final	10 μ l

12. Pacientes

Los pacientes que forman parte de este estudio fueron diagnosticados de melanoma en el Servicio de Dermatología de los Hospitales Universitarios de Cruces y Basurto, siguiendo el protocolo que se detalla a continuación.

12.1. Diagnóstico clínico y anatomopatológico

Los pacientes fueron diagnosticados siguiendo los criterios clínico-patológicos establecidos en la actualidad. Para el estadiaje de la enfermedad tumoral se utilizó la clasificación de la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) que permite clasificar los melanomas en estadios clínicos (Balch y cols., 2009). Los pacientes incluidos en este estudio fueron sometidos a la extirpación del tumor primario, y en ningún caso recibieron terapia antitumoral ni tratamientos posteriores. En el momento de diagnóstico de la enfermedad, se obtuvo la muestra de sangre para el estudio. Con el fin de descartar infecciones u otras enfermedades que alterasen los parámetros sanguíneos, las muestras fueron analizadas previamente; ningún paciente incluido en el estudio presentó ninguna otra enfermedad.

12.2. Seguimiento

Tras la extirpación quirúrgica del tumor primario, los pacientes acudieron a revisiones periódicas. De acuerdo al protocolo establecido en los servicios de Dermatología de los Hospitales de Cruces y Basurto, aquellos pacientes que durante el seguimiento desarrollaron metástasis fueron nuevamente citados para revisiones cada tres meses durante los dos años siguientes. La presencia o ausencia de metástasis fue determinada mediante exámenes físicos, radiológicos, clínicos, analíticos y análisis específicos.

Según la normativa vigente, tanto los pacientes con melanoma como los voluntarios sanos fueron informados sobre la participación en el estudio. Se

obtuvo el consentimiento informado de todos ellos tanto para su inclusión en el grupo de estudio como para la obtención de muestras biológicas. El estudio fue realizado según la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de datos de carácter personal, máxime en lo que concierne al envío y manejo de datos a terceros.

El grupo de estudio está formado por 155 pacientes con melanoma que acudieron a consulta entre los años 1998-2010. El grupo de pacientes lo forman 69 hombres (44,5%) y 86 mujeres (55,5%), con una edad media de 55,7 años y un rango comprendido entre los 18 y 90 años. El grupo de pacientes fue clasificado en función de la progresión clínica de la enfermedad: un grupo de pacientes de buena evolución (48,4%) y otro grupo de pacientes de evolución metastásica (51,6%). El grupo de pacientes no metastáticos está formado por pacientes que se mantuvieron libres de enfermedad durante los 5 años posteriores tras la intervención quirúrgica del tumor primario. El grupo de pacientes metastáticos está formado por pacientes que tras la extirpación del tumor primario desarrollaron metástasis durante los dos primeros años de seguimiento.

El grupo control está formado por 49 individuos sanos, compuesto por 13 hombres (26,5%) y 36 mujeres (73,5%), con una media de edad de 30,55 años y un rango comprendido entre 21 y 47 años.

12.3. Obtención de suero a partir de muestras de sangre

Tanto la obtención como el procesamiento de las muestras sanguíneas se realizaron siguiendo un protocolo estandarizado con el fin de evitar variaciones o modificaciones, ya que cualquier modificación en el protocolo puede afectar a los resultados. Las muestras de sangre fueron enviadas anonimizadas y refrigeradas tras su extracción desde los Hospitales Universitarios de Cruces y Basurto al Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco (EHU/UPV) donde fueron procesadas. Los datos clínicos de interés asociados a la muestra fueron recogidos y almacenados en una base de datos informatizada.

Las muestras de sangre fueron recogidas en el momento del diagnóstico de la enfermedad y todas ellas se obtuvieron en condiciones estériles, empleando el sistema Vacutainer (BD Vacutainer SST®). La sangre fue recogida en tubos de 5 ml provistos de un gel separador que coadyuva en la activación de la coagulación y retracción del coágulo. Las muestras se centrifugaron a $200 \times g$ durante 15 minutos a 4°C con el fin de separar el suero y el coágulo. Una vez separadas las fracciones de la sangre, se identificaron tubos Eppendorf con el código asignado a cada muestra y se alicuotó el suero obtenido en al menos tres alícuotas de aproximadamente 1 ml cada una. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su análisis. La colección de muestras de melanoma está registrada en el Instituto de Salud Carlos III bajo la responsabilidad de la Dra. M^a Dolores Boyano.

13. Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)

El ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) es una técnica basada en un antígeno inmovilizado que es detectado por un anticuerpo capaz de generar un producto detectable, como es un cambio de color. Mediante el cambio de color medimos indirectamente el antígeno de la muestra mediante un lector de placas que dispone de un sistema de filtros que lee la longitud de onda del cromógeno. Los principales materiales y soluciones utilizados en un ensayo de ELISA se resumen en la tabla 19. Los kits de ELISA empleados para determinar la concentración de ANXA5 fueron cuantitativos, en los que la densidad óptica (OD) de la muestra se compara con una curva estándar consistente en diluciones seriadas de una solución de concentración conocida de proteína.

Tabla 19. Materiales y soluciones utilizadas en los ensayos ELISA

Materiales y Soluciones	Descripción
Microplaca de 96 pocillos	Placa tratada que contiene anticuerpo contra el antígeno de interés
Solución blanco	Solución que contiene todos los productos usados en el ensayo excepto el antígeno a probar
Solución estándar	Solución de concentración conocida del antígeno de interés para la construcción de la curva estándar
Solución control	Solución de concentración conocida del antígeno de interés
Solución de dilución	Solución para diluir estándares, controles y muestras
Detector de anticuerpo	Enzima que se conjuga con el anticuerpo
Solución de lavado	Solución que elimina el excedente de anticuerpos
Substrato	Substrato específico para la enzima conjugada que proporciona un producto coloreado
Solución stop	Solución que detiene la reacción enzima-substrato

En el presente trabajo, para medir la cantidad de proteína presente en el suero de pacientes se utilizaron kits de ELISA comerciales para evitar variabilidad. El kit empleado fue Zymutest AnnexinV (Aniara) cuyo límite de detección es 0,1 ng/ml y el rango de detección es de 0,1 a 120 ng/ml. La curva estándar empleada que mejor se ajusta a los resultados obtenidos fue log-log. Es un ELISA tipo *sandwich* con anticuerpos policlonales específicos para ANXA5 humana, basado en la captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos. Se trata de un ensayo en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. La muestra problema en la que se encuentra el antígeno es incubada en el pocillo. El antígeno es reconocido por el primer anticuerpo y posteriormente por el segundo anticuerpo unido a una enzima (en este caso peroxidasa). Así pues, cada molécula de antígeno quedará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo conjugado que lo marca.

Al añadir el substrato que reacciona con la enzima se produce una reacción cromogénica. Finalmente se mide la densidad óptica mediante espectrofotometría a la longitud de onda de 450 nm. La reacción es detenida para prevenir la

saturación de la señal. Estos ensayos tienen gran especificidad y sensibilidad gracias a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.

14. Análisis estadístico

Para la valoración de los datos hemos utilizado diferentes parámetros. Inicialmente hemos utilizado la estadística descriptiva para conocer diferentes características del conjunto de datos.

- **Valores estadísticos de posición:** Media aritmética (\bar{x}) que ayuda a expresar el valor medio del conjunto de valores.
- **Valores estadísticos de dispersión:** son indicadores del grado de homogeneidad con que se agrupan los valores alrededor de las medias de tendencia central. Reflejan la dispersión de los datos estudiados para las variables; en nuestro caso se utiliza el error estándar (SE).
- **Contraste de hipótesis estadística:** consiste en analizar si es significativa o no la diferencia entre la media en las muestras y el valor supuesto control del parámetro. La presencia de esta característica se mide por el valor “p” (probabilidad). Se ha considerado diferencia significativa una $p < 0,05$.

Las pruebas de homogeneidad llevadas a cabo fueron:

- **T de Student.** Test paramétrico que se basa en la suposición de que los datos están muestreados de una población que sigue una distribución normal. Permite comparar dos medias muestrales obtenidas de dos grupos que difieren en un factor para analizar si entre ellos existen diferencias significativas. La diferencia significativa nos confirma que es muy poco probable que esta diferencia pueda ser explicada por el azar.

- **U de Mann Whitney.** Test no paramétrico, equivalente a la T de Student, que se utiliza cuando la población no sigue una distribución normal.

También se realizaron **pruebas de regresión logística**, que trata de relacionar la probabilidad de que una variable esté asociada con otras variables independientes. Se han utilizado para determinar los factores predictivos relacionados con la progresión metastática. Las variables analizadas han sido: edad, sexo, estadio, evolución metastática, intervalo libre de enfermedad y los valores séricos de la proteína ANXA5. Se define el intervalo libre de enfermedad como el periodo de tiempo en meses entre la cirugía del tumor primario y la aparición de metástasis.

Adicionalmente se realizó un análisis de supervivencia en el que se trata de estudiar la supervivencia de una población y el esclarecimiento de los factores que condicionan la diferente evolución observada en un grupo de pacientes.

- **Curva de supervivencia de Kaplan-Meier.** La curva de supervivencia es la representación gráfica de la función de supervivencia estimada a partir de los datos. La variable tiempo se representa en el eje de abscisas y la probabilidad de supervivencia expresada en porcentaje o en tanto por uno se representa en el eje de ordenadas. La metodología, producto-límite, también conocida como Kaplan-Meier, parte de los tiempos de supervivencia de cada uno de los individuos de la muestra y estima la función supervivencia para la población de la cual la muestra es representativa.
- **Test de Log-Rank** (Comparación de curvas de supervivencia). Permite comparar la supervivencia de dos grupos de individuos, diferenciados por alguna característica, como pueden ser distintos factores pronóstico. El test Log-Rank incorpora la información de dos grupos y es capaz de manifestar diferencias significativas. La hipótesis que se pone a prueba es la igualdad de supervivencia de las dos poblaciones. Si el test es

significativo indicará que se rechaza la hipótesis de igualdad y, por lo tanto, que las poblaciones estudiadas muestran supervivencias diferentes.

Los análisis estadísticos se han realizado utilizando el programa IBM SPSS Statistics 20. Se consideran diferencias estadísticamente significativas entre las variables a partir de un valor $p < 0,05$. En las gráficas se indica la significación estadística de la siguiente manera: ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$.

15. Análisis de imagen

El análisis de las imágenes obtenidas en el presente trabajo se ha realizado a través del programa ImageJ. ImageJ es una aplicación para el procesamiento y análisis de imagen desarrollada por el NIH (*National Institute of Health*) ampliamente usado en ciencia gracias a su simple interfaz, su velocidad de procesamiento y su extensibilidad. En el presente trabajo se han realizado análisis densitométricos, análisis de número de partículas y cuantificación de áreas sobre las imágenes obtenidas.

RESULTADOS

1. LA PROTEÍNA ANXA5 ESTÁ IMPLICADA EN LA CAPACIDAD MIGRATORIA E INVASIVA DE LAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

1.1. Expresión de ANXA5 en las líneas celulares de melanoma humano: A375, HT-144, MEL-HO y COLO-800

Nuestro primer objetivo fue determinar la expresión de ANXA5 en distintas líneas celulares de melanoma. Con este fin se determinaron los niveles de proteína mediante western blot en tres lisados independientes de cada línea celular. En la figura 19 se muestra una imagen de la inmunodetección representativa de los western blots junto a una gráfica de expresión de ARNm de ANXA5. Esta proteína se visualiza en el western blot como una banda inmunorreactiva de 36 kDa, cuya expresión se encuentra significativamente disminuida en las líneas de melanoma A375 y HT-144 respecto a las líneas de melanoma MEL-HO y COLO-800. La cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR confirmó que las líneas MEL-HO y COLO-800 expresan niveles significativamente mayores de ARNm correspondiente al gen ANXA5 que las líneas celulares A375 y HT-144, siendo en las líneas MEL-HO y COLO-800 aproximadamente 10 veces mayor la expresión relativa.

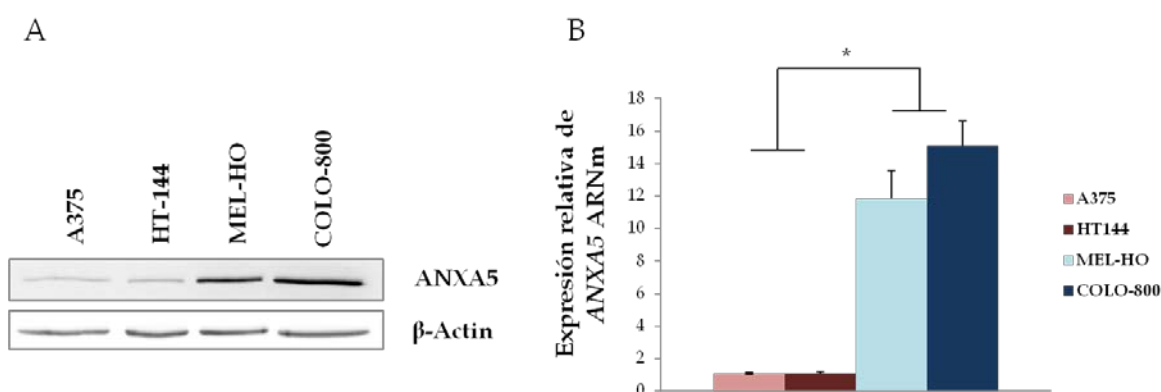


Figura 19. Expresión de ANXA5 en líneas celulares de melanoma humano. (A) Western blot donde se muestra una menor expresión de proteína en las líneas celulares A375 y HT-144 frente a las líneas celulares MEL-HO y COLO-800. Imagen representativa de 3 experimentos realizados. (B) La cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR confirma una sobreexpresión de ANXA5 en las líneas de melanoma MEL-HO y COLO-800 con respecto a las líneas A375 y HT-144. Los valores corresponden a la media \pm DS de 3 experimentos independientes.* $p < 0,05$.

Además, llevamos a cabo ensayos de inmunofluorescencia para la detección y localización de la proteína ANXA5 sobre células de melanoma. Las imágenes obtenidas (Figura 20) confirmaron la presencia de distintos niveles de proteína entre las diferentes líneas celulares de melanoma.

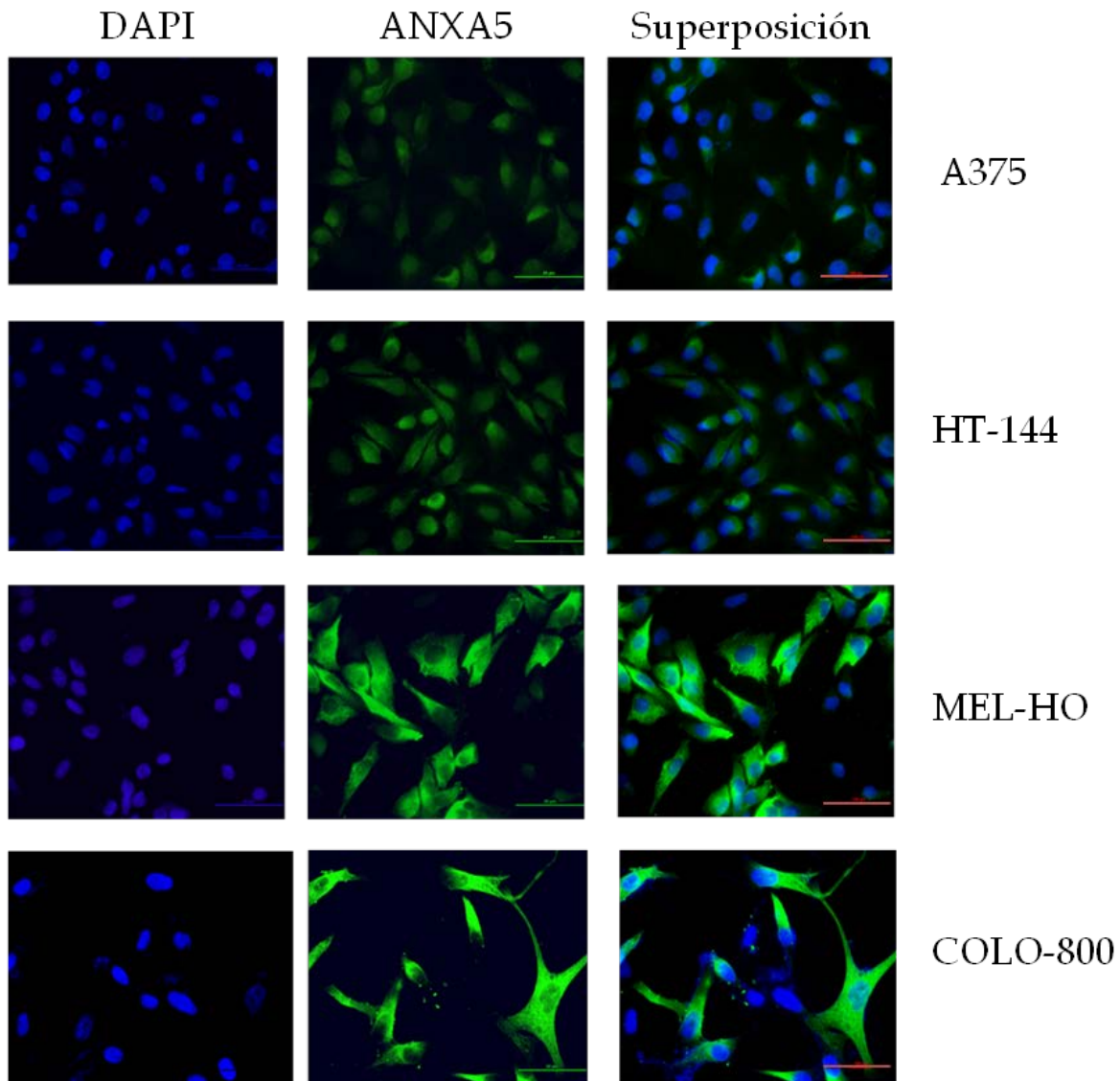


Figura 20. Imágenes microscópicas mediante inmunofluorescencia de la expresión de ANXA5 en líneas celulares de melanoma humano. Los resultados mostrados son representativos de al menos 3 experimentos independientes. Barras de tamaño: 50µm.

1.2. La expresión de ANXA5 se relaciona con la capacidad migratoria e invasiva de las líneas celulares de melanoma humano

Los ensayos de migración *in vitro* permiten evaluar de forma eficiente la capacidad migratoria de las distintas líneas celulares. Las 4 líneas celulares utilizadas en el presente estudio se dividieron en dos grupos, por un lado las dos líneas celulares (A375 y HT-144) con baja expresión de ANXA5 y por otro lado las dos líneas celulares (MEL-HO y COLO-800) con niveles más elevados de ANXA5. Como abordaje experimental utilizamos un modelo clásico de cierre de herida *in vitro*. Para llevar a cabo este experimento se sembraron las células a una densidad cercana a la confluencia, en placas de 24 pocillos. Previa a la realización de la herida, se trataron las células con 0,5 mg/ml de Mitomicina C con el fin de bloquear la proliferación celular. La herida se realizó con una punta estéril y se monitorizó la migración celular durante 48 horas. Como se puede observar en la figura 21, las líneas celulares con menor expresión de ANXA5 (A375 y HT-144) muestran una capacidad intrínseca para cerrar la herida, pero esta capacidad es significativamente mayor ($p < 0,05$) en las líneas celulares con mayor expresión de ANXA5 (MEL-HO y COLO-800), pasando de una reducción de la superficie de la herida de aproximadamente un 30-40% a una reducción del 70-80%, en células de menor expresión de proteína y de mayor expresión, respectivamente.

Estos resultados ponen de manifiesto que la capacidad migratoria de estas 4 líneas de melanoma es significativamente diferente entre ellas, y se observa una mayor migración celular en aquellas líneas que expresan mayor cantidad de ANXA5.

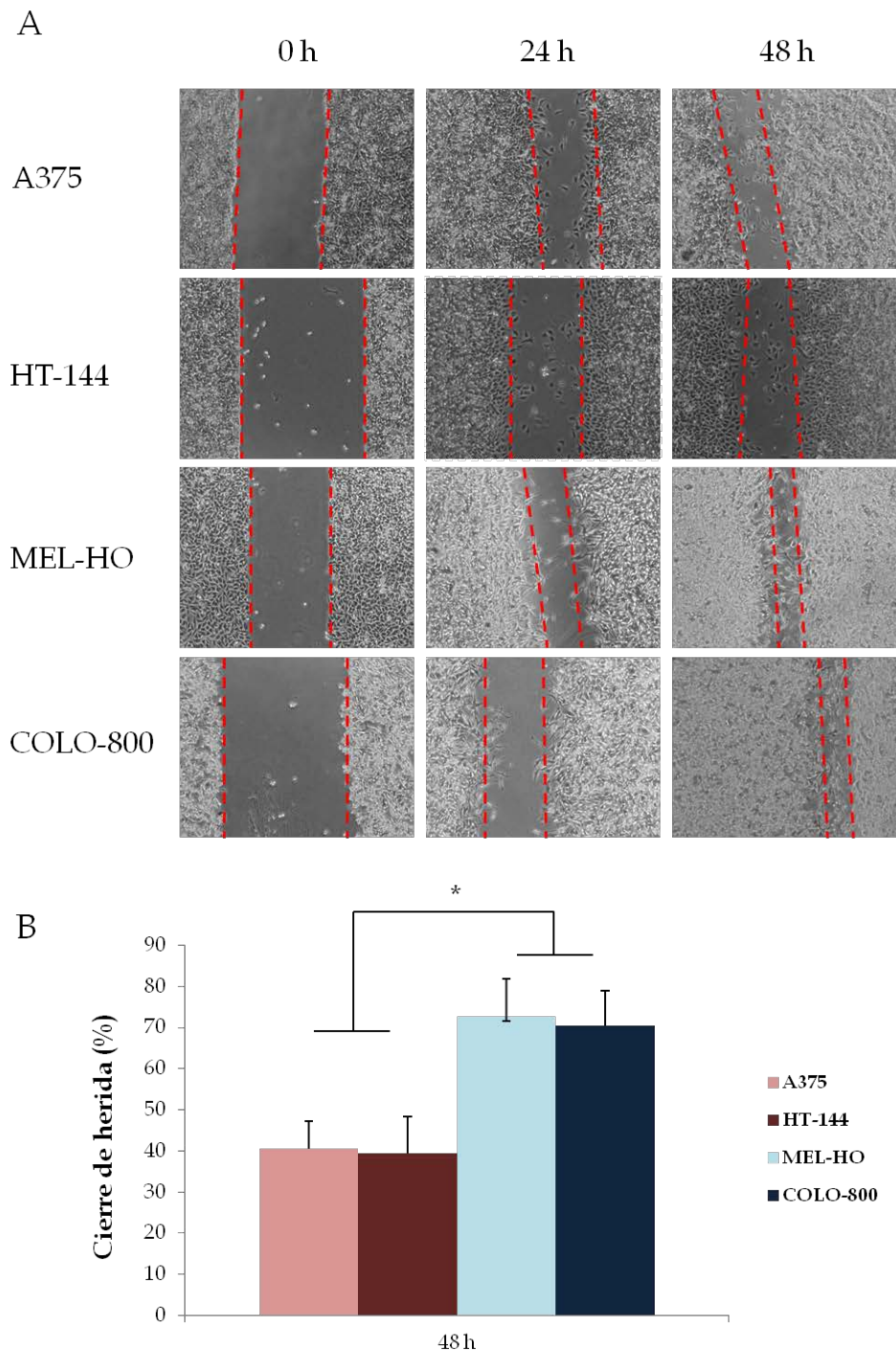


Figura 21. Ensayos de cierre de herida. (A) Imágenes de microscopía de contraste de fases de los cultivos a 0 horas (tras realizar la herida), a 24 horas y a 48 horas de incubación. Cada imagen es representativa de al menos 12 campos seleccionados aleatoriamente de 3 experimentos independientes. (B) Gráfica cuantitativa que representa el porcentaje de cierre de herida a las 48 horas, teniendo en cuenta el área de la herida inicial (100%). La cuantificación del área se realizó mediante el programa ImageJ. Los datos representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$.

Para continuar con el estudio del papel de ANXA5 en las líneas celulares de melanoma, decidimos analizar la capacidad invasiva de las células tumorales. Para ello, sembramos las distintas líneas celulares en cámaras *transwell* previamente recubiertas con una matriz extracelular reconstituida, conocida como Matrigel, y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas. Como se muestra en la figura 22, en condiciones basales, es decir, en ausencia de estímulos exógenos, las líneas celulares A375 y HT-144 tienen baja capacidad intrínseca de atravesar los *transwell* cubiertos con Matrigel, mientras que las líneas MEL-HO y COLO-800 muestran una capacidad de invasión de la matriz extracelular reconstituida significativamente mayor ($p < 0,05$). Comparando el número total de células que han atravesado el Matrigel, MEL-HO y COLO-800 duplican el número de células respecto a las líneas A375 y HT-144. De nuevo, se observa una relación positiva entre la expresión de ANXA5 y la capacidad invasiva de las líneas celulares de melanoma.

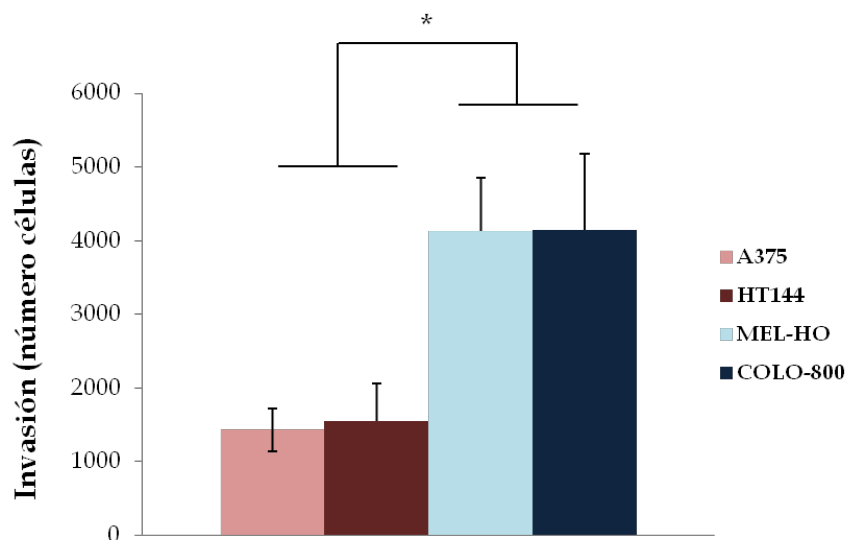


Figura 22. Ensayos de invasión sobre Matrigel. Gráfica cuantitativa del número total de células que invaden la matriz de Matrigel en un tiempo de 24 horas. Los valores representan la media \pm DS de 3 experimentos realizados por cuadruplicado.* $p < 0,05$.

En resumen, estos resultados nos indican que, potencialmente, la expresión de ANXA5 puede influir sobre la migración celular y capacidad invasiva de las líneas celulares de melanoma, ya que aquellas que poseen mayor expresión de la proteína muestran mayor capacidad migratoria e invasiva.

1.3. El silenciamiento de ANXA5 reduce significativamente la capacidad migratoria e invasiva de las células de melanoma humano

Los resultados anteriores evidencian un papel importante para ANXA5 en la capacidad migratoria e invasiva de las células de melanoma, tanto en los ensayos de cierre de herida como en los ensayos de invasión con Matrigel. Con el fin de confirmar la participación de ANXA5 en estas actividades biológicas, realizamos experimentos de silenciamiento por siRNA específico, utilizando la metodología descrita en el apartado Material y Métodos.

En primer lugar, utilizamos un siRNA control conjugado con fluoresceína para valorar la eficiencia de transfección sobre las células de melanoma, que a su vez se usó como control negativo de la transfección (Figura 23). Transcurridas 48 horas después de la transfección, se obtuvo una eficiencia de transfección próxima al 80%, comprobado mediante microscopía de fluorescencia.

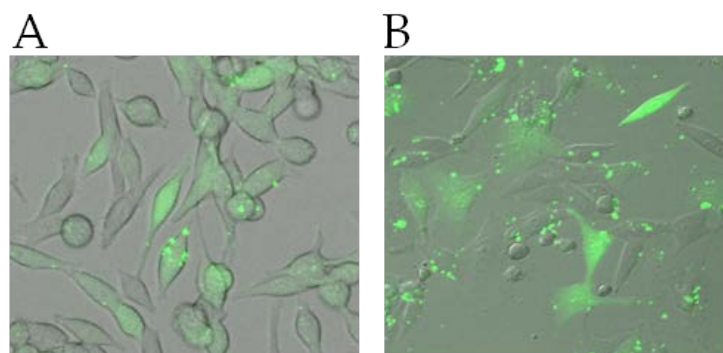


Figura 23. Transfección con siRNA control en las células de melanoma humano. (A) MEL-HO (B) COLO-800. Imágenes representativas obtenidas mediante microscopio de fluorescencia con contraste de fases de las células transfectadas y marcadas con fluoresceína.

Seguidamente, determinamos el grado de silenciamiento alcanzado midiendo los niveles de proteína mediante western blot. Para ello, las células con mayor expresión de ANXA5 (MEL-HO y COLO-800) fueron sembradas a 60% de confluencia y transfectadas. Como se observa en la figura 24, las células transfectadas con siRNA presentan unos niveles de ANXA5 más bajos que las transfectadas con el siRNA control. Cuantitativamente, el grado de silenciamiento proteico en estas condiciones se aproxima al 75% en la línea MEL-HO y al 85% en la línea COLO-800.

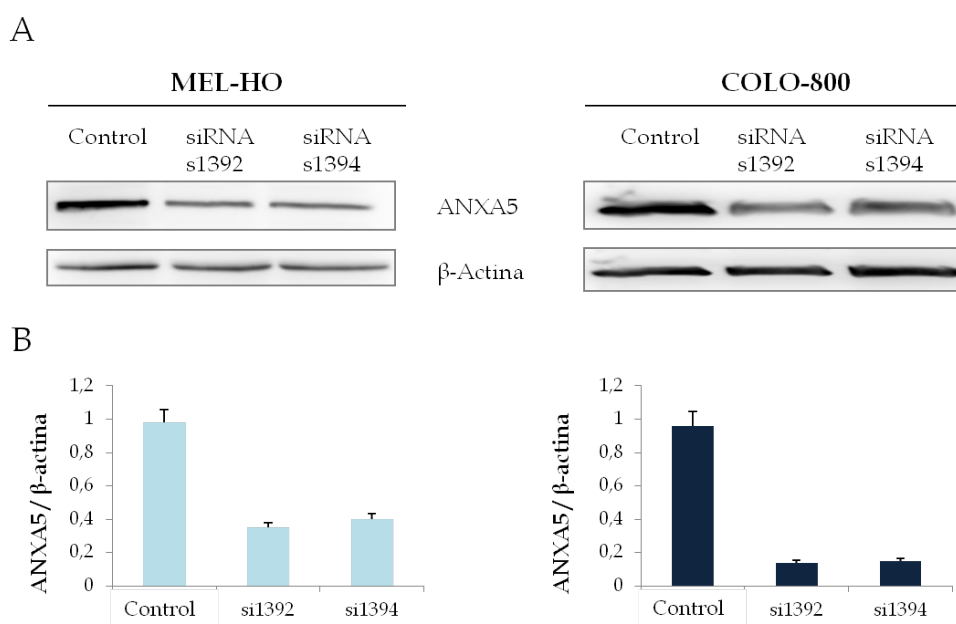


Figura 24. Eficiencia del silenciamiento de ANXA5. Las células MEL-HO y COLO-800 se transfectaron con dos secuencias distintas de siRNA (20mM) específicos para ANXA5. (A) Análisis mediante western blot de los niveles de expresión de la proteína. Se utilizó β -actina como control de carga. Imagen representativa de 2 experimentos realizados independientemente. (B) Cuantificación del nivel de silenciamiento mediante análisis densiométrico de los blots. Los datos corresponden a la media \pm DS de 2 experimentos independientes.

Una vez validado el silenciamiento génico de ANXA5 realizamos los ensayos de migración con el modelo de cierre de herida utilizando las células MEL-HO y COLO-800 previamente transfectadas con las dos secuencias diferentes de siRNA. Como muestra la figura 25, el silenciamiento génico de ANXA5 inhibió significativamente la capacidad migratoria de las células de melanoma (MEL-HO

p<0,001 y COLO-800 p=0,048), demostrando así que ANXA5 participa en la actividad migratoria en las células melanoma humano.

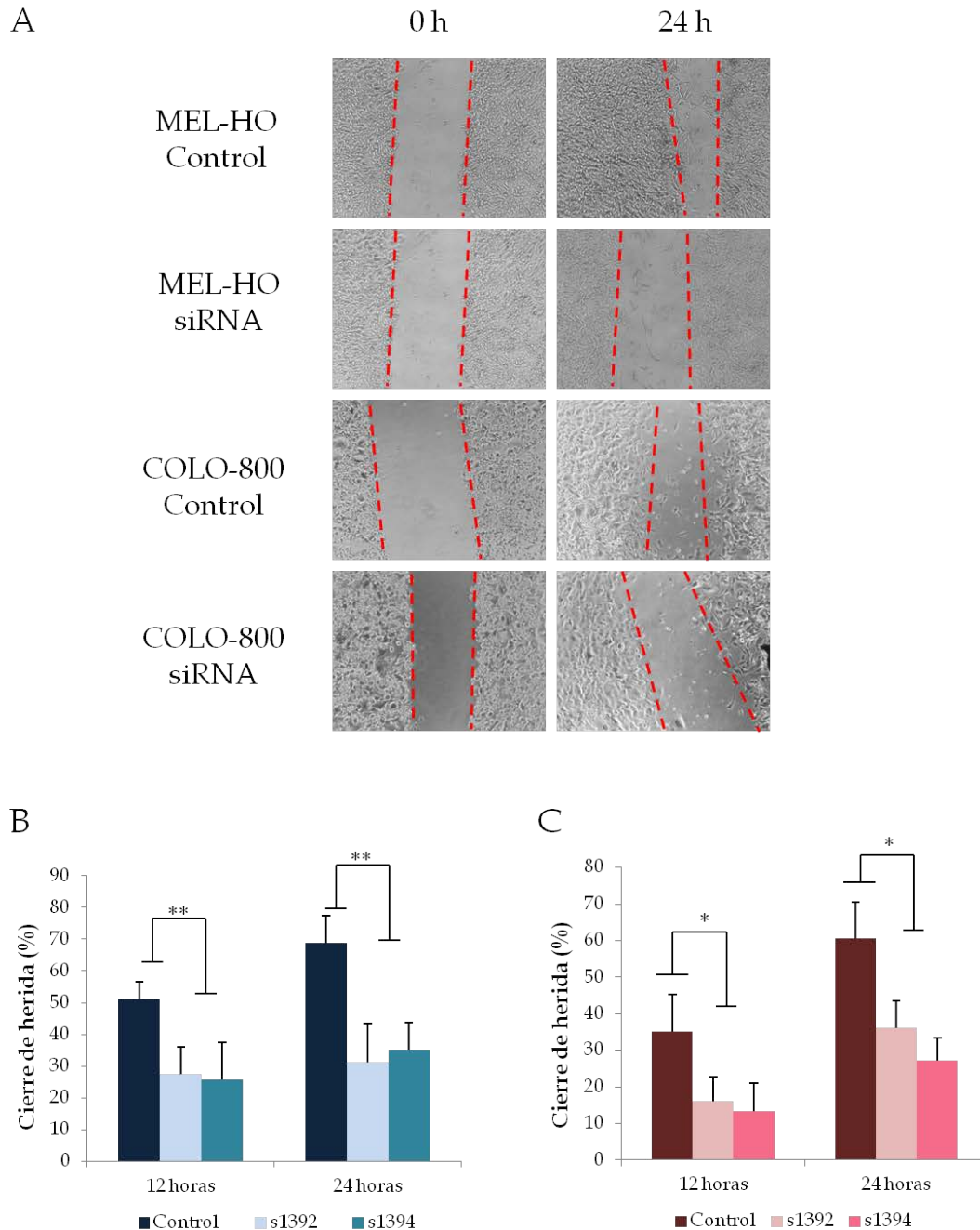


Figura 25. Efecto del silenciamiento de ANXA5 sobre la migración de células de melanoma. (A) Imágenes de microscopia de contraste de fases de los cultivos a 0 horas y a 24 horas de incubación. Cada imagen es representativa de al menos 10 campos seleccionados aleatoriamente de 3 experimentos independientes. (B-C) Las células MEL-HO (B) y COLO-800 (C) fueron transfectadas como se describe en el apartado Material y Métodos. La gráfica representa el porcentaje de cierre de herida a las 24 horas. Los datos representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * p<0,05 **p<0,01.

Del mismo modo se realizaron los ensayos con cámaras *transwell* cubiertos con Matrigel (Figura 26), utilizando de nuevo las células MEL-HO y COLO-800 previamente transfectadas con los diferentes siRNA. El resultado obtenido demuestra que la capacidad invasiva de las células se redujo significativamente tras el silenciamiento génico de ANXA5 (MEL-HO $p=0,0497$ y COLO-800 $p=0,0014$), de lo que se deduce que ANXA5 es responsable, en parte, de la actividad proinvasiva de las células de melanoma humano.

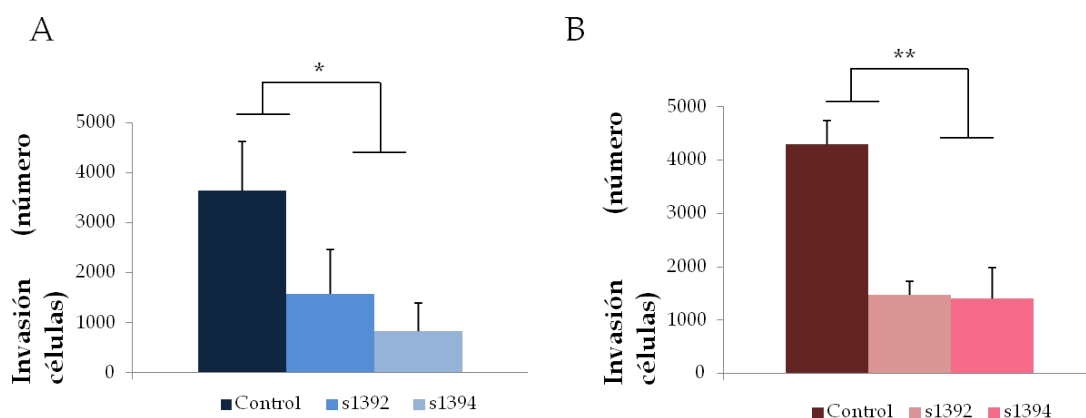


Figura 26. Efecto del silenciamiento de ANXA5 sobre la invasión de células de melanoma. Las células MEL-HO (A) y COLO-800 (B) fueron transfectadas como se describe en el apartado Material y Métodos. La gráfica muestra la cuantificación del número de células que atraviesan el filtro cubierto con matrigel. Los datos representan la media \pm DS de 3 experimentos independientes. * $p<0,05$ ** $p<0,01$.

1.4. La expresión de ANXA5 no afecta a la proliferación de las células de melanoma humano

Con objeto de determinar si la expresión de ANXA5 juega algún papel en la proliferación celular, en primer lugar se analizó la proliferación de las células de melanoma con diferente expresión de ANXA5 mediante el test XTT. Los resultados no mostraron diferencias en la capacidad proliferativa de las líneas celulares con mayor expresión de ANXA5 (MEL-HO y COLO-800) en relación a las líneas celulares con baja expresión (A375 y HT-144) de la misma (Figura 27). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la expresión de ANXA5 no modula la tasa de proliferación celular.

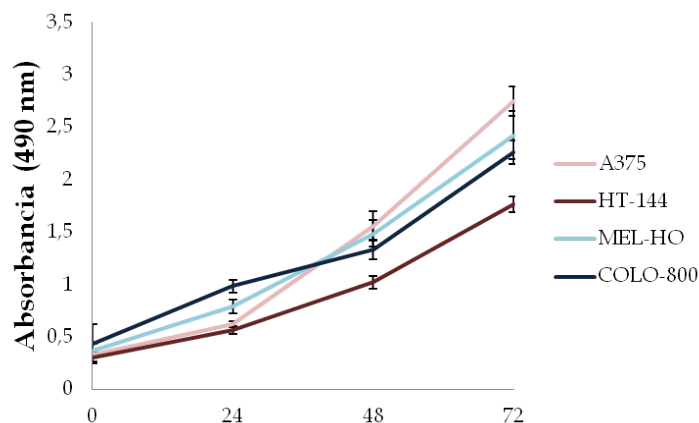


Figura 27. Análisis de la capacidad proliferativa de las líneas de melanoma humano. A día 0 se sembraron, en placas de 96 pocillos, 10.000 células de cada línea celular por pocillo. Los cultivos se mantuvieron en condiciones normales de cultivo durante el transcurso del experimento. La capacidad proliferativa de cada línea se determinó mediante el ensayo colorimétrico XTT, cuantificando la absorbancia de las células en cultivo (relativo al número de células), en los tiempo indicados (0, 24, 48 y 72 horas). Los valores son medias \pm DS de 3 experimentos realizados independientemente.

Para confirmar los resultados anteriores, se analizó también la capacidad proliferativa de las células de melanoma con la proteína ANXA5 silenciada con ambas secuencias de siRNA. Como se puede observar en la figura 28, el silenciamiento de la expresión de ANXA5 no produjo cambios significativos en la capacidad proliferativa de la línea celular MEL-HO.

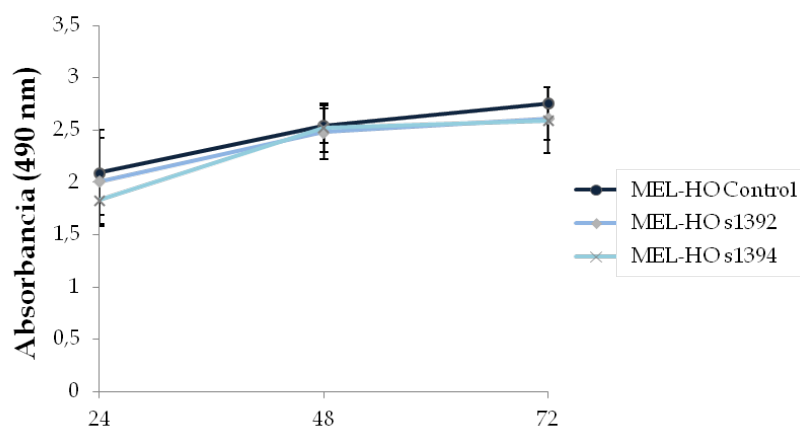


Figura 28. Análisis de proliferación celular en las células silenciadas para ANXA5. Las células MEL-HO transfectadas con los siRNA para ANXA5 se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 10.000 células por pocillo. La capacidad proliferativa se determinó mediante el ensayo colorimétrico XTT, cuantificando la absorbancia de las células en cultivo (relativo al número de células), en los tiempos indicados (24, 48 y 72 horas). Los valores representan las medias \pm DS de 3 experimentos independientes.

1.5. Determinación de la actividad proteolítica de MMP-2 y MMP-9 en las líneas celulares de melanoma humano

Con el fin de estudiar la actividad gelatinolítica de las líneas celulares de melanoma, se recogieron los medios de cultivo de las líneas y se realizaron zimografías. Al realizar estos geles se les añade el sustrato de las enzimas que queremos detectar, en este caso gelatina. Tras incubar los geles con los tampones correspondientes, la posterior tinción de estos con azul de Coomassie mostró la actividad metaloproteasa de las muestras en forma de bandas no teñidas en el gel.

En el gel resultante (Figura 29) se apreciaron bandas atribuibles a MMP-2 y MMP-9 por su peso molecular (MMP-2, 66 kDa y MMP-9, 92 kDa). En el caso de la MMP-9 solo se detectó en la línea celular A375, por lo que la comparación entre las líneas celulares no fue posible. En el caso de MMP-2, la comparación entre las líneas celulares no mostró diferencias significativas en cuanto a la actividad proteolítica, a pesar de que la línea celular A375 mostró una ligera mayor actividad.

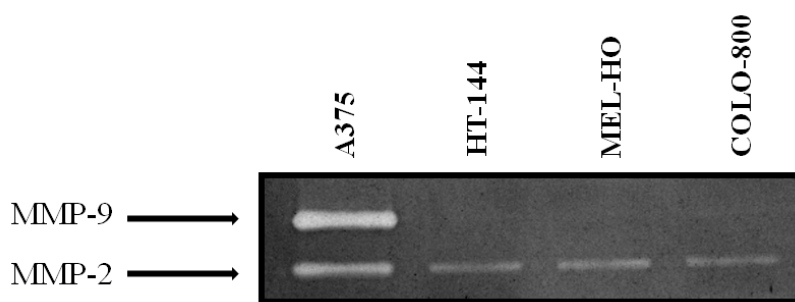


Figura 29. Actividad enzimática gelatinolítica asociada a MMP-2 y MMP-9. Zimografía representativa de los medios de las líneas de melanoma estudiadas. Los geles fueron incubados durante 24 horas en un tampón específico para permitir la actividad gelatinolítica y fueron teñidos posteriormente para visualizar la degradación de la gelatina.

1.6. Determinación de los niveles de expresión de las MMP y los TIMP implicados en el desarrollo del melanoma

Para completar los resultados obtenidos sobre el papel de las MMP en las líneas celulares de melanoma nos propusimos estudiar, mediante RT-qPCR, la expresión de MMP-2 y MT1-MMP y sus inhibidores (TIMP-1 y TIMP-2) que son las que hasta el momento se han relacionado más estrechamente con el desarrollo del melanoma.

Los resultados de la expresión relativa de MMP-2 obtenidos mediante RT-qPCR indican que la línea celular A375 expresa niveles significativamente mayores de ARNm de MMP-2 que el resto de líneas. Los resultados sobre la expresión relativa de MT1-MMP evidenciaron que la línea de melanoma MEL-HO presenta niveles transcritos de ARNm de MT1-MMP mayores que el resto de las líneas que presentan niveles similares entre ellas. En cualquier caso, no existen diferencias significativas entre los niveles de ARNm de las cuatro líneas. En cuanto a la cuantificación de la expresión génica de los inhibidores de metaloproteasas, TIMP-1 muestra una diferencia significativa de expresión en la línea celular A375 respecto al resto de líneas celulares. Por otro lado, la expresión de TIMP-2 no muestra diferencias significativas, aunque en las líneas MEL-HO y COLO-800 aparece una expresión mayor que en A375 y HT-144 (Figura 30).

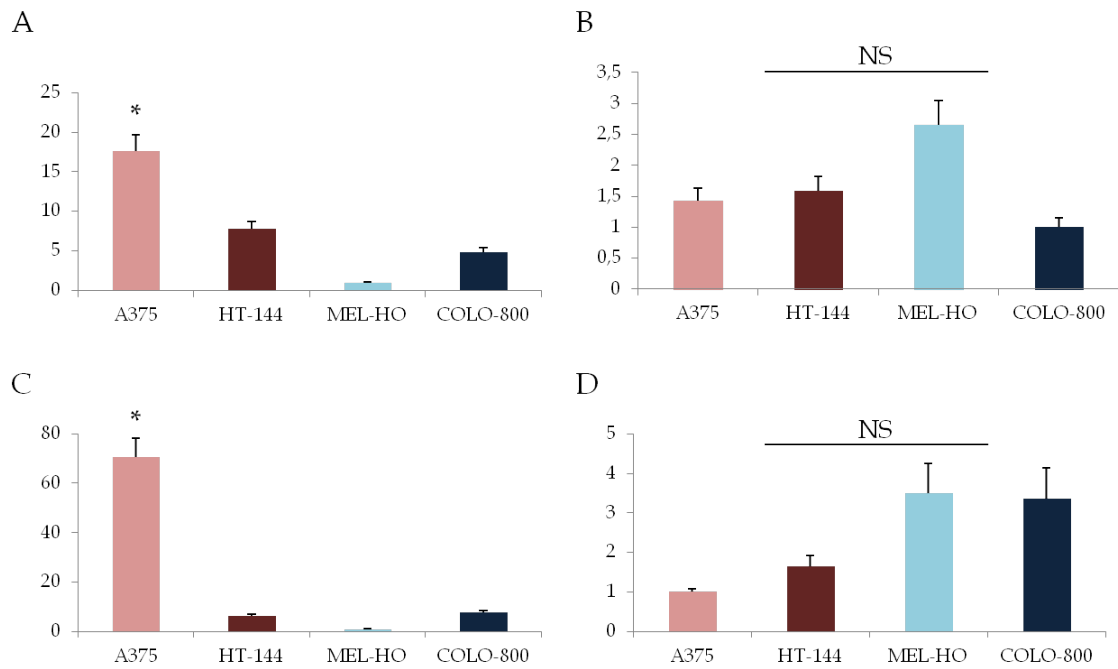


Figura 30. Niveles de expresión relativa de MMP2 (A), MT1-MMP (B), TIMP-1(C) y TIMP-2 (D). La cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR muestra una sobreexpresión del gen MMP2 (A) y del gen TIMP-1 (C) estadísticamente significativa únicamente en la línea de melanoma A375 con respecto al resto de líneas celulares de melanoma. La cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR de los genes MT1-MMP (B) y TIMP-2 (D) no muestra ninguna diferencia significativa entre las cuatro líneas de melanoma humano estudiadas. $p < 0,05$; NS: No significativo.

2. EFECTO DE ANXA5 EN LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA MOTILIDAD CELULAR

Con el objetivo de obtener mayor información sobre el papel de ANXA5 en la motilidad e invasión celular de las células de melanoma, nos propusimos analizar la expresión de 84 genes implicados en procesos como la quimiotaxia, la adhesión celular, la señalización mediada por integrinas, la formación de proyecciones celulares y la proteólisis entre otros. Para ello, empleamos el RNA extraído de células MEL-HO transfectadas con el siRNA específico de ANXA5 o con siRNA control. En la figura 31 se muestran los incrementos de expresión más notables, tanto positivos como negativos, de los genes incluidos en el análisis.

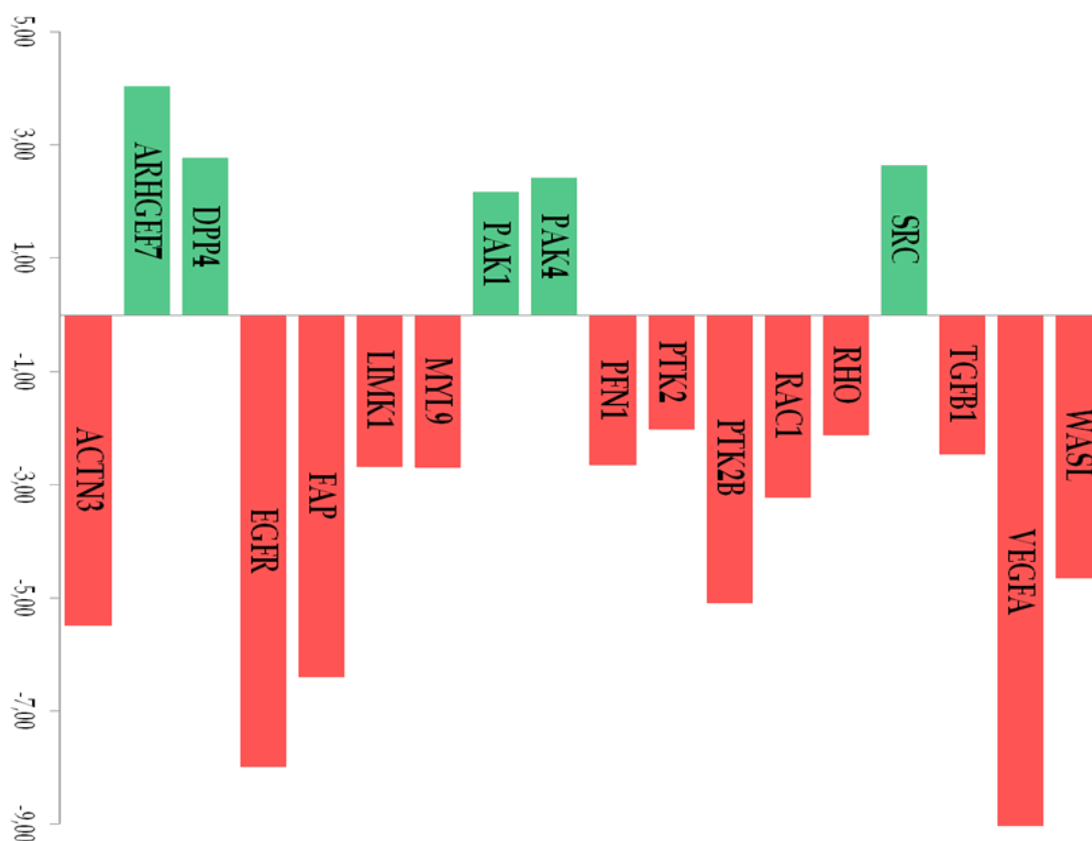


Figura 31. Modulación de la expresión génica debido al silenciamiento de ANXA5 en las células de melanoma. Expresión de genes modulados por ANXA5 cuantificados por RT-qPCR, empleando un *array* comercial (Qiagen). Se muestran los genes cuya expresión sufrió un incremento mayor ± 2 veces tras el silenciamiento de ANXA5. El control sin silenciamiento se tomó como referencia (=1). El color rojo indica una disminución de la expresión del gen y el color verde indica un incremento.

Entre los genes que sufren una sobreexpresión se encuentran: *ARHGEF7* (*Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF)7*), también denominado β PIX; *DPP4* (*Dipeptidyl-Peptidase 4*); *PAK1* (*p21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 1*); *PAK2* (*p21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 2*) y *SRC* (*V-Src Avian Sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) Viral Oncogene Homolog*). Entre ellos cabe destacar el aumento en la expresión del gen *ARHGEF7* que experimenta un aumento de 4,04 veces.

Entre los genes que sufren una disminución de la expresión se encuentran: *ACTN3* (*Actinin a3*); *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*); *FAP* (*Fibroblast Activation protein a*) también denominado 170 kDa *Melanoma Membrane-Bound Gelatinase*; *LIMK1* (*LIM Domain Kinase 1*); *MYL9* (*Myosin, Light Chain 9*); *PFN1* (*Profilin 1*); *PTK2* (*Protein Tyrosin Kinase 2*); *PTK2 β* (*Protein Tyrosin Kinase 2 β*); *RAC1* (*Ras-related C3 Botulinum Toxin substrate 1*); *RHO* (*Rhodopsin*); *TGF β 1* (*Transforming growth factor β 1*); *VEGFA* (*Vascular Endothelial growth factor A*); *WASL* (*Wiskott-Aldrich Syndrome-like*). Entre ellos destacan *FAP*, *PTK2 β* , *RAC1*, *VEGFA* y *WASL* con disminuciones en su expresión de 6,38; 5,08; 3,23; 9,09; y 4,64 veces.

Al llevar a cabo el análisis de los todos datos obtenidos de los genes, *ACTN3* y *EGFR* quedaron excluidos, porque los valores Ct obtenidos son relativamente altos (<30) para una condición y relativamente bajos (<30) para la otra condición. Por ello el valor de cambio puede tener variaciones y no puede considerarse válido.

Los genes que han mostrado una expresión diferencial entre las células MEL-HO transfectadas con siRNA específico para ANXA5 y MEL-HO transfectadas con siRNA control, se pueden clasificar en diferentes grupos de acuerdo a sus funciones (Figura 32). La mayoría de los genes no pertenecen únicamente a un grupo funcional, sino que pueden estar relacionados con varias funciones; por ejemplo, *VEGFA*, que participa tanto en la formación de proyecciones celulares como en la quimiotaxis y también ejerce como factor de crecimiento. Una vez realizado este agrupamiento funcional, destaca que la mayor parte de los genes

que han alterado su expresión tras el silenciamiento de ANXA5 se relacionan con las proyecciones celulares, las moléculas de adhesión y con las GTPasas de la familia Rho.

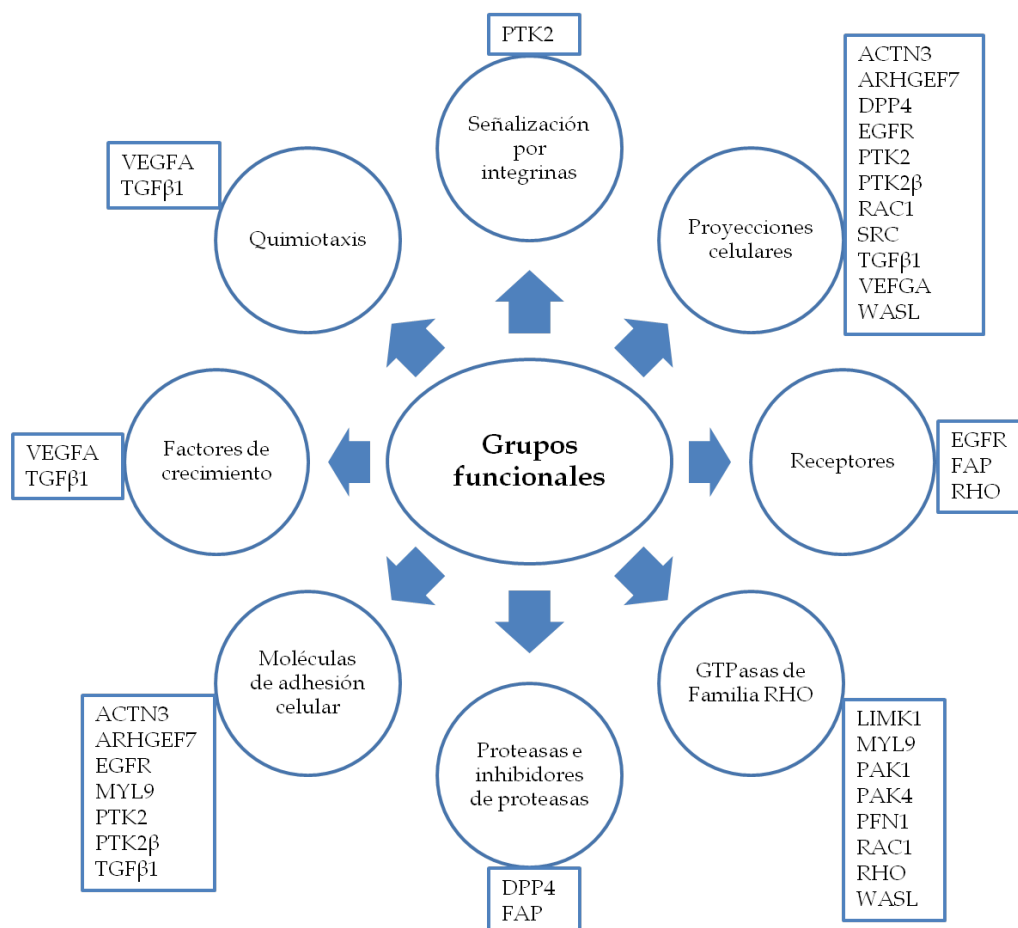


Figura 32. Clasificación funcional de los genes modulados por el silenciamiento de ANXA5 en la línea celular MEL-HO de melanoma humano.

Una vez identificados los genes que modifican su expresión tras el silenciamiento de ANXA5 en la línea celular MEL-HO, y tras estudiar la información disponible en cuanto a las funciones que desempeñan las proteínas que codifican estos genes, el siguiente paso fue analizar si estos cambios se reflejan a nivel proteico. Por lo tanto, se realizaron western blots para las proteínas ARHGEF7, FAP, PTK2β, RAC1, VEGFA y WASL sobre las 4 líneas celulares de melanoma utilizadas durante todo el trabajo; en el caso de las líneas con alta expresión de

ANXA5 (MEL-HO y COLO-800) también se incluyeron lisados de células transfectadas con siRNA específico para ANXA5.

2.1. Proteína ARHGEF7

La proteína ARHGEF7 (también conocida como β PIX) se identificó inicialmente como una proteína que interactúa con los miembros de la familia PAK (*p21-activated kinases*) y posteriormente se demostró que pertenece al grupo de factores GEF (*Guanine nucleotide-Exchange Factors*) (Manser y cols, 1998). ARHGEF7 se hace visible en el western blot mediante una banda inmunorreactiva de 90 kDa (Figura 33). Las líneas celulares de baja expresión de ANXA5, A375 y HT-144, poseen niveles de ARHGEF7 que difieren notablemente. En las células MEL-HO se observa un aumento llamativo de la cantidad de proteína ARHGEF7 cuando éstas son silenciadas para ANXA5, respecto de las control no silenciadas. Este cambio en la cantidad de proteína es concordante con los resultados obtenidos en el *array* de expresión, en el cual la cantidad de mRNA para ARHGEF7 se incrementa 4 veces en la condición silenciada. Finalmente, la línea celular COLO-800, cuya expresión de ANXA5 es similar a la línea celular MEL-HO, no sufre alteración en la cantidad de proteína ARHGEF7 tras el silenciamiento de ANXA5.

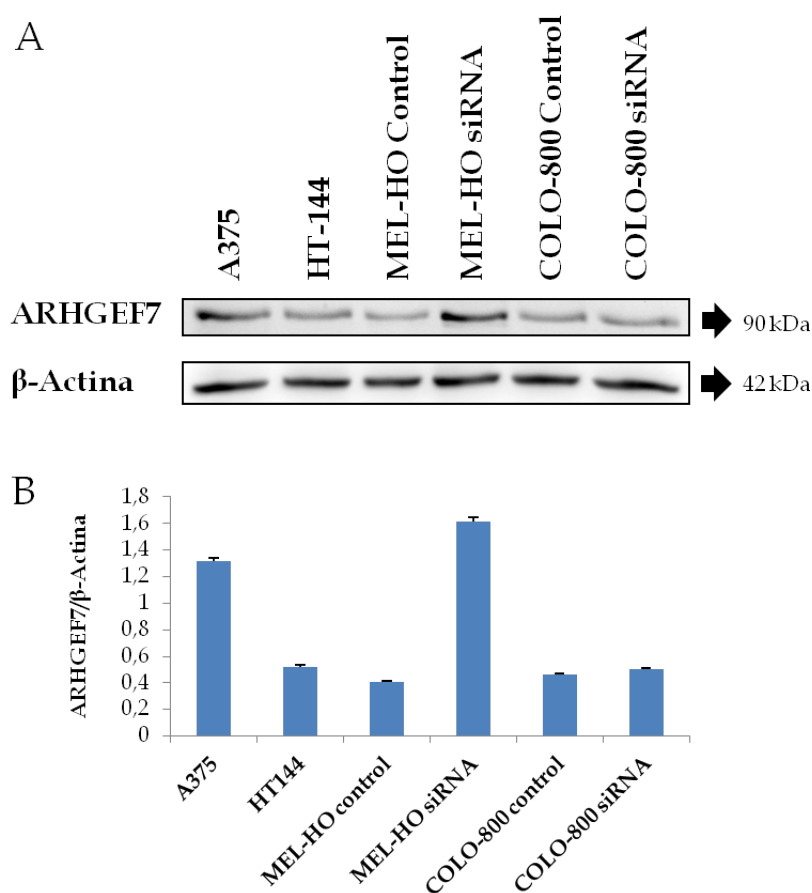


Figura 33. Niveles de expresión de ARHGEF7 en líneas de celulares de melanoma. (A) Análisis mediante western blot. Se utilizó β -actina como control de carga. Se muestra un western blot representativo de 2 experimentos realizados independientemente. (B) Cuantificación del nivel proteico mediante análisis densitométrico de los blots, tomándose como normalizador la cantidad de β -actina. Los datos se corresponden a la media \pm DS de 2 experimentos independientes.

2.2. Proteína FAP

La proteína FAP (denominada también Seprasa) fue originalmente identificada en una línea celular de melanoma humano (Fodstad y cols., 1988). Esta proteína se ha relacionado con el comportamiento metastático de varios tumores, incluido el melanoma, porque posee actividad gelatinasa (Monsky y cols., 1994). FAP es detectada como una banda inmunorreactiva de 88 kDa (Figura 34). Las líneas celulares de baja expresión de ANXA5, A375 y HT-144, presentan cantidades similares de proteína FAP. Por otro lado, la línea celular MEL-HO muestra un leve descenso en la cantidad de proteína FAP tras el silenciamiento de ANXA5.

Esta leve disminución de proteína se corresponde con los resultados obtenidos en el *array*, aunque no del modo esperado, ya que el *array* arrojaba un valor de 6,38 veces menor y la variación a nivel proteico es muy baja. Por último, la línea celular COLO-800 también sufre un descenso en la cantidad de proteína detectada en el western blot. En el análisis densitométrico se aprecia de un modo más claro la diferencia entre las condiciones control y silenciadas de la línea COLO-800 (Figura 34 B). Por lo tanto, en las dos líneas celulares con alta expresión de ANXA5, MEL-HO y COLO-800, su silenciamiento provoca una disminución de la proteína FAP.

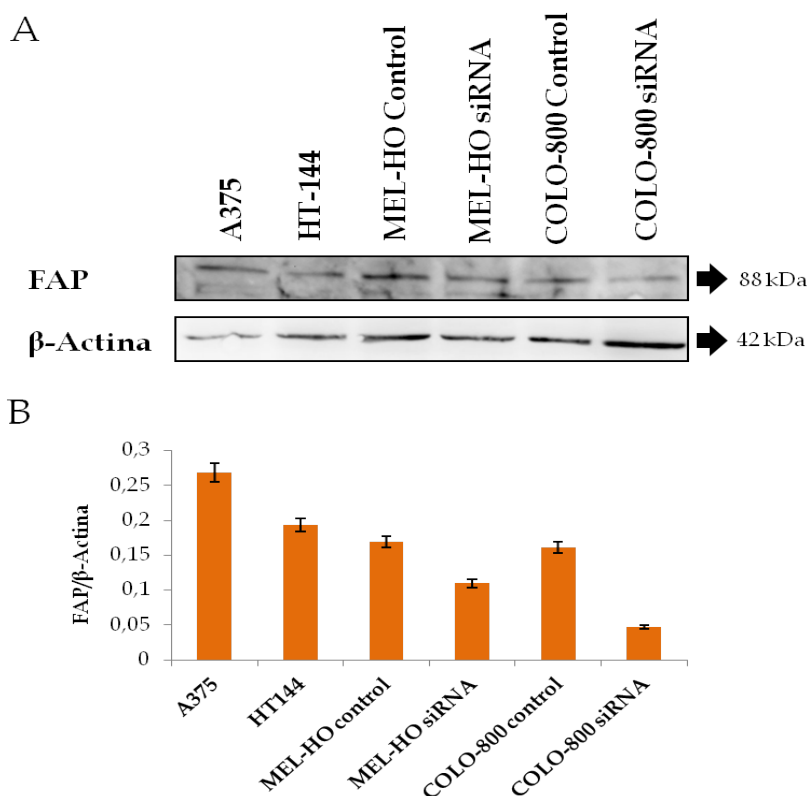


Figura 34. Niveles de expresión de FAP en líneas de celulares de melanoma. (A) Análisis mediante western blot. Se utilizó β -actina como control de carga. Se muestra un western blot representativo de 3 experimentos realizados independientemente. (B) Cuantificación del nivel proteico mediante análisis densitométrico de los blots. Los datos se corresponden a la media \pm DS de 3 experimentos independientes.

2.3. Proteína PTK2 β

La proteína PTK2 β (también conocida como PYK2) es una proteína citoplasmática de la familia FAK (Focal Adhesion Kinase) implicada en la adhesión celular, la morfología celular, la migración y la invasión (Du y cols., 2001). La proteína PTK2 β es detectada como una banda inmunorreactiva de 116 kDa en la figura 35. Las líneas celulares A375 y HT-144 muestran, de nuevo, diferencias entre la cantidad de proteína PTK2 β , siendo la cantidad de proteína PTK2 β más elevada en los lisados celulares de A375 que en los de HT-144. En el caso de la línea celular MEL-HO, las diferencias que existen entre la condición control y la condición silenciada son pequeñas. De nuevo, este ligero descenso en la cantidad de proteína es acorde con los resultados obtenidos en el *array*, pero en menor medida, ya que el valor de cambio es de 5 veces menor y la variación a nivel proteico es muy baja. Respecto a la línea celular COLO-800, entre las dos condiciones estudiadas no se manifiestan diferencias notables.

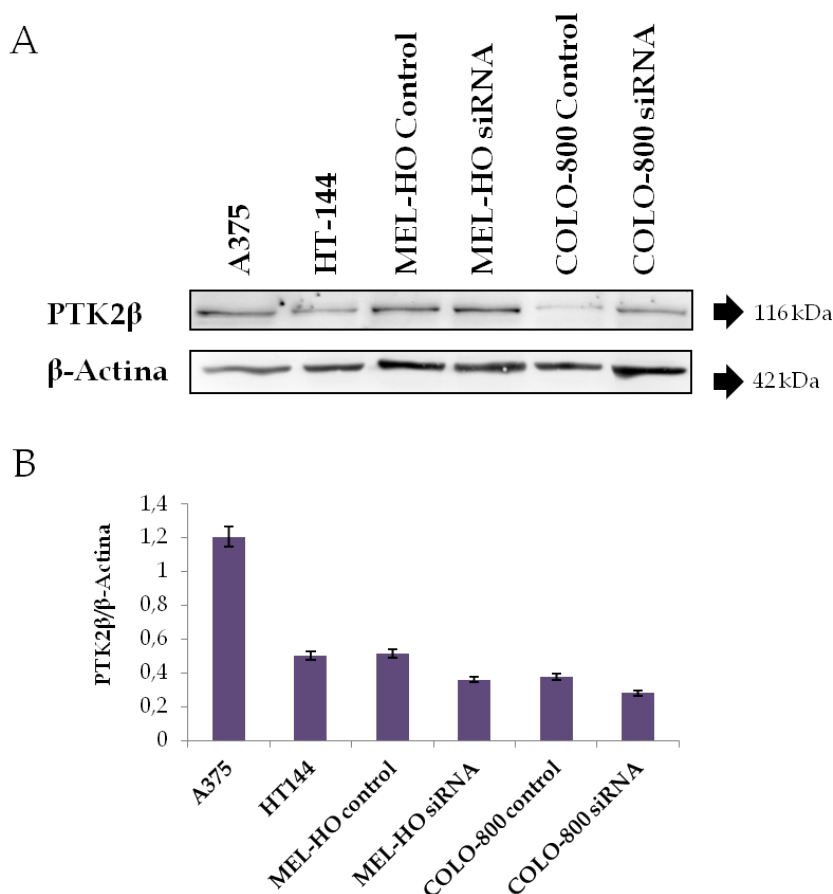


Figura 35. Niveles de expresión de PTK2B en líneas de celulares de melanoma. (A) Análisis mediante western blot. Se utilizó β -actina como control de carga. Se muestra un western blot representativo de 2 experimentos realizados independientemente. (B) Cuantificación del nivel proteico mediante análisis densiométrico de los blots. Los datos se corresponden a la media \pm DS de 2 experimentos independientes.

2.4. Proteína RAC1

La proteína RAC1 es un miembro ampliamente estudiado de la familia Rho GTPasas, que controla procesos fundamentales de las células como la reorganización del citoesqueleto de actina, adhesión celular, migración y ciclo celular, entre otras (Cardama y cols., 2014). RAC1 es detectada como una banda inmunorreactiva de 21 kDa, como se puede observar en la figura 36. Las líneas celulares A375 y HT-144 presentaron cantidades similares de la proteína. En el caso de la línea celular MEL-HO, la condición control muestra una mayor cantidad de proteína RAC1 que la condición silenciada para ANXA5. Este resultado es concordante con los resultados obtenidos en el *array*, que mostraban

un valor de cambio de 3,23 veces menor. En último lugar, la línea celular COLO-800 no muestra variación en la cantidad de RAC1 entre las condiciones estudiadas, por lo que el silenciamiento de ANXA5 no parece actuar de igual modo en las dos líneas celulares con alta expresión de la misma.

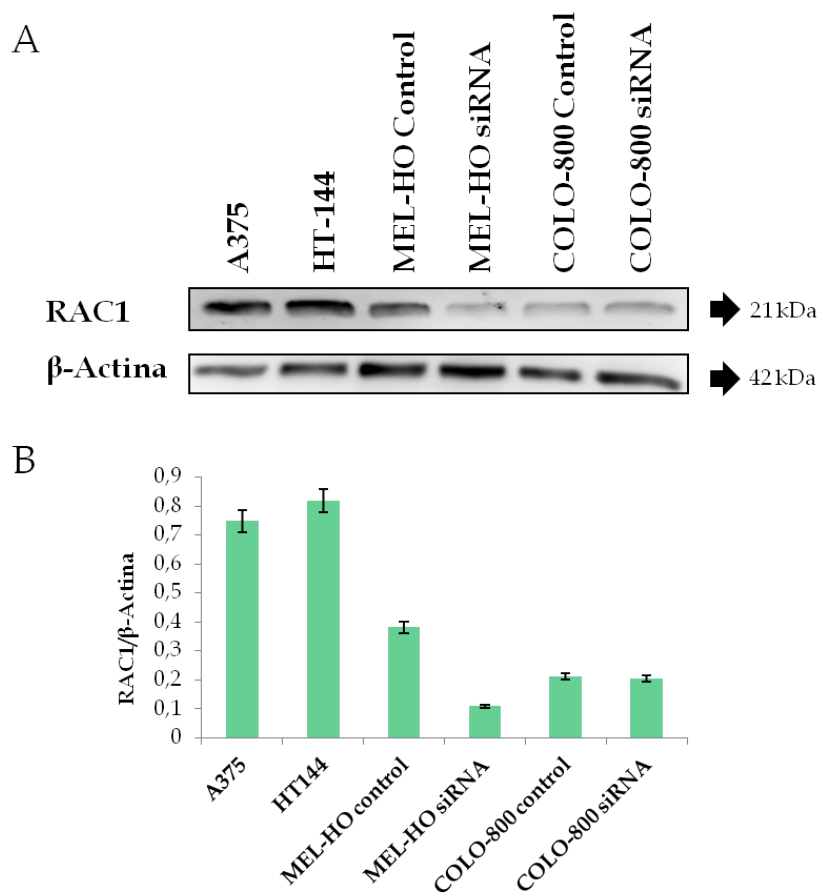


Figura 36. Niveles de expresión de RAC1 en líneas de celulares de melanoma. (A) Análisis mediante western blot. Se utilizó β -actina como control de carga. Se muestra un western blot representativo de 2 experimentos realizados independientemente. (B) Cuantificación del nivel proteico mediante análisis densiométrico de los blots. Los datos se corresponden a la media \pm DS de 2 experimentos independientes.

2.5 Proteína VEGFA

La proteína VEGFA (en origen denominada VEGF) fue identificada y aislada como un mitogéno específico de células epiteliales con capacidad de inducir tanto fisiológicamente como patológicamente el proceso de angiogénesis (Leung y cols., 1989; Tischer y cols., 1989). En el ensayo de inmunodetección de la proteína VEGFA se observa una señal clara de 21 kDa correspondiente a la misma. Las líneas celulares A375 y HT-144 muestran una expresión muy marcada de la proteína, y similar entre ambas líneas celulares (Figura 37). Los resultados para la línea celular MEL-HO muestran que ambas condiciones, control y silenciada para ANXA5, presentan una cantidad de proteína VEGFA similar. Esto contradice los resultados obtenidos en el *array* de expresión, ya que el valor de cambio de expresión era de 9 veces menor. Por último, la línea COLO-800 presenta un resultado llamativo, ya que la condición control muestra valores inferiores de proteína VEGFA que la condición silenciada. Por lo tanto, el silenciamiento de ANXA5 actúa de manera muy dispar sobre las líneas celulares que poseen alta expresión de ANXA5.

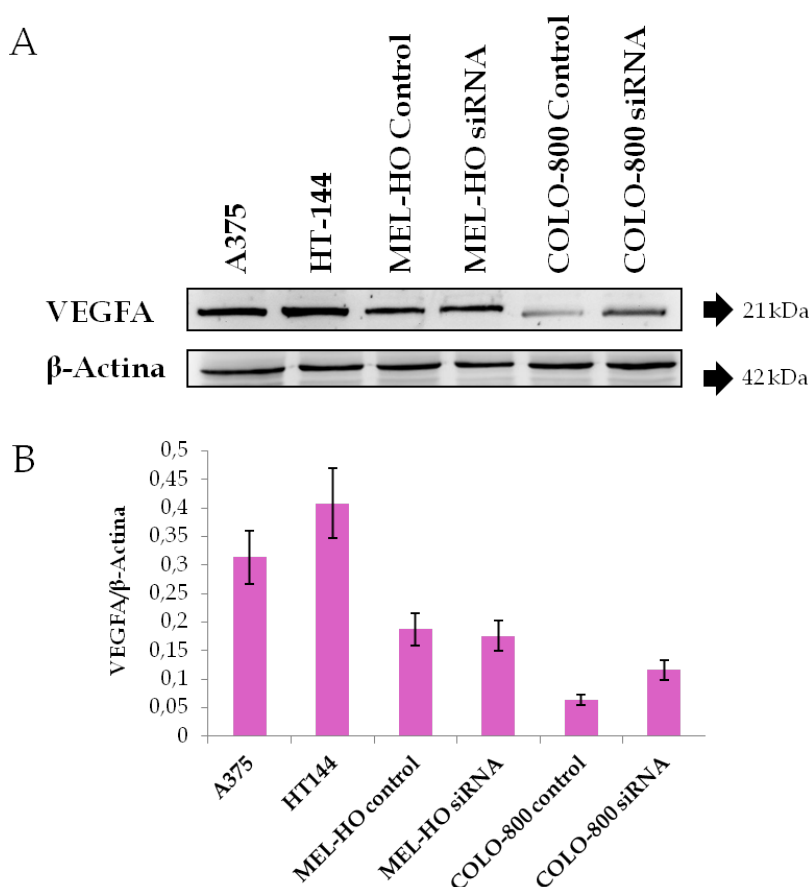


Figura 37. Niveles de expresión de VEGFA en líneas de celulares de melanoma. (A) Análisis mediante western blot. Se utilizó β -actina como control de carga. Se muestra un western blot representativo de 3 experimentos realizados independientemente. (B) Cuantificación del nivel proteico mediante análisis densiométrico de los blots. Los datos se corresponden a la media \pm DS de 3 experimentos independientes.

2.6 Proteína WASL

La proteína WASL (también denominada N-WASP) destaca por su papel en la regulación del citoesqueleto de actina (Rohatgi y cols., 1999). Esta proteína se hace visible en el western blot mediante una banda inmunorreactiva de 65 kDa, como se puede observar en la figura 38. Las líneas con baja expresión de ANXA5, A375 y HT-144, muestran distinta cantidad de proteína WASL, mostrando la línea A375 una cantidad que triplica la proteína WASL de la línea HT-144. La validación mediante western blot en la línea MEL-HO mostró un marcado aumento de la proteína WASL en la condición silenciada frente a la condición

control. Este resultado de nuevo es discordante con lo obtenido en el *array* de expresión, ya que el valor de cambio de expresión para WASL es de 4,64. Finalmente, la cantidad de WASL encontrada en las dos condiciones para la línea celular COLO-800 es similar. Estos resultados sugieren que el silenciamiento de ANXA5 actúa de modo diferente sobre las líneas celulares que poseen alta expresión de la misma, y que en el caso de la línea MEL-HO puede existir una alteración en los mecanismos de degradación de la proteína que permite su acumulación.

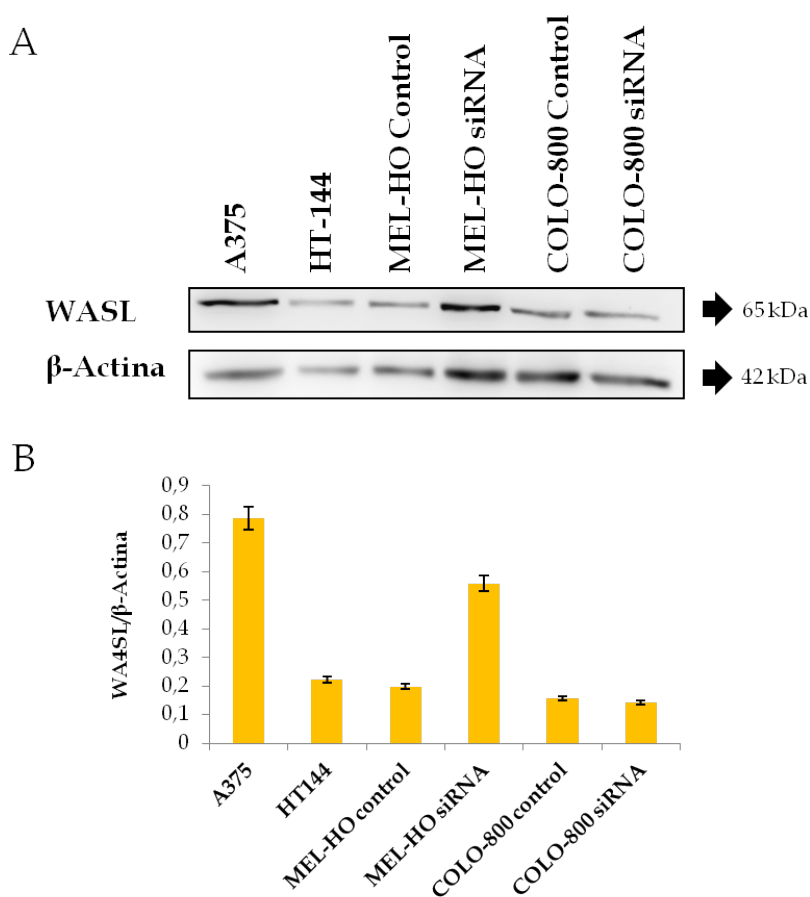


Figura 38. Niveles de expresión de WASL en líneas celulares de melanoma. (A) Análisis mediante western blot. Se utilizó β -actina como control de carga. Se muestra un western blot representativo de 2 experimentos realizados independientemente. (B) Cuantificación del nivel proteico mediante análisis densiométrico de los blots. Los datos se corresponden a la media \pm DS de 2 experimentos independientes.

3. NIVELES SÉRICOS DE ANXA5 EN PACIENTES CON MELANOMA Y SU RELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD

Se analizaron los niveles de ANXA5 en el suero de pacientes diagnosticados de melanoma cutáneo en diferentes estadios y evolución clínica. Mediante inmunoensayo enzimático, se cuantificó la cantidad de ANXA5 en el suero de los pacientes obtenido en el momento del diagnóstico de melanoma. Como el estudio ha sido retrospectivo hemos podido dividir los pacientes en dos grupos de acuerdo a su evolución clínica: pacientes con buena evolución, aquellos con más de 5 años libres de enfermedad tras la extirpación del melanoma primario, y pacientes con melanoma de evolución metastática, aquellos pacientes que desarrollaron metástasis durante los dos primeros años de seguimiento tras la exéresis quirúrgica. También se analizaron simultáneamente como controles, el suero de 49 individuos sanos. Los sueros de todos los grupos de estudio recogidos, alicuotados y almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, como se explica en el apartado de Material y Métodos, se descongelaron antes de la realización de los ensayos.

3.1. Características clínicas del grupo de pacientes con melanoma

Los niveles en suero de ANXA5 fueron determinados en un total de 155 pacientes diagnosticados de melanoma (43,9% hombres y 56,1% mujeres). Los datos clínicos de los pacientes diagnosticados de melanoma se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 20. Datos clínicos de los pacientes diagnosticados con melanoma.

	N (%)	Sexo (M / F)
	155 (100%)	68 / 87
Estadio (a)		
I	83 (53,55%)	37 / 46
II	54 (34,84%)	24 / 30
III	18 (11,61%)	8 / 10

(a) Estadiaje de acuerdo a la AJCC.

Los pacientes con melanoma presentan, en la mayor parte de los casos, estadios tempranos del desarrollo tumoral en el momento del diagnóstico de la enfermedad, que corresponden a estadios I y II de acuerdo a la clasificación AJCC. De los 155 pacientes estudiados, 137 (88,39%) presentaron estadios I y II y solamente 18 pacientes (11,61%) fueron diagnosticados en el estadio III. En el presente estudio no se incluyeron pacientes con melanoma *in situ* ni pacientes de melanoma en estadio IV.

En relación al sexo el melanoma es más frecuente en mujeres, especialmente en los estadios iniciales, igualándose la frecuencia entre sexos en estadios más avanzados.

Los pacientes con melanoma fueron, además, clasificados en cinco grupos de acuerdo a la localización del tumor primario en el momento del diagnóstico de la enfermedad: en la cabeza o cuello (CC), en el tronco (TR), en las extremidades superiores (ES), en las extremidades inferiores (EI) y en manos o pies (MP). Las localizaciones mayoritarias del tumor primario fueron tronco (42,5%) y extremidad inferior (25,16%) (Figura 39).

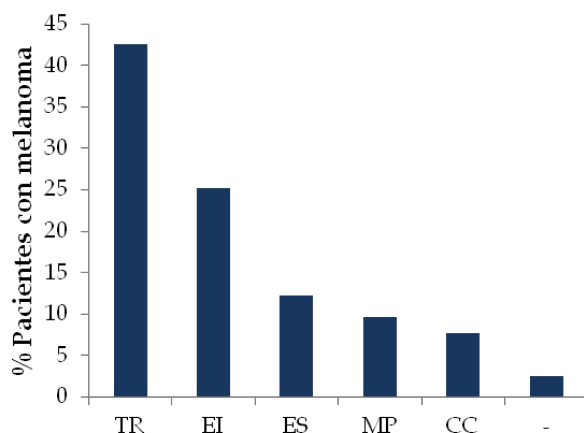


Figura 39. Clasificación de los pacientes de melanoma de acuerdo a la localización del tumor primario. TR (tronco), EI (extremidad inferior), ES (extremidad superior), MP (manos y pies), CC (cabeza y cuello) y - (aquellos en los que no se localizó el tumor primario).

Haciendo referencia al tipo de metástasis desarrollada, el 24,7% de los pacientes con evolución metastática desarrollaron metástasis en tránsito, un 46,9% desarrollaron metástasis ganglionares y un 28,4% desarrollaron metástasis a distancia (Figura 40).

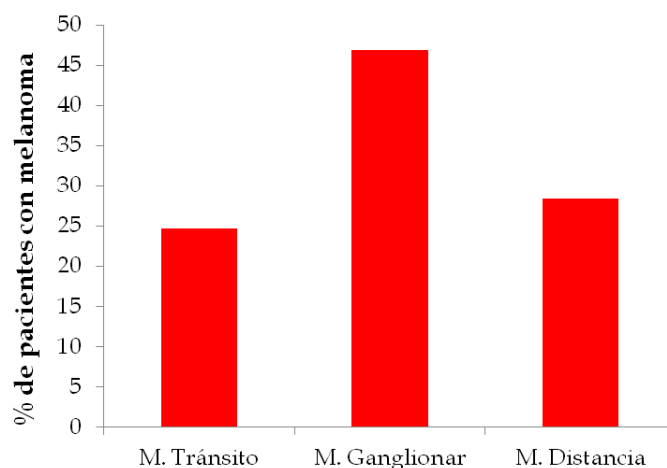


Figura 40. Clasificación de los pacientes con melanoma de acuerdo al tipo de metástasis desarrollada. Metástasis en tránsito, ganglionar o a distancia.

En resumen, los pacientes analizados se caracterizaban, en el momento del diagnóstico de la enfermedad, por presentar estadios tempranos del tumor primario (principalmente estadios I y II según la clasificación AJCC), con localizaciones tumorales mayoritariamente en tronco en los hombres y en extremidades inferiores en las mujeres. Además, los pacientes de mala evolución desarrollan metástasis ganglionar con mayor frecuencia.

3.2. Niveles séricos de ANXA5 en pacientes con melanoma en relación a la evolución clínica y al estadio del tumor primario

Tras determinar la concentración de los niveles séricos de ANXA5 tanto en el suero de pacientes de melanoma como de controles sanos mediante kits inmunoenzimáticos, los resultados fueron analizados con el fin de constatar si existían diferencias significativas entre los niveles de esta proteína en el suero de pacientes con melanoma frente controles sanos, entre los diferentes estadios tumorales y en cuanto a la evolución clínica del paciente.

Para la comparación de medias de variables entre dos grupos independientes fue utilizado el test t de Student. Esta prueba estadística es exigente sobre dos requisitos en la distribución de la variable cuantitativa que se está analizando. Por un lado el criterio de homogeneidad, por el cual la variable debe distribuirse siguiendo una distribución normal. Para comprobar este supuesto se emplea la prueba de contraste Kolmogorov-Smirnov, que plantea como hipótesis nula que los datos se distribuyen de manera normal. Por otro lado el criterio de homocedasticidad, por el cual las varianzas de la distribución de la variable de los grupos que se comparan deben ser iguales u homogéneas. Para comprobar el supuesto de homogeneidad de varianzas u homocedasticidad, el test t de Student realiza automáticamente una prueba de hipótesis para la igualdad de varianzas, la prueba F de Levene, que plantea como hipótesis nula que las varianzas de los dos grupos son iguales.

Cuando las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y F de Levene son significativas ($p < 0,05$) se asume que las variables no siguen una distribución normal y las varianzas no son homogéneas, lo que lleva a la necesidad de recurrir a pruebas estadísticas no paramétricas para la comparación de las variables entre los grupos independientes. En este caso, el test utilizado fue el test U de Mann Whitney. Por lo tanto, en el presente trabajo, la variable de estudio no se ajusta a una distribución normal ni las varianzas son homogéneas, por lo que se utilizó el test U de Mann Whitney. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 21. Niveles séricos de ANXA5 en pacientes con melanoma y controles sanos.

	N	ANXA5 (ng/ml)
Controles	49	0,75 ± 0,03
Pacientes	155	1,05 ± 0,06 *
Buena evolución	77	0,85 ± 0,049
Mala evolución	78	1,25 ± 0,10 *
ESTADIO		
I	83	1,02 ± 0,088
II	54	1,06 ± 0,095
III	18	1,16 ± 0,19

Los datos representan la media ± SE de los niveles séricos de la proteína. Para la comparación de los datos se utilizó el test U de Mann Whitney. * $p < 0,05$.

La comparación de los niveles séricos de ANXA5 entre los pacientes con melanoma y los controles sanos muestra diferencias significativas ($p < 0,05$). Tal y como muestra la figura 41, la media de los niveles de ANXA5 en el suero de los pacientes es de $1,05 \pm 0,06$ ng/ml frente a $0,75 \pm 0,03$ ng/ml en los individuos sanos. Sin embargo, la comparación entre los estadios del tumor primario no presenta diferencias significativas. La media de los pacientes cuyo tumor primario se detectó en estadio I fue de $1,02 \pm 0,088$ ng/ml; los pacientes cuyo tumor primario se diagnóstico en estadio II presentan una media de $1,06 \pm 0,095$ ng/ml; y por último, los pacientes cuyo tumor primario se diagnóstico como estadio III presentan una media de $1,16 \pm 0,19$ ng/ml.

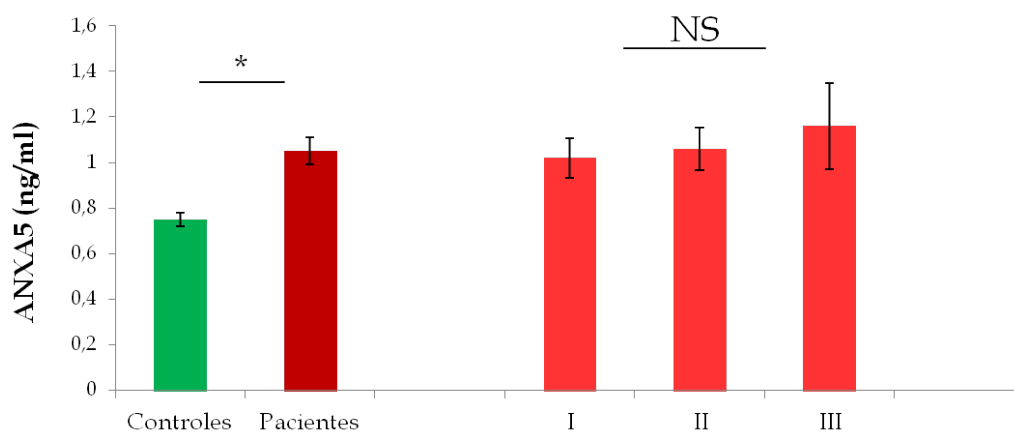


Figura 41. Comparación de los niveles séricos de ANXA5 entre pacientes (n=155) y controles sanos (n=49); y entre pacientes con diferentes estadios del tumor primario: I (n=83), II (n=54) y III (n=18). *p<0,05, NS, no significativo

Del mismo modo, se realizó la comparación de los niveles séricos de ANXA5 entre los pacientes con distinta evolución clínica y ésta pone de manifiesto diferencias significativas ($p<0,005$) (Figura 42). Los pacientes con buena evolución clínica tienen una media de $0,85 \pm 0,049$ ng/ml frente a la media de los pacientes con progresión metastática que es de $1,25 \pm 0,10$ ng/ml.

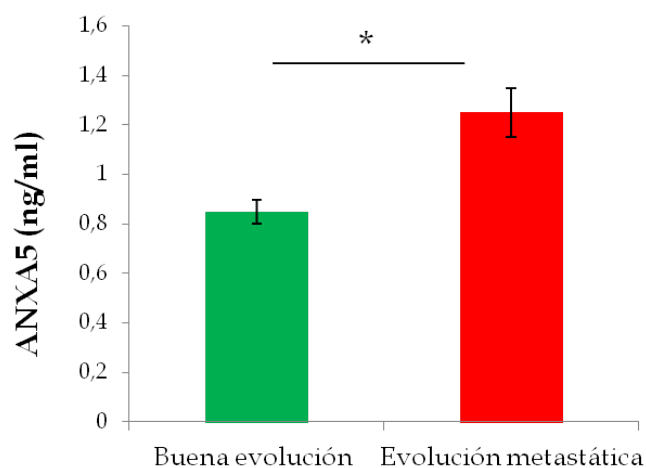


Figura 42. Comparación de los niveles séricos de ANXA5 entre los pacientes con melanoma con distinta evolución clínica.* p<0,05.

A pesar de que no existen diferencias significativas en los niveles séricos de la proteína cuando se comparan todos los pacientes por estadios, al agrupar los pacientes por estadio y por evolución, los niveles séricos de ANXA5 muestran diferencias claramente significativas (Tabla 22).

Tabla 22. Niveles séricos de ANXA5 en pacientes con estadios tempranos de melanoma.

Estadio		N (%)	ANXA5 (ng/ml)
I (n=83)	Buena evolución	61 (73,5%)	0,88 ± 0,059
	Evolución metastática	22 (26,5%)	1,43 ± 0,27 **
II (n=54)	Buena evolución	16 (29,6%)	0,69 ± 0,05
	Evolución metastática	38 (70,4%)	1,22 ± 0,12 ***

Los datos representan la media ± SE de los niveles séricos de la proteína. Para la comparación de los datos se utilizó el test U de Mann Whitney. ** p<0,01 ***p<0,000.

Se observa, por tanto, un aumento de los niveles de ANXA5 en el suero de pacientes con evolución metastática en los estadios tempranos de la enfermedad (Figura 43).

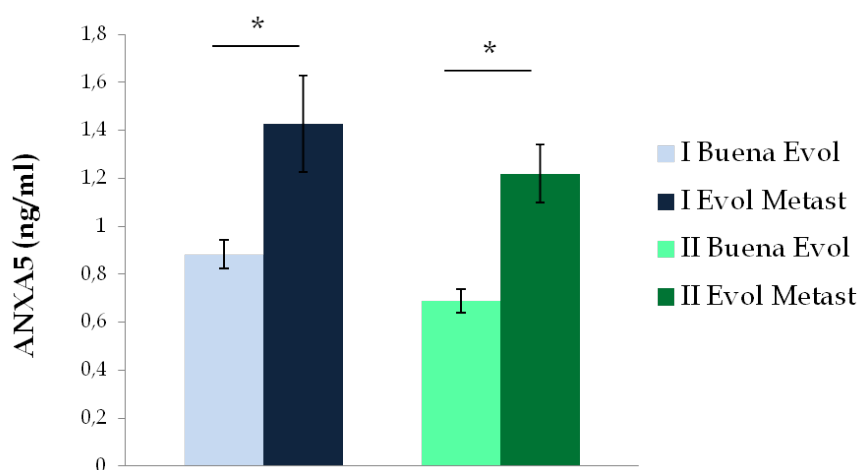


Figura 43. Comparación de los niveles séricos de ANXA5 entre los pacientes de estadios tempranos con distinta evolución clínica. I Buena Evolución (n=61), I Evolución Metastática (n=22), II Buena evolución (n=16) y II Evolución Metastática (n=38).

Por último, se analizaron los niveles de ANXA5 en el suero de los pacientes que desarrollaron metástasis, comparando los niveles séricos de los distintos tipos de metástasis que padecieron. Es significativa la diferencia entre los niveles séricos de los pacientes con metástasis en tránsito y los pacientes con metástasis ganglionar ($p=0,0013$). A su vez, también aparecen diferencias significativas entre los niveles séricos de los pacientes con metástasis en tránsito y los pacientes con metástasis a distancia ($p=0,022$) (Figura 44).

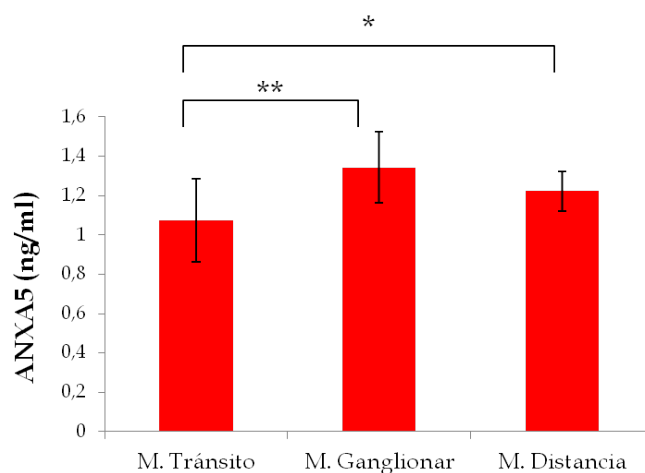


Figura 44. Comparación de los niveles séricos de ANXA5 en función del tipo de metástasis desarrollada en los pacientes de melanoma. Metástasis en tránsito ($n=19$), Metástasis ganglionar ($n=37$) y Metástasis a distancia ($n=22$). ** $p<0,01$ * $p<0,05$.

3.3. Análisis multivariante de marcadores pronóstico en pacientes con melanoma

Con el objetivo de determinar qué factores son predictivos de progresión metastásica en el melanoma se utilizó un modelo de regresión logística. Se analizaron solamente los pacientes en estadios tempranos del tumor primario (estadios I y II de acuerdo a la clasificación AJCC). Se incluyeron en el análisis como variables independientes la edad, el sexo, el estadio, el intervalo libre de enfermedad y los niveles séricos de ANXA5. Como variable dependiente la evolución clínica. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 23.

Tabla 23. Análisis multivariante de factores pronóstico en pacientes con melanoma.

Análisis de Regresión logística	
Edad	0,910
Sexo	0,311
Estadio	0,000*
ANXA5	0,001*

* Diferencias significativas $p < 0,05$

Los resultados mostraron que en pacientes con melanoma en estadios tempranos, además del estadio del tumor, los niveles séricos de ANXA5 están significativamente asociados a la evolución maligna del melanoma.

3.4. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier

Para realizar el análisis de supervivencia se dividieron a los pacientes con melanoma en dos grupos en función de los niveles séricos de ANXA5. Se calculó el valor superior del límite de normalidad para la proteína, correspondiente al valor medio de los individuos control más dos veces su desviación estándar ($\bar{x} + 2$ DS), y se comparó la supervivencia de los pacientes con niveles séricos de la proteína inferiores y superiores a dicho valor mediante el test de Long-Rank. En nuestro caso la supervivencia se refiere al intervalo libre de enfermedad cuantificado en meses.

El resultado obtenido con el test Long-Rank es significativo. Por lo tanto, los pacientes con melanoma cuyos niveles séricos de ANXA5 son inferiores a 1,20 ng/ml tienen significativamente ($p = 0,009$) mayor supervivencia que los que presentan niveles séricos superiores a 1,2 ng/ml. Los resultados se muestran en la figura 45.

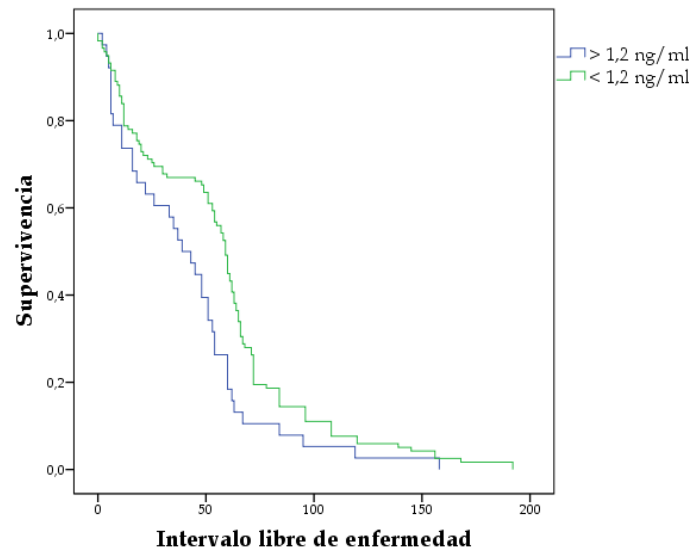


Figura 45. Curva de supervivencia Kaplan-Meier. Supervivencia en los pacientes con melanoma de acuerdo a los niveles séricos de ANXA5 ($\bar{x}+2DS$). Las diferencias son significativas de acuerdo al test de Log-Rank $p<0,01$. El intervalo libre de enfermedad está expresado en meses.

DISCUSIÓN

1. IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA ANXA5 EN LA CAPACIDAD MIGRATORIA E INVASIVA DE LAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

El melanoma cutáneo es una enfermedad muy agresiva que representa el 80% de las muertes derivadas de cáncer de piel (Miller y Mihm, 2006). Este carácter tan agresivo se manifiesta como un gran potencial de diseminación a pesar de partir de masas tumorales pequeñas (Meier y cols., 2002; Mohr y cols., 2009). El melanoma cutáneo se produce, la mayoría de las veces, a partir de los melanocitos distribuidos en la capa basal de la epidermis. También existen melanomas que se producen a partir de *nevi* preexistentes, aunque en porcentajes bajos (0,03% para hombres y 0,009% para mujeres) (Goldstein y Tucker, 2013). El melanoma se produce a partir de una población clonal de melanocitos que proliferan de manera aberrante, lo que se denomina lesión hiperplásica, que normalmente no progresa debido a la senescencia celular (Gray-Schopfer y cols., 2007). Una vez que la senescencia es superada, el *nevus* exhibe displasia y, posteriormente, puede progresar a una etapa de difusión superficial (fase de crecimiento radial (RGP)) que se limita a la epidermis y tiene potencial invasor bajo. Finalmente, las células adquieren la capacidad de invadir la dermis (fase de crecimiento vertical (VGP)) y pueden dar lugar a metástasis (Miller y Mihm, 2006).

La progresión tumoral hacia una metástasis es una sucesión de eventos que comienza con una invasión local de los tejidos adyacentes y de la matriz extracelular, seguida de una intravasación de las células tumorales a los vasos sanguíneos en los cuales tienen que sobrevivir en las condiciones del torrente sanguíneo. Posteriormente tiene lugar la extravasación en tejidos distantes, y finaliza con la colonización de órganos distantes (Valastyan y Weinberg, 2011; Chapman y cols., 2014).

La capacidad de migración celular es necesaria y fundamental durante la embriogénesis y la homeostasis de organismos multicelulares. Las células de la cresta neural, de las cuales derivan los melanocitos, modifican sus propiedades adhesivas, su morfología y las uniones celulares con el objetivo de adquirir

motilidad celular durante su migración hasta sus destinos finales. Esto es posible gracias a la modulación de la expresión de las cadherinas a través de la acción de factores de transcripción como Snail2 y Foxd3 (Kerosuo y Bronner-Fraser, 2012).

El proceso de migración desde la cresta neural utiliza varios procesos celulares que incluyen la invasión, la transición epitelio-mesénquima (TEM), la pluripotencia y la determinación del destino celular (Hu y cols., 2014). Algunos de estos procesos, como la invasión celular y la TEM, contribuyen a la progresión maligna del melanoma y están comúnmente asociados a la aparición de metástasis (Denecker y cols., 2014). Estudios recientes sugieren que el alto grado de plasticidad y la naturaleza agresiva del melanoma maligno derivan de una aberrante activación de genes involucrados en el desarrollo embrionario, que típicamente se silencian a través del proceso normal de diferenciación de los melanocitos (Hendrix y cols., 2007; Strizzi y cols., 2011; Bailey y cols., 2012).

Por otro lado, cada vez son más los estudios que demuestran que las anexinas están implicadas en procesos patológicos y más concretamente en procesos tumorales, desarrollando papeles importantes en el desarrollo de los tumores, en el proceso metastático y en la resistencia a fármacos (Guo y cols., 2013; Biao xue y cols., 2014; Peng y cols., 2014; Wu y cols., 2014). Entre las funciones fisiológicas en las que participan las anexinas se encuentran la transducción de señales, la proliferación celular, los procesos apoptóticos, los procesos de inflamación y la diferenciación celular, entre otros. El conjunto de los trabajos publicados, ha permitido proponer (Pan y cols., 2013; Huang y cols., 2014; Liu y cols., 2014; Yang y cols., 2015), y en algunos casos demostrar (Belvedere y cols., 2014; Pimiento y cols., 2015; Tristante y cols., 2015), que las anexinas contribuyen a eventos tales como la migración y la invasión de tejidos que se produce durante la progresión metastática. De entre los miembros de la familia de anexinas, la anexina A1 ha sido objeto de múltiples estudios y se ha relacionado con la diseminación del melanoma, la invasión y migración de las células de carcinoma de páncreas y con la capacidad invasiva de cánceres gástricos (Cheng y cols., 2012; Belvedere y cols., 2014; Boudhraa y cols., 2014). Dependiendo del tipo de tumor, algunos miembros

de la familia de las anexinas se encuentran reprimidos mientras que otros miembros se sobreexpresan (Deng y cols., 2013). Por ejemplo, Wehder y colaboradores demostraron que la ANXA5 regula la capacidad invasiva del carcinoma oral (Wehder y cols., 2009). En el caso concreto del melanoma, poco se conoce sobre la relación entre las anexinas y la progresión tumoral. Es por ello que en el presente trabajo hemos estudiado la relación directa entre la expresión de la proteína ANXA5 y la capacidad migratoria e invasiva de las células de melanoma.

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, en los cuales se buscaba identificar proteínas diferencialmente expresadas entre líneas celulares de melanoma y melanocitos no tumorales, evidenciaron que la proteína ANXA5 se encuentra diferencialmente expresada entre las diferentes líneas de melanoma. Este resultado se validó en 10 líneas celulares de melanoma y 5 de melanocitos. Al analizar la expresión de la proteína mediante western blot y la expresión relativa a nivel de ARNm, se observaron dos perfiles claros entre las distintas líneas de melanoma. Un grupo de líneas celulares de melanoma mostraba valores de expresión significativamente elevados frente a la expresión de los melanocitos, mientras que otro grupo de líneas celulares de melanoma mostraba valores de expresión significativamente disminuidos respecto a los melanocitos (Arroyo-Berdugo y cols., 2014). Estos resultados nos hicieron plantear si la expresión de ANXA5 podría estar discriminando aquellos melanomas con mayor capacidad invasiva.

En primer lugar, seleccionamos líneas de melanoma con expresión de ANXA5 significativamente distinta: dos líneas celulares de melanoma (A375 y HT-144) con baja expresión de ANXA5 y otras dos líneas celulares de melanoma (MEL-HO y COLO-800) con alta expresión de ANXA5. Los resultados muestran claramente una relación entre la expresión de la proteína y la capacidad migratoria e invasiva de las líneas celulares. Es decir, las líneas celulares con mayor expresión de ANXA5 presentan mayor capacidad intrínseca migratoria e invasiva. En cambio, los resultados obtenidos en ensayos de proliferación celular indican que todas las

líneas celulares de melanoma poseen tasas de proliferación similares, independientemente de la expresión de ANXA5.

El papel que desempeñan las anexinas en la proliferación de las células tumorales no está aclarado, y en el caso de ANXA5 no existen trabajos previos que la relacionen con la proliferación. Sobre otros miembros de la familia de las anexinas y en otros tipos de cáncer sí se dispone de más información pero no sin controversia. Así, una supresión de la expresión de ANXA2 inhibe la proliferación *in vitro* e *in vivo* en células de hepatoma, en células de glioma y en células de adenocarcinoma de ovario (Zhai y cols., 2011; Mogami y cols., 2013; Zhang y cols., 2013; Dong y cols., 2014). La expresión de ANXA1, por otro lado, inhibe el crecimiento tumoral en casos como el cáncer de mama o el carcinoma escamoso de laringe (Ang y cols., 2009; Gastardelo y cols., 2014).

Con motivo de analizar en profundidad si la expresión de ANXA5 en las células de melanoma afecta a estos parámetros, llevamos a cabo un silenciamiento de ANXA5 mediante ARN de interferencia. Un hallazgo importante de este trabajo ha sido que el silenciamiento de ANXA5 en las líneas celulares de melanoma produce una disminución notable tanto en la capacidad migratoria como en el potencial invasivo. Si bien no hemos podido determinar los mecanismos moleculares implicados, es probable que esta función que favorece la evolución tumoral sea consecuencia de que ANXA5 interfiera en o regule procesos que aumentan la capacidad celular de invadir tejidos cercanos. El silenciamiento de ANXA5, en la línea celular MEL-HO no modificó su tasa proliferativa. Estos resultados son coherentes con los obtenidos previamente de las cuatro líneas celulares con diferente expresión de ANXA5.

En base a nuestros resultados previos y a todos los datos expuestos anteriormente, la hipótesis que nos planteamos fue que en las células de melanoma ANXA5 no desempeña únicamente funciones de señalización o estabilización de membrana, sino que es capaz de inducir *in vitro* una respuesta motogénica y favorecer con ello la capacidad tumorigénica de las células de melanoma.

El análisis sobre la actividad invasiva inducida por ANXA5 en las células de melanoma no estaría completo sin determinar la expresión y actividad de proteínas tan importantes en la remodelación de la matriz extracelular como son las proteasas de la familia de las metaloproteasas (MMP). Las alteraciones en los mecanismos de adhesión, la adquisición por parte de las células de la capacidad de migración e invasión así como la existencia de procesos de proteólisis y degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular, son fundamentales para el proceso metastático de la enfermedad tumoral (Cascales-Angosto y Álvarez-Gómez, 2010).

En el melanoma tanto las células tumorales como las células estromales asociadas a tumores muestran un aumento de la expresión de varias MMP, así como de sus inhibidores tisulares (TIMP) (Hoffman y cols., 2005). La degradación y la remodelación de la ECM durante la metástasis del melanoma permiten a las células tumorales invadir el espacio extracelular circundante, propagarse a través de la circulación linfática o vascular y extravasarse a órganos distantes. Por la contribución de las MMP a la migración e invasión, se estudió la actividad proteolítica de dos miembros de la familia de las MMP, como son MMP-2 y MMP-9, comúnmente sobreexpresadas en el melanoma.

Los resultados obtenidos sobre la actividad enzimática de estas dos gelatinasas no mostraron asociación entre el grado de actividad proteolítica y la capacidad migratoria e invasiva que las distintas líneas celulares de melanoma habían mostrado en los ensayos anteriores. Es decir, MEL-HO y COLO-800, que evidenciaron mayor capacidad de migración e invasión, apenas tenían actividad de la MMP-9. En cuanto a la actividad de MMP-2, A375 mostró valores más elevados, pero entre las cuatro líneas no existen diferencias. Adicionalmente, se completaron estos resultados con datos de expresión no sólo de MMP-2, sino con datos de los dos principales inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP-1 y TIMP-2) y con otra metaloproteasa (MT-MMP1) cuyo papel en el melanoma está siendo ampliamente estudiado en la actualidad (Ma y cols., 2014; Ranjan y Kalraiya, 2014; Shaverdashvili y cols., 2014). Se ha propuesto recientemente a MT-

MMP1 como un modulador de la diseminación y metástasis del melanoma que actúa a través de la activación de MMP-2 y RAC1 (Shaverdashvili y cols., 2014).

Del estudio de la expresión de MMP-2, MT-MMP1, TIMP-1 y TIMP-2 se desprende que hay diferencias significativas de expresión entre las líneas celulares en el caso de MMP-2 y TIMP-1, siendo exclusivamente la línea A375 la que muestra valores muy elevados de ambas dos. Esta sobreexpresión puede deberse a una activación por parte de MT-MMP1 y asociado a una expresión reducida de TIMP-2 (Bramhall y cols., 1997). Según múltiples estudios, el papel de las MMP y los TIMP no recae tanto en el nivel de expresión de los mismos, sino más bien en el equilibrio entre ambos tipos de enzimas. Cuando el equilibrio entre las MMP y los TIMP se rompe, produciéndose generalmente una deficiencia relativa de los TIMP, se ve favorecido el crecimiento tumoral y la metástasis (Bramhall y cols., 1997; Bloomston y cols., 2002; Avadanei y cols., 2013).

Con estos resultados interpretamos que la capacidad migratoria e invasiva de las células de melanoma asociada a la expresión de ANXA5 no se ve influenciada por la actividad proteolítica ni por la expresión de las MMP y los TIMP, apoyando la hipótesis de que ANXA5 interactúa con otras vías implicadas en la motilidad celular.

2. ANXA5 REGULA LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL CONTROL DEL CITOESQUELETO DE ACTINA

La iniciación y la progresión tumoral implica múltiples eventos como son la transformación celular, el crecimiento tumoral, la neovascularización, la invasión y la metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011). En las últimas décadas, se han realizado múltiples estudios para discernir los mecanismos implicados en la regulación y progresión del melanoma, principalmente centrados en el alto potencial migratorio e invasivo de las células de melanoma. A pesar de ellos, los mecanismos moleculares que proporcionan este potencial a las células tumorales no están esclarecidos (Kappelmann y cols., 2014).

La migración celular y la invasión celular son procesos estrechamente relacionados con la dinámica del citoesqueleto de actina (Parsons y cols., 2010). Nuestro estudio, en concordancia con la actividad motogénica e invasiva demostrada por la proteína ANXA5 en las células de melanoma, muestra que la modificación de expresión de ANXA5 regula la expresión de genes que codifican para proteínas que juegan un papel importante en la reorganización del citoesqueleto de actina y en la señalización de múltiples rutas intracelulares. Entre los genes que se encuentran sobreexpresados tras el silenciamiento de ANXA5 destaca ARHGEF7, y entre los genes reprimidos destacan FAP, PTK2 β , RAC1, VEGFA y WASL.

Las alteraciones que sufre el citoesqueleto de actina provocan cambios en las propiedades de adhesión, migración e invasión de las células, lo que promueve la transición epitelio-mesénquima y la metástasis (Morgan-Fisher y cols., 2013). Además, la reorganización del citoesqueleto de actina suele afectar a la expresión génica, al ciclo celular, al tráfico vesicular y a la remodelación de la matriz extracelular (ECM) (Ridley, 2006; Singh y cols., 2010; Skarp y Vartiainen, 2010). Todo ello pone de manifiesto la importancia de las funciones del citoesqueleto de actina en el comportamiento y desarrollo de un tumor (Hanahan y Coussens, 2012). En este sentido, destaca la implicación directa o indirecta de la mayoría de

los genes alterados tras el silenciamiento de ANXA5 en la regulación del citoesqueleto de actina.

Los cambios de expresión de RAC1 son especialmente interesantes, ya que RAC1 es un miembro de la familia de Rho GTPasas que ejerce el papel de mayor efector sobre la regulación de la reorganización del citoesqueleto de actina (Cardama y cols., 2014; Ji y cols., 2015). Numerosos trabajos han publicado evidencias sobre la sobreexpresión o hiperactivación de RAC1 en una amplia variedad de tumores, asociándose con el aumento de la capacidad migratoria e invasiva de las células (Fritz y cols., 1999; Ji y cols., 2015). Acorde a ello, en nuestro trabajo el silenciamiento de ANXA5 provocó un descenso en la expresión de RAC1 y una disminución de la migración e invasión de las células de melanoma. En el contexto del melanoma, en los últimos años se han descrito mutaciones puntuales en RAC1 asociadas con defectos en la unión de ésta a PAK1, lo cual proporciona una mayor capacidad migratoria a través de la activación de ERK (Krauthammer y cols., 2012; Halaban, 2014).

Asimismo, se ha descrito que la regulación de las Rho GTPasas está regulada por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (*nucleotide Exchange factors (GEFs)*) (Bishop y Hall, 2000; Rossman y cols., 2005). Entre los GEF que activan RAC1 se encuentra ARHGEF7, que fue descrito por Manser en 1994 como una proteína de unión a PAK (Manser y cols., 1994, Bagrodia y cols 1998; Ten Klooster y cols., 2006; Häbig y cols., 2013). Nuestro estudio muestra un incremento de la expresión de ARHGEF7 tras el silenciamiento de ANXA5. Resulta particularmente interesante y contradictorio este hecho, ya que el aumento de ARHGEF7 conlleva una activación de RAC1 que a su vez promovería la formación de lamelipodios y movimientos celulares y, sin embargo, las células mostraron una menor capacidad migratoria e invasiva *in vitro*. Por ello, una acumulación de ARHGEF7 podría actuar sobre p38 (Figura 46) a través de la activación de PAK quinasas, permitiendo de otro modo regular la reorganización del citoesqueleto de actina, de forma adicional a la activación de RAC1 (Lee y cols., 2001).

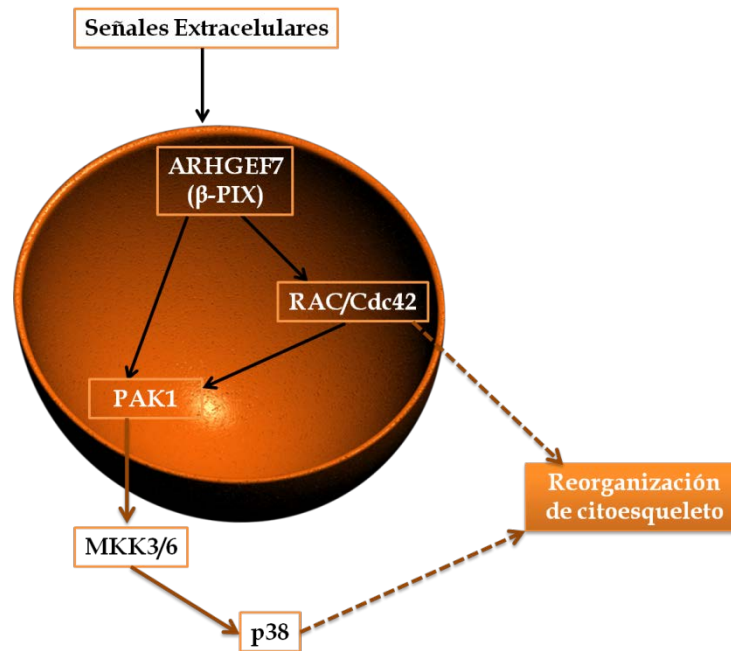


Figura 46. Modelo de señalización de ARHGEF7 a través de p38 para la reorganización del citoesqueleto de actina (adaptado de Lee y cols., 2001).

Por otro lado, entre las proteínas que sufren cambios de expresión al silenciar ANXA5 se encuentra WASL, también denominada N-WASP. WASL es un miembro de la familia de proteínas denominadas del síndrome Wiskott-Aldrich y es, además, uno de los principales activadores del complejo Arp2/3, la cual promueve la motilidad celular a través de un incremento en la polimerización de filamentos de actina (Insall y Machesky, 2009; Ramesh y cols., 2014). Trabajos previos han señalado que WASL está implicado en la motilidad de las células tumorales a través de distintas vías (Sánchez y cols., 2010; Pichot y cols., 2010; Takahashi y Suzuki, 2011; De Paula y cols., 2012).

La mayoría de los estudios se han realizado sobre cáncer de mama, y hasta el momento, no se tiene constancia de la relación entre WASL y melanoma. En nuestro estudio hemos obtenidos resultados discordantes, ya que mientras que el *array* mostraba una disminución de expresión de WASL, los lisados celulares mostraron una acumulación de WASL tras el silenciamiento de ANXA5. Esto nos lleva a pensar que el silenciamiento de ANXA5 podría estar actuando en múltiples puntos de la compleja red que regula el citoesqueleto de actina como, por ejemplo,

a nivel de Cdc42 o PIP2, que son los principales activadores de WASL (Ramesh y cols., 1999; Prehoda y cols., 2000).

En la actualidad, se están realizando múltiples estudios sobre la participación de la familia de quinasas Src en el melanoma (Lee y cols, 2010). Hasta la fecha, los miembros de esta familia se han relacionado con el desarrollo del cáncer, ya que participan en la proliferación, supervivencia, motilidad, invasión, metástasis y angiogénesis (Frame, 2002; Guarino, 2010). En este contexto, entre los genes que sufrieron alteraciones de expresión tras el silenciamiento de ANXA5 encontramos *PTK2 β* y *VEGFA* (*VEGF*), que se encuentran íntimamente ligados a la señalización que ejerce Src (Figura 47) y, a su vez, están relacionados con la polimerización de actina (Guarino, 2010; Li y cols., 2014). Además, numerosos estudios han vinculado o relacionado la progresión maligna de varios tumores con estas dos proteínas (Lipinski y cols., 2005; Iizumi y cols., 2008; Desch y cols., 2012; Rajabi y cols., 2012; Zhang y cols., 2014, Goos y cols., 2015; Li y cols., 2015). En nuestros resultados, la expresión de ambos genes, *PTK2 β* y *VEGFA*, se vió reprimida tras el silenciamiento de ANXA5 y, sin embargo, a nivel proteico no se observaron cambios. Esta disminución en la expresión de ambos se relacionaría con una menor capacidad de migración e invasión que tiene lugar tras el silenciamiento. Por tanto, nuestros resultados apuntan de nuevo a la regulación del citoesqueleto de actina como uno de los mecanismos sobre los que actúa ANXA5 para modular la migración y la invasión celular.

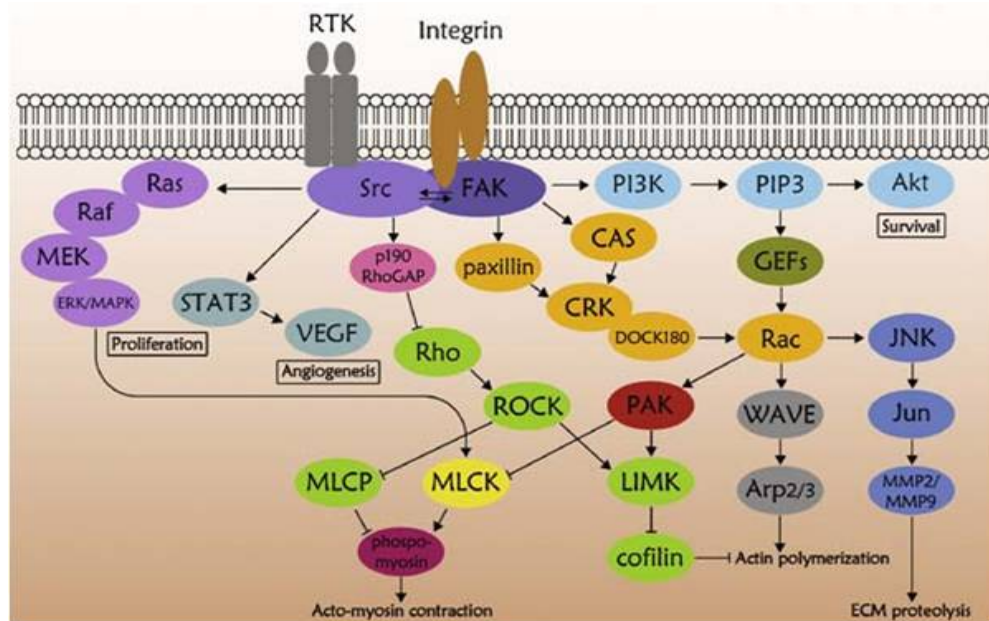


Figura 47. Diagrama de las principales vías de transducción mediadas por Src que contribuyen a la progresión del cáncer (tomada de Guarino, 2010).

Por último, del grupo de genes que alteran su expresión tras el silenciamiento de ANXA5 encontramos FAP (Seprasa), que a excepción del resto no muestra ninguna vinculación directa o indirecta con la regulación del citoesqueleto de actina. Esta proteína es una gelatinasa que se asoció inicialmente con la capacidad invasiva del melanoma humano (Monsky y cols., 1994). Desde entonces se ha asociado su sobreexpresión con otros tumores como cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de colon y adenocarcinoma de páncreas (Abbott y cols., 2002; Iwasa y cols., 2005). Recientemente se ha demostrado que la inhibición de la expresión de FAP inhibe la migración y la invasión de las células de cáncer gástrico (Wang y cols., 2013) y de cáncer de mama (Jia y cols., 2014). Tulley y Chen han publicado que FAP desarrolla, en las líneas celulares de melanoma, un papel crucial en la migración e invasión celular (Tulley y Chen, 2014). En nuestro trabajo, en concordancia con esto, se observa una disminución de expresión y de proteína FAP tras el silenciamiento de ANXA5 que, a su vez, provoca la disminución de la capacidad migratoria e invasiva de las células de melanoma.

Conjuntamente, los datos extraídos de nuestro estudio evidencian que ANXA5 ejerce un papel hasta ahora no conocido en la regulación del citoesqueleto de actina, quedando abierto el camino para analizar su papel concreto en la capacidad migratoria e invasiva del melanoma y en otros mecanismos responsables de los fenotipos invasivos como podría ser el proceso de TEM.

3. MARCADORES DE MELANOMA: ANXA5 COMO MARCADOR PRONÓSTICO DEL MELANOMA

A pesar de que el melanoma cutáneo presenta una baja tasa de incidencia en la población, cercana al 4%, es uno de los tumores más agresivos registrando valores elevados de mortalidad (80%) debido a su capacidad de metastatizar (Acosta y cols., 2009). Esto junto con el aumento de incidencia en las últimas décadas, convierte el desarrollo de melanoma en un importante problema sanitario. Como se ha descrito anteriormente, el pronóstico y las posibilidades de curación del melanoma dependen de la precocidad del diagnóstico y de una serie de factores que predicen en cierto modo el curso de la enfermedad, la respuesta a los diferentes tratamientos y, en consecuencia, la supervivencia de los pacientes.

Los factores pronóstico de melanoma identificados hasta la actualidad son insuficientes, y más aún en los estadios tempranos de la enfermedad (Gould Rothberg y cols., 2009). Por todo ello, la identificación de nuevos factores pronóstico efectivos es esencial ya que ayudarían a establecer un pronóstico individualizado y a planificar un tratamiento adecuado en función del curso de la enfermedad. En el suero se pueden identificar una gran variedad de proteínas liberadas tanto por las células tumorales como por otras células y tejidos en respuesta al desarrollo y progresión de la enfermedad (Ray y cols., 2011).

Hasta la actualidad, se han realizado numerosos estudios en los cuales se han analizado marcadores serológicos para el pronóstico de melanoma, pero el único incorporado en el sistema de estadiaje de AJCC es la concentración de lactato deshidrogenasa (LDH) (Manola y cols, 2000; Balch y cols., 2001). Además de los valores de LDH, los niveles séricos de S100B (*S100 Calcium Binding Protein B*) se han relacionado con la metástasis del melanoma, encontrándose una correlación entre altos niveles de S100B y bajas tasas de supervivencia (Harpio y Einarsson, 2004; Heizman, 2004). Estos marcadores serológicos reflejan la carga tumoral y se relacionan con el pronóstico de la enfermedad, pero únicamente en estadios avanzados de la misma (Weide y cols., 2012; Zarogoulidis y cols., 2015).

A pesar de que las anexinas son principalmente proteínas citosólicas, estas proteínas pueden ser secretadas o liberadas al medio extracelular tanto por células normales como por células dañadas, ejerciendo funciones tan importantes a nivel extracelular como la regulación de las reacciones inflamatorias y la regulación de la coagulación, entre otras (Lizarbe y cols., 2013). Además, son múltiples los estudios en los que se ha vinculado los niveles en suero de distintos miembros de la familia de anexinas, con diversas patologías (Lai y cols., 2012; Valer y cols., 2013). Es el caso de la ANXA2, que ha sido propuesto recientemente como un biomarcador diagnóstico para cáncer de pulmón y carcinoma hepatocelular (Sun y cols., 2013; Yang y cols., 2015). Nosotros hemos querido evaluar el posible papel de ANXA5 en la progresión tumoral de melanoma analizando principalmente pacientes en estadios iniciales de la enfermedad neoplásica pero con diferente evolución clínica.

Para llevar a cabo este trabajo, los niveles séricos de ANXA5 fueron analizados en 155 pacientes con melanoma en diferentes estadios de evolución de la enfermedad y en 49 individuos sanos. De los 155 pacientes con melanoma, 137 fueron diagnosticados en estadios tempranos de la enfermedad neoplásica, estadios I y II, de acuerdo a la clasificación AJCC (Balch y cols., 2009). Un 49,7% de los pacientes estudiados cursaron con buena evolución clínica y un 50,3% de los pacientes desarrollaron metástasis en los dos primeros años de seguimiento tras la exéresis quirúrgica.

Entre las características clínicas del grupo de pacientes con melanoma destaca, tal y como se ha descrito por otros autores, que tanto a nivel nacional como europeo la incidencia de melanoma es mayor en mujeres (Cayuela y cols., 2008; Mervic y cols., 2011). La localización anatómica del tumor se correlaciona con la supervivencia y varía entre los dos géneros; los hombres son más propensos a presentar melanomas en el tronco mientras que las mujeres tienden a desarrollar la enfermedad en las extremidades inferiores (Ozgen, 2014). En nuestro estudio se han clasificado los pacientes de acuerdo a la localización del tumor primario, siendo las más frecuentes tronco y extremidades inferiores, independientemente

del género. Por lo general, los melanomas localizados en las extremidades tienen mejor pronóstico que aquellos localizados en el tronco (Álvarez-Mon Soto y cols., 2005).

La ANXA5 tradicionalmente se ha considerado como una proteína de unión a fosfolípidos dependientes de calcio, pero durante la última década múltiples trabajos sugieren un conjunto de funciones entre las que destacan el tráfico vesicular, la división celular, la apoptosis y la regulación del crecimiento (Hayes y Moss, 2004; Moss y Morgan, 2004). No existe hasta la fecha evidencia de que cualquier miembro de la familia de las anexinas sea el causante directo de enfermedades, pero sí existe evidencia de que en ciertas condiciones los cambios de niveles de expresión o localización de las anexinas pueden contribuir a las consecuencias patológicas.

Centrándonos en ANXA5, la asociación entre esta proteína y el desarrollo tumoral no está claro pero se ha relacionado su sobreexpresión con tumores como glioma, cáncer gástrico, cáncer de mama o hepatocarcinoma, entre otros (Peng y cols., 2014). Wehder y colaboradores demostraron que ANXA5 es capaz de regular la capacidad invasiva de las células de carcinoma oral (Wehder y cols., 2009), de manera similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo para las células de melanoma. Adicionalmente, otros estudios han demostrado que la concentración de ANXA5 en suero de pacientes con otros tumores como adenocarcinomas colorrectales o carcinoma de células escamosas de cuello uterino se asocia con el estadio del tumor y con un peor pronóstico (Xue y cols., 2009; Li y cols., 2012). En relación a lo mencionado, no existen, hasta la fecha, datos que relacionen ANXA5 y melanoma. En este sentido, los resultados aquí presentados ponen de manifiesto, por primera vez, que ANXA5 contribuye al desarrollo del melanoma.

El análisis de los niveles séricos de ANXA5 en pacientes con melanoma e individuos sanos muestra diferencias significativas, siendo en los pacientes con melanoma mayor la concentración de ANXA5. Esto indica que ANXA5 puede ser un marcador importante para el diagnóstico del melanoma. Sin embargo, la

comparativa de los valores séricos de ANXA5 estratificando los pacientes de melanoma en estadios (I, II y III) no muestra diferencias estadísticamente significativas entre ellos. A la luz de estos resultados, decidimos analizar los niveles séricos de ANXA5 en relación a la evolución clínica de la enfermedad. Nuestros resultados muestran que la concentración de la proteína ANXA5 en suero puede ser un factor de mal pronóstico, ya que los pacientes con melanoma que desarrollan metástasis durante los primeros 2 años de seguimiento presentan niveles de ANXA5 en suero significativamente mayores que aquellos que cursan con buena evolución clínica durante más de 5 años de seguimiento.

En concordancia con los resultados obtenidos, realizamos una nueva estratificación de los pacientes de estadios tempranos (I y II) en función a su evolución clínica con el fin de determinar hasta qué punto es válido el nivel sérico de ANXA5 como factor pronóstico. Nuestros resultados demuestran que los pacientes con melanoma en estadios tempranos (I y II) que desarrollaron algún tipo de metástasis durante los 2 primeros años de evolución presentan niveles de ANXA5 en suero significativamente superiores que aquellos que cursan buena evolución durante más de 5 años.

El análisis multivariante donde se analiza la significación de los diferentes factores que pueden estar relacionados con la progresión metastática, como la edad, el sexo, el estadio, el intervalo libre de enfermedad y los niveles séricos de ANXA5, demuestra que el estadio y los niveles séricos de ANXA5 se asocian a la progresión maligna. Además, los niveles séricos de ANXA5 tienen un valor predictivo de la evolución metastática del melanoma humano.

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede concluir que la determinación de ANXA5, cuando se diagnostica el melanoma primario, puede ser una herramienta útil para identificar pacientes con mayor potencial de desarrollar metástasis durante el desarrollo de la enfermedad.

CONCLUSIONES

1. La proteína ANXA5 está implicada en la motilidad y capacidad invasiva de las células de melanoma humano.
2. ANXA5 modula la expresión de los genes *ARHGEF7*, *FAP*, *PTK2 β* , *RAC1*, *VEGFA* y *WASL* implicados en la motilidad y en la dinámica del citoesqueleto de actina.
3. Los pacientes con melanoma cutáneo presentan niveles séricos significativamente elevados de la proteína ANXA5 en relación a los individuos sanos.
4. Los niveles séricos elevados de ANXA5 en el momento del diagnóstico de melanoma son un factor de mal pronóstico.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi NR, Shaw HM, Rigel DS, Friedman RJ, McCarthy WH, Osman I. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *Clin Exp Dermatol* 2005; 30:707.
- Abbott CA, Gorrell MD in Langner J, Ansorge S. Ectopeptidases: CD13/Aminopeptidase N and CD26/Dipeptidylpeptidase IV in Medicine and Biology. Plenun Publishers 2002; 171-195.
- Acosta AE, Fierro E, Velásquez VE, Rueda X. Melanoma: pathogenesis, clinic and histopathology. *Rev Asoc Col Dermatol* 2009; 2:87-108.
- Albini A, Noonan DM. The chemoinvasion assay, 25 years and still going strong: the use of reconstituted basement membranes to study cell invasion and angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22(5):677-689.
- Algazi AP, Soon CQ, Daud AI. Treatment of cutaneous melanoma: current approaches and future prospects. *Cancer Manag Res* 2010; 2:197-211.
- Álvarez Mon-Soto M, Camacho Martínez F, Díaz-Perez JL, Díaz-Rubio E, González Larriba JL, Guillem Porta V, López López JJ, Moreno Nogueira JA, Serrano Ortega S, Toribio Pérez J. Melanoma. Ed Just in time. 2005.
- Amălinei C, Căruntu ID, Giuscă SE, Bălan RA. Matrix Metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol* 2010; 51(2):215-228.
- Ang EZ, Nguyen HT, Sim HL, Putti TC, Lim LH. Annexin-1 regulates growth arrest induced by high levels of estrogen in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 2009; 7(2):266-274.
- Ang KK, Ballo MT. Radiation therapy for malignant melanoma. *Surg Clin North Am* 2003; 83(2):323-342.
- Aris M, Barrio MM. Combining immunotherapy with oncogene-targeted therapy: a new road for melanoma treatment. *Front Immunol* 2015; 6:46.
- Arroyo-Berdugo Y, Alonso S, Ribas G, Ibarrola-Villaba M, Peña-Chilet M, Martínez-Cadenas C, Gardeazabal J, Ratón-Nieto JA, Sánchez-Diez A, Careaga JM, Pérez-

- Yarza G, Carretero G, Martín-González M, Gómez-Fernández C, Nagore E, Asumendi A, Boyano MD. Involvement of ANXA5 and ILKAP in susceptibility to malignant melanoma. *Plos One* 2014; 9(4):e95522.
- Ascierto PA, Grimaldi AM, Anderson A, Bifulco C, Cochran A, Garbe C, Eggermont AM, Faries M, Ferrone S, Gershenwald JE, Gajewski TF, Halaban R, Hodi F, Kefford R, Kirkwood JM, Larkin J, Leachman S, Maio M, Marais R, Masucci G, Melero I, Palmieri G, Puzanov I, Ribas A, Saenger Y, Schilling B, Seliger B, Stroncek D, Sullivan R, Testori A, Wang E, Ciliberto G, Mozzillo N, Marincola FM, Thurin M. Future perspectives in melanoma research: meeting report from the Melanoma Bridge, Napoli, December 5th-8th 2013. *J Transl Med* 2014; 12(1):277.
- Avadanei R, Caruntu ID, Amalinei C, Lozneau L, Balan R, Grigoras A, Ciobanu Apostol D, Giusca SE. Higu variability in MMP2/TIMP2 and MMP9/TIMP1 expression in secondary liver tumors. *Rom J Morphol Embryol* 2013; 54(3):479-485.
- Bagrodia S, Taylor SJ, Jordon KA, Van Aeslst L, Cerione RA. A novel regulator of p21-activated kinases. *J Biol Chem* 1998; 273(37):23633-23636.
- Bailey CM, Morrison JA, Kulesa PM. Melanoma revives an embryonic migration program to promote plasticity and invasion. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012; 25(5):573-583.
- Balch CM, Cascinelli N. The new melanoma staging System. *Tumori* 2001; 87(4):64-68.
- Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty JT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final Version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009; 27(36):199-206.
- Balch CM, Gershenwald JE. Clinical value of the Sentinel-Node biopsy in primary cutaneous melanoma. *New England J Med* 2014; 370:663-664.
- Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong S-J. *Cutaneous melanoma*. 3rd ed, QMP, 1998.
- Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd

- D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001; 19(16):3622-3634.
- Balch CM, Soong SJ, Smith T, Ross MI, Urist MM, Karakousis CP, et al. Long-term results of a prospective surgical trial comparing 2 cm vs 4 cm excision margins for 740 patients with 1-4 mm melanomas. *Ann Surg Oncol* 2001; 8(2):101-108.
- Barnhill RL, Gupta K. Unusual variants of malignant melanoma. *Clin Dermatol* 2009; 27(6):564-587.
- Bauwens M, De Saint-Hubert M, Devos E, Deckers N, Reutelingsperger C, Mortelmans L, Himmelreich U, Mottaghy FM, Verbruggen A. Site-specific ⁶⁸Ga-labeled Annexin A5 as a PET imaging agent for apoptosis. *Nucl Med Biol* 2011; 38(3):381-392.
- Belvedere R, Bizzarro V, Popolo A, Dal Piaz F, Vasaturo M, Picardi P, Parente L, Petrella A. Role of intracellular and extracellular annexin A1 in migration and invasion of human pancreatic carcinoma cells. *BMC Cancer* 2014; 14(1):961.
- Benjamin MM, Khali RA. Matrix metalloproteinase inhibitors as investigative tools in the pathogenesis and management of vascular disease. *EXS* 2012; 103:209-279.
- Bertolotto C. Melanoma: From melanocytes to genetic alterations and clinical options. *Scientifica* 2013; Article ID 635203.
- Bevona C, Sober AJ. Melanoma incidence trends. *Dermatol Clin* 2002; 20:589-595.
- Biaoxue R, Xiguang C, Shuanying Y. Annexin A1 in malignant tumors: current opinions and controversies. *Int J Biol Markers* 2014; 29(1):e8-20.
- Bichakjian CK, Halpern AC, Johnson TM, Foote Hood A, Grichnik JM, Swetter SM, Tsao H, Barbosa VH, Chuang TY, Duvic M, Ho VC, Sober AJ, Beutner KR, Bhushan R, Smith Begolka W. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. American Academy of Dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2011; 65(5):1032-1047.

- Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000; 348(2):241-255.
- Bloomston M, Shafii A, Zervoss EE, Rojiani A, Rosemurgy AS. MMP-2 and TIMP-1 are derived from, not in response to, pancreatic cancer. *J Surg Res* 2002; 102(1):35-38.
- Boersma HH, Kietselaer BL, Stolk LM, Bennaghmouch A, Hofstra L, Narula J, Heidendal GA, Reutelingsperger CP. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med* 2005; 46(12):2035-2050.
- Boudhraa Z, Rondepierre F, Ouchchane L, Kintossou R, Trzeciakiewicz A, Franck F, Kanitakis J, Labeille B, Joubert-Zakeyh J, Bouchon B, Perrot JL, Mansard S, Papon J, Dechelotte P, Chezal JM, Miot-Noirault E, Bonnet M, D'Incan M, Degoul F. Annexin A1 in primary tumors promotes melanoma dissemination. *Clin Exp Metastasis* 2014; 31(7):749-760.
- Bramhall SR, Neoptolemos JP, Stamp GW, Lemoine NR. Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol* 1997; 182(3):347-355.
- Breslow A. Prognosis in cutaneous melanoma: tumor thickness as a guide to treatment. *Pathol Annu* 1980; 15(1):1-22.
- Cardama GA, Gonzalez N, Ciarlantini M, Gandolfi-Donadío L, Comin MJ, Alonso DF, Lorenzano Menna P, Gomez DE. Proapoptotic and antiinvasive activity of Rac1 small molecule inhibitors on malignant glioma cells. *Onco Targets Ther* 2014; 7:2021-2033.
- Cascales Angosto M, Álvarez-Gómez JA. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An R Acad Nac Farm* 2010; 76 (1):59-84.
- Cayuela A, Rodríguez-Domínguez S, Vigil E, Conejo-Mir JS. Effect of age, birth cohort and period of death on skin melanoma mortality in Spain, 1975 through 2004. *Int J Cancer* 2008; 122(4):905-908.

- Chapman A, Fernández del Ama L, Ferguson J, Kamarashev J, Wellbrock C, Hurlstone A. Heterogeneous tumor subpopulations cooperate to drive invasion. *Cell Rep* 2014; 8(3):688-695.
- Cheng TY1, Wu MS, Lin JT, Lin MT, Shun CT, Huang HY, Hua KT, Kuo ML. Annexin A1 is associated with gastric cancer survival and promotes gastric cancer cell invasiveness through the formyl peptide receptor/extracellular signal-regulated kinase/integrin beta-1-binding protein 1 pathway. *Cancer* 2012; 118(23):5757-5767.
- Clark WH, Elder DE, Van Horn M. The biologic forms of malignant melanoma. *Hum Pathol* 1986; 17(5):443-450.
- Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanoma of skin. *Cancer Res* 1969; 29(3):705-727.
- Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J Clin Oncol* 2005; 23(7):1473-1482.
- Davies MA. The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *Cancer J* 2012; 18(2):142-147.
- De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(2):97-110.
- De Giorgi V, Gori A, Grazzini M, Rossari S, Oranges T, Longo AS, Lotti T, Gandini S. Epidemiology of melanoma: is it still epidemic? What is the role of the sun, sunbeds, Vit D, betablocks, and others? *Dermatol Ther* 2012; 25(5):392-396.
- De Paula CA, Coulson-Thomas VJ, Ferreira JG, Maza PK, Suzuki E, Nakahata AM, Nader HB, Sampaio MU, Oliva ML. Enterolobium contortisiliquum trypsin inhibitor (EcTI), a plant proteinase inhibitor, decreases in vitro cell adhesion and invasion by inhibition of Src protein-focal adhesion kinase (FAK) signaling pathways. *J Biol Chem* 2012; 287(1):170-182.
- Denecker G, Vandamme N, Akay O, Koludrovic D, Taminau J, Lemeire K, Gheldof A, De Craene B, Van Gele M, Brochez L, Udupi GM, Rafferty M, Balint B, Gallagher WM, Ghanem G, Huylebroeck D, Haigh J, Van den Oord J, Larue L, Davidson I, Marine JC, Berx G. Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that

- controls melanogenesis and melanoma progression. *Cell Death Differ* 2014; 21(8):1250-1261.
- Deng S, Wang J, Hou L, Li J, Chen G, Jing B, Zhang X, Yang Z. Annexin A1, A2, A4 and A5 play important roles in breast cancer, pancreatic cancer and laryngeal carcinoma, alone and/or synergistically. *Oncol Letters* 2013; 5:107-112.
- Demchenko AP. Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology* 2013; 65(2):157-172.
- Desch A, Strozyk EA, Bauer AT, Huck V, Niemeyer V, Wieland T, Schneider SW. Highly invasive melanoma cells activate the vascular endothelium via an MMP-2/integrin $\alpha\beta 5$ -induced secretion of VEGF-A. *Am J Pathol* 2012; 181(2):693-705.
- Dong Z, Yao M, Zhang H, Wang L, Huang H, Yan M, Wu W, Yao D. Inhibition of Annexin A2 gene transcription is a promising molecular target for hepatoma cell proliferation and metastasis. *Oncol Lett* 2014; 7(1):28-34.
- Du QS, Ren XR, Xie Y, Wang Q, Mei L, Xiong WC. Inhibition of PYK2-induced actin cytoskeleton reorganization, PYK2 autophosphorylation and focal adhesion targeting by FAK. *J Cell Sci* 2001; 114(16):2977-2987.
- Eccles MR, He S, Ahn A, Slobbe LJ, Jeffs AR, Yoon H-S, Baguley BC. MITF and PAX3 play distinct roles in melanoma cell migration; outline of a “genetic switch” theory involving MITF and PAX3 in proliferative and invasive phenotypes of melanoma. *Front Oncol* 2013; 3:229.
- Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002; 26(2):199-213.
- Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM. Toward a molecular classification of melanoma. *J Clin Oncol* 2007; 25(12):1606-1620.
- Fodstad O, Aamdal S, McMenamin M, Nesland JM, Pihl A. A new experimental metastasis model in athymic nude mice, the human malignant melanoma LOX. *Int J Cancer* 1988, 41(3):442-449.

- Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59(1):221-226.
- Frame MC. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behavior. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1602(2):114-130.
- Francia G, Mitchell SD, Moss SE, Hanby AM, Marshall JF, Hart IR. Identification by differential display of annexin VI, a gene differentially expressed during melanoma progression. *Cancer Res* 1996; 56:3855-3858.
- Frank SR, Hansen SH. The PIX-GIT complex: a G protein signaling cassette in control of cell shape. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19(3):234-244.
- Friedman RJ, Rigel DS. The clinical features of malignant melanoma. *Dermatol Clin* 1985; 3(2):271-283.
- Fritz G, Just I, Kaina B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer* 1999; 81(5):683-687.
- Gastardelo TS, Cunha BR, Raposo LS, Maniglia JV, Cury PM, Lisoni FC, Tajara EH, Oliani SM. Inflammation and Cancer: Role of Annexin A1 and FPR2/ALX in Proliferation and Metastasis in Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Plos One* 2014; 9(12):e111317.
- Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca²⁺ signaling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(6):449-461.
- Gerke V, Moss SE. Annexins: From structure to function. *Physiol Rev* 2002; 82:331-371.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51(5):1417-1423.
- Gillbro JM, Olsson MJ. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents-existing and new approaches. *Int J Cosmet Sci* 2011; 33(3): 210-221.
- Gogas H, Eggermont AM, Hauschild A, Hersey P, Mohr P, Schadendorf D, Spatz A, Dummer R. Biomarkers in melanoma. *Ann Oncol* 2009; 6:8-13.

- Goldstein AM, Tucker MA. Dysplastic Nevi and Melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013; 22(4):528-532.
- González VM. Genes de predisposición al melanoma. *Melanoma familiar. Educación médica continúa* 2010.
- Goos JA, de Cuba EM, Coupé VM, Diosdado B, Delis-Van Diemen PM, Karga C, Beliën JA, Menke-Van der Houven van Oordt CW, Geldof AA, Meijer GA, Hoekstra OS, Fijneman RJ. Glucose Transporter 1 (SLC2A1) and Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) Predict Survival After Resection of Colorectal Cancer Liver Metastasis. *Ann Surg* 2015; Epub ahead of print.
- Gould Rothberg BE, Bracken MB, Rimm DL. Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101:452-474.
- Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 2007; 445(7130):851-857.
- Groblewska M, Siewko M, Mroczko B, Szmitkowski M. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2012; 50(1):12-19.
- Guarino M. Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol* 2010; 223(1):14-26.
- Guo C, Liu S, Sun MZ. Potential role of Anxa1 in cancer. *Future Oncol* 2013; 9(11):1773-1793.
- Haass NK, Beaumont KA, Hill DS, Anfosso A, Mrass P, Muñoz MA, Kinjyo I, Weninger W. Real-time cell cycle imaging during melanoma growth, invasion and drug resistance. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014, Epub ahead of print.
- Häbig K, Gellhaar S, Heim B, Djuric V, Giesert F, Wurst W, Walter C, Hentrich T, Riess O, Bonin M. LRRK2 guides the actin cytoskeleton at growth cones together with ARHGAP7 and Tropomyosin 4. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832(12):2352-2367.
- Halaban R. RAC1 and Melanoma. *Clin Ther* 2014; Epub ahead of print.

- Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012; 21(3):309-322.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5):646-674.
- Harpio R, Einarsson R. S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. *Clin Biochem* 2004; 37(7):512-518.
- Hayes MJ, Moss SE. Annexins and disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322(4):1166-1170.
- Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE. Annexin-actin interactions. *Traffic* 2004; 5:571-576.
- Heizman CW. S100B protein in clinical diagnostics: assay specificity. *Clin Chem* 2004; 50(1):249-251.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Kasemeier-Kulesa J, Kulesa PM, Postovit LM. Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(4):246-255.
- Hirobe T. How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated? *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; 24(3):462-478.
- Hocker T, Tsao H. Ultraviolet radiation and melanoma: a systemic review and analysis of reported sequence variants. *Hum Mutat.* 2007; 28(6):578-588.
- Hocker TL, Singh MK, Tsao H. Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. *J Invest Dermatol* 2008; 128:2575-2595.
- Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Döbbeling U, Kobert N, Schaerer L, Hemmi S, Dummer R. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* 2008; 68(3):605-656.
- Hofmann UB, Houben R, Bröcker EB, Becker JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* 2005; 87(3-4):307-314.

- Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen P Rüter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol* 2000; 115:337-344.
- Hong M, Park N, Chun YJ. Role of annexin a5 on mitochondria-dependent apoptosis induced by tetramethoxystilbene in human breast cancer cells. *Biomol Ther (Seoul)* 2014; 22(6):519-524.
- Hu N, Strobl-Mazzulla PH, Bronner ME. Epigenetic regulation in neural crest development. *Dev Biol* 2014; 396(2):159-168.
- Huang Y, Wang Q, Du Y, Bai L, Jin F, Zhang J, Fan S, Wang H, Song L, Gao Y, Wang X, Tang J. Inhibition of annexin A7 gene and protein induces the apoptosis and decreases the invasion, migration of the hepatocarcinoma cell line. *Biomed Pharmacother* 2014; 68(7):819-824.
- Huber R, Römisch J, Pagues EP. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J* 1990; 9(12):3867-3874.
- Iizumi M, Bandyopadhyay S, Pai SK, Watabe M, Hirota S, Hosobe S, Tsukada T, Miura K, Saito K, Furuta E, Liu W, Xing F, Okuda H, Kobayashi A, Watabe K. RhoC promotes metastasis via activation of the Pyk2 pathway in prostate cancer. *Cancer Res* 2008; 68(18):7613-7620.
- Insall RH, Machesky LM. Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. *Dev Cell* 2009; 17(3):310-322.
- Iwasa S, Okada K, Chen WT, Jin X, Yamane T, Ooi A, Mitsumata M. Increased expression of seprase, a membrane-type serine protease, is associated with lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Cancer Lett* 2005; 227(2):229-236.
- Jha G, Miller JS, Curtsinger JM, Zhang Y, Mescher MF, Dudek AZ. Randomized phase II study of IL-2 with or without an allogeneic large multivalent immunogen vaccine for the treatment of stage IV melanoma. *Am J Clin Oncol* 2014; 37(3):261-265.

- Ji J, Feng X, Shi M, Cai Q, Yu Y, Zhu Z, Zhang J. Rac1 is correlated with aggressiveness and a potential therapeutic target for gastric cancer. *Int J Oncol* 2015; Epub ahead of print.
- Ji Z, Flaherty KT, Tsao H. Targeting the RAS pathway in melanoma. *Trends Mol Med* 2012; 18(1):27-35.
- Jia J, Martin TA, Ye L, Jiang WG. FAP- α (Fibroblast activation protein- α) is involved in the control of human breast cancer cell line growth and motility via the FAK pathway. *BMC Cell Biol* 2014; 15:16.
- Johnson DB, Flaherty KT, Weber JS, Infante JR, Kim KB, Kefford RF, Hamid O, Schuchter L, Cebon J, Sharfman WH, McWilliams RR, Sznol M, Lawrence DP, Gibney GT, Burris HA, Falchook GS, Algazi A, Lewis K, Long GV, Patel K, Ibrahim N, Sun P, Little S, Cunningham E, Sosman JA, Daud A, Gonzalez R. Combined B-RAF (Dabrafenib) and MEK inhibition (Trametinib) in patients with B-RAFV600-mutant melanoma experiencing progression with single-agent B-RAF inhibitor. *J Clin Oncol* 2014; 32(33):3697-3704.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119(6):1420-1428.
- Kanavy HE, Gerstenblith MR. Ultraviolet radiation and melanoma. *Semin Cutan Med Surg* 2011; 30(4):222-228.
- Kappelmann M, Bosserhoff A, Kuphal S. AP-1/c-Jun transcription factors: regulation and function in malignant melanoma. *Eur J Cell Biol* 2014; 93(1-2):76-81.
- Kerosuo L, Bronner-Fraser M. What is bad in cancer is good in the embryo: importance of EMT in neural crest development. *Semin Cell Dev Biol* 2012; 23(3):320-332.
- Kim T, Amaria RN, Spencer C, Reuben A, Cooper ZA, Wargo JA. Combining targeted therapy and immune checkpoint inhibitors in the treatment of metastatic melanoma. *Cancer Biol Med* 2014; 11(4):237-346.
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography detection of pictogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994; 1:218(2):325-329.

- Kornberg LJ. Focal adhesion kinase and its potential involvement in tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 1998; 20(8):745-752.
- Kovalyshyn I, Braun R, Marghoob A. Congenital melanocytic naevi. *Australas J Dermatol* 2009; 50:231-240.
- Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP, Cheng E, Davis MJ, Goh G, Choi M, Ariyan S, Narayan D, Dutton-Regester K, Capatana A, Holman EC, Bosenberg M, Sznol M, Kluger HM, Brash DE, Stern DF, Materin MA, Lo RS, Mane S, Ma S, Kidd KK, Hayward NK, Lifton RP, Schlessinger J, Boggon TJ, Halaban R. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2012; 44(9):1006-1014.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 15 (227):680-685.
- Lai CT, Chow PC, Wong SJ, Chang KW, Cheung YF. Circulating annexin A5 levels after atrial switch for transposition of the great arteries: relationship with ventricular deformation and geometry. *Plos One* 2012; 7(12):e52125.
- Lamberg L. "Epidemic" of malignant melanoma: true increase or better detection? *JAMA* 2002; 287:2201.
- Larue L, Beermann F. Cutaneous melanoma in genetically modified animals. *Pigmen Cell Res* 2007; 20:485-497.
- Lee JH, Pyon JK, Kim DW, Lee SH, Nam HS, Kim CH, Kang SG, Lee YJ, Park MY, Jeong DJ, Cho MK. Elevated c-Src and c-Yes expression in malignant skin cancers. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29:116.
- Lee SH, Eom M, Lee SJ, Kim S, Park HJ, Park D. BetaPIX enhanced p38 activation by Cdc42/Rac/PAK/MMK3/6-mediated pathway. Implication in the regulation of membrane ruffling. *J Biol Chem* 2001; 276(27):25066-25072.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246:1306-1309.

- Lewit-Bentley A, Morera S, Huber R, Bodo G. The effect of metal binding on the structure of annexin V and implications for membrane binding. *Eur J Biochem* 1992; 210(1):73-77.
- Li FZ, Dhillon AS, Anderson RL, McArthur G, Ferrao PT. Phenotype switching in melanoma: implications for progression. *Front Oncol* 2015; 5:31.
- Li HY, Cui XY, Wu W, Yu FY, Yao HR, Liu Q, Song EW, Chen JQ. Pyk2 and Src mediate signaling to CCL18-induced breast cancer metastasis. *J Cell Biochem* 2014; 115(3):596-603.
- Li J, Li L, LiZ, Gong G, Chen P, Liu H, Wang J, Liu Y, Wu X. The role of miR-205 in the VEGF-mediated promotion of human ovarian cancer cell invasion. *Gynecol Oncol* 2015; Epub ahead of print.
- Li RK, Zhao WY, Fang F, Zhuang C, Zhang XX, Yang XM, Jiang SH, Kong FZ, Tu L, Zhang WM, Yang SL, Cao H, Zhang ZG. Lysyl oxidase-like4 (LOXL4) promotes proliferation and metastasis of gastric cancer via FAK/Src pathway. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015; 141(2):269-281.
- Li X, Chen L, Liang XJ, Gao YF, Wang XJ, Xu Q, Yan Y, Gao FL. Annexin A5 protein expression is associated with the histological differentiation of uterine cervical squamous cell carcinoma in patients with an increased serum concentration. *Mol Med Rep* 2012; 6(6):1249-1254.
- Lipinski CA, Tran NL, Menashi E, Rohl C, Kloss J, Bay RC, Berens ME, Loftus JC. The tyrosine kinase pyk2 promotes migration and invasion of glioma cells. *Neoplasia* 2005; 7(5):435-445.
- Liu A, Huang W, Zeng G, Ma X, Zhou X, Wang Y, Ouyang C, Cheng A. Expression of the Annexin A1 gene is associated with suppression of growth, invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma. *Mol Med Rep* 2014; 10(6):3059-3067.
- Lizarbe MA, Barrasa JL, Olmo N, Gavilanes F, Turnay J. Annexin-Phospholipid interactions. Functional implications. *Int J Mol Sci* 2013; 14:2652-2683.

- Ma J, Tang X, Wong P, Jacobs B, Borden EC, Bedogni B. Noncanonical activation of Notch1 protein by membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) controls melanoma cell proliferation. *J Biol Chem* 2014; 289(12):8442-8449.
- Maes H, Van Eygen S, Kryski DV, Vandebabeele P, Nys K, Rillaerts K, Garg AD, Verfaillie T, Agostinis P. BNIP3 supports melanoma cell migration and vasculogenic mimicry by orchestrating the actin cytoskeleton. *Cell Death and Disease* 2014; 5:e1127.
- Manola J, Atkins M, Ibrahim J, Kirkwood J. Prognostic factors in metastatic melanoma: a pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. *J Clin Oncol* 2000; 18(22):3782-3793.
- Manser E, Leung T, Salihuddin H, Zhao ZS, Lim L. A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 1994; 367(6458):40-46.
- Manser E, Loo TH, Koh CG, Zhao ZS, Chen XQ, Tan L, Tan I, Leung T, Lim L. PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell* 1998; 1:183-192.
- Meier F, Schitteck B, Busch S, Garbe C, Smalley K, Satyamoorthy K, Li G, Herlyn M. The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Front Biosci* 2005; 10:2986-3001.
- Meier F, Will S, Ellwanger U, Schlagenhauff B, Schitteck B, Rassner G, Garbe C. Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* 2002; 147:62-70.
- Mervic L, Leiter U, Meier F, Eigentler T, Forschner A, Metzler G, Bartenjev I, Büttner P, Garbe C. Sex differences in survival of cutaneous melanoma are age dependent: an analysis of 7338 patients. *Melanoma Res* 2011; 21(3):244-252.
- Meyer P, Sergi C, Garbe C. Polymorphisms of the B-RAF gene predisposes males to malignant melanoma. *J Carcinog* 2003; 2:7.
- Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. *N Engl J Med* 2006; 355:51-65.

- Mogami T, Yokota N, Asai-Sato M, Yamada R, Koizume S, Sakuma Y, Yoshihara M, Nakamura Y, Takano Y, Hirahara F, Miyagi Y, Miyagi E. Annexin A4 is involved in proliferation, chemo-resistance and migration and invasion in ovarian clear cell adenocarcinoma cells. *Plos One* 2013; 8(11):e80359.
- Mohr P, Eggermont AMM, Hauschild A, Buzaid A. Staging of cutaneous melanoma. *Ann Oncol* 2009; 20(6):14-21.
- Monastyrskaya K, Babiychuk EB, Draeger A. The annexins: spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 2623-2642.
- Monsky WL, Lin CY, Aoyama A, Kelly T, Akiyama SK, Mueller SC, Chen WT. A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. *Cancer Res* 1994; 54(21):5702-5710.
- Moore DH, Schneider JS, Sagebiel RW. Discordance of risk factors for invasive and non-invasive melanoma. *Lancet* 1990; 335(8704):1523-1524.
- Morel E, Parton RG, Gruenberg J. Annexin A2-dependent polymerization of actin mediates endosome biogenesis. *Dev Cell* 2009; 16:445-457.
- Morgan-Fisher M, Wewer UM, Yoneda A. Regulation of ROCK activity in cancer. *J Histochem Cytochem* 2013; 61(3):185-198.
- Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou SJ, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992; 127(4):392-399.
- Moss SE, Morgan RO. The annexins. *Genome Biol* 2004; 5(4):219.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51(1):263-273.
- Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol* 2011; 12(11):233.

- Mussunoor S, Murray GI. The role of annexins in tumour development and progression. *J Pathol* 2008; 216:131-140.
- Nakamura M, Tokura Y. Epithelial-mesenchymal transition in the skin. *J Dermatol Sci* 2011; 61(1):7-13.
- Ozgen A. A single institution retrospective analysis of malignant melanoma. *J Cancer Res Ther* 2014; 10(1):38-42.
- Pan QZ, Pan K, Weng DS, Zhao JJ, Zhang XF, Wang DD, Lv L, Jiang SS, Zheng HX, Xia JC. Annexin A3 promotes tumorigenesis and resistance to chemotherapy in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 2013; Epub ahead of print.
- Park N, Chun YJ. Auranofin promotes mitochondrial apoptosis by inducing annexin A5 expression and translocation in human prostate cancer cells. *J Toxicol Environ Health* 2014; 77(22-24):1467-1476.
- Park SJ, Kim YT, Jeon YJ. Antioxidant Dieckol downregulates the Rac1/ROS signaling pathway and inhibits Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-family verprolin-homologous protein 2 (WAVE2)-mediated invasive migration of B16 Mouse melanoma cells. *Mol Cells* 2012; 33(4):363-369.
- Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. Cell Adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(9):633-643.
- Peng B, Chunmei G, Hongwei G, Shuqing L, Sun MZ. Annexin A5 as a potential marker in tumors. *Clinica Chimica Acta* 2014; 427:42-48.
- Pereira AC, Dias Do Carmo E, Dias da Silva MA, Blumer Rosa LE. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and oral cancer. *J Clin Exp Dent* 2012; 4(5):e297-e301.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9):e45.

- Pichot CS, Arvanitis C, Hartig SM, Jensen SA, Bechill J, Marzouk S, Yu J, Frost JA, Corey SJ. Cdc42-interacting protein 4 promotes breast cancer cell invasion and formation of invadopodia through activation of N-WASp. *Cancer Res* 2010; 70(21):8347-8356.
- Pimiento JM, Chen DT, Centeno BA, Davis-Yadley AH, Husain K, Fulp WJ, Wang C, Zhang A, Malafa MP. Annexin A8 is a prognostic marker and potential therapeutic target for pancreatic cancer. *Pancreas* 2015; 44(1):122-127.
- Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2003; 112:453-465.
- Prehoda KE, Scott JA, Mullins RD, Li WA. Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science* 2000; 290(5492):801-806.
- Radisky ES, Radisky DC. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15(2):201-212.
- Rajabi P, Neshat A, Mokhtari M, Rajabi MA, Eftekhari M, Tavakoli P. The role of VEGF in melanoma progression. *J Res Med Sci* 2012; 17(6):534-539.
- Ramesh N, Antón IM, Martínez-Quiles N, Geha RS. Waltzing with WASP. *Trends Cell Biol* 1999; 9(1):15-19.
- Ramesh N, Massaad MJ, Kumar L, Koduru S, Sasahara Y, Anton I, Bhasin M, Libermann Y, Geha R. Binding of the WASP/N-WASP-interacting protein WIP to actin regulates focal adhesion assembly and adhesion. *Mol Cell Biol* 2014; 34(14):2600-2610.
- Rand JH, Arslan A, Wu X-X, Wein R, Mulholland R, Shah M, Van Heerde W, Reutelingsperger CP, Lockwood CJ, Kuczynski E. Reduction of circulating annexin A5 levels and resistance to annexin A5 anticoagulant activity in women with recurrent spontaneous pregnancy losses. *Gynecology* 2006; 194(1):182-188.
- Ranjan A, Kalraiya RD. Invasive potential of melanoma cells correlates with the expression of MT1-MMP and regulated by modulating its association with motility receptors via N-glycosylation on the receptors. *Biomed Res Int* 2014; 2014:804680.

- Ray S, Reddy PJ, Jain R, Gollapalli K, Moiyadin A, Srivastava S. Proteomic technologies for the identification of disease biomarkers in serum: Advances and challenges ahead. *Proteomics* 2011; 11(11):2139-2161.
- Raynal P, Pollard HB. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1197(1):63-93.
- Regad T. Molecular and cellular pathogenesis of melanoma initiation and progression. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70:4055-4065.
- Ridley AJ. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol* 2006; 16(10):522-529.
- Rivera-Tapia JA, Rodríguez-Preval N. Mycoplasmas and antibiotics. *Salud Publica Mex* 2006; 48(1):1-2.
- Robert C, Ribas A, Wolchok JD, Hodi FS, Hamid O, Kefford R, Weber JS, Joshua AM, Hwu WJ, Gangadhar TC, Patnaik A, Dronca R, Zarour H, Joseph RW, Boasberg P, Chmielowski B, Mateus C, Postow MA, Gergich K, Ellassaiss-Schaap J, Li XN, Iannone R, Ebbinghaus SW, Kang SP, Daud A. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet* 2014; 384(9948):1109-1117.
- Rogers GS and Braun SM. Prognostic factors. *Dermatol Clin* 2002; 20(4):647-658.
- Rohatgi R, Ma L, Miki H, López M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 1999; 97:221-231.
- Rosenberger G, Kutsche K. AlphaPIX and BetaPIX and their role in focal adhesion formation. *Eur J Cell Biol* 2006; 85:265-274.
- Rossman KL, Der CJ, Sondek J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(2):167-180.

- Russo AE, Torrisi E, Bevelacqua Y, Perrota R, Libra M, McCubrey JA, Spandidos DA, Stivala F, Malaponte G. Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies. *Int J Oncol* 2009; 34(6):1481-1489.
- Sabel MS, Gibbs JF, Cheney R, McKinley BP, Lee JS, Kraybill WG. Evolution of sentinel lymph node biopsy for melanoma at a National Cancer Institute-designed cancer center. *Surgery* 2000; 128(4):556-563.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239(4839): 556-563.
- Sampieri CL, León-Córdoba K, Remes-Troche JM. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in gastric cancer as molecular markers. *J Cancer Res Ther* 2013; 9(3):356-363.
- Sánchez AM, Flamini MI, Baldacci C, Goglia L, Genazzani AR, Simoncini T. Estrogen receptor-alpha promotes breast cancer cell motility and invasion via focal adhesion kinase and N-WASP. *Mol Endocrinol* 2010; 24(11):2114-2125.
- Sharma M, Ownbey RT, Sharma MC. Breast cancer cell surface annexin II induces cell migration and neoangiogenesis via tPA dependent plasmin generation. *Exp Mol Pathol* 2010; 88:278-286.
- Shaverdashvili K, Wong P, Ma J, Zhang K, Osman I, Bedogni B. MT1-MMP modulates melanoma cell dissemination and metastasis through activation of MMP2 and RAC1. *Pigment Cell Res* 2014; 27 (2):287-296.
- Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2010; 26:397-419.
- Siple JF, Schneider DC, Wanlass WA, Rosenblatt BK. Levodopa therapy and the risk of malignant melanoma. *Ann Pharmacother* 2000; 34(3):382-385.
- Skarp KP, Vartiainen MK. Actin on DNA-an ancient and dynamic relationship. *Cytoskeleton* 2010; 67(8):487-495.

- Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 2006; 12(8):895-904.
- Strizzi L, Hardy KM, Kirsammer GT, Gerami P, Hendrix MJ. Embryonic signaling in melanoma: potential for diagnosis and therapy. *Lab Invest* 2011; 91(6):819-824.
- Sullivan AN, Bryant EA, Mark LA. Malignant melanoma in transplant patients: a case report and review of the literature. *Cutis* 2012; 89(3):133-136.
- Sun Y, Gao G, Cai J, Wang Y, Qu X, He L, Liu F, Zhang Y, Lin K, Ma S, Yang X, Qian X, Zhao X. Annexin A2 is a discriminative serological candidate in early hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2013; 34(3):595-604.
- Tai Y, Chen L, Shen T. Emerging roles of focal adhesion kinase in cancer. *Biomed Res Int* 2015; 2015:690690.
- Takahashi K, Suzuki K. WAVE2, N-WASP, and Mena facilitate cell invasion via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent local accumulation of actin filaments. *J Cell Biochem* 2011; 112(11):3421-3429.
- Tarhini AA, Agarwala SS. Cutaneous melanoma: Available therapy for metastatic disease. *Dermatol Ther* 2006; 19-25.
- Ten Klooster JP, Jaffer ZM, Chernoff J, Hordijk PL. Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor beta-PIX. *J Cell Biol* 2006; 172(2):759-769.
- Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma in the era of molecular profiling. *Lancet* 2009; 374(9687):362-365.
- Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC, Abraham JA. Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165(3):1198-1206.
- Tristante E, Martínez CM, Jiménez S, Mora L, Carballo F, Martínez-Lacaci I, de Torre-Minguela C. Association of a characteristic membrane pattern of annexin A2 with

high invasiveness and nodal status in colon adenocarcinoma. *Transl Res* 2015; Epub ahead of print.

Tronnier M, Mitteldorf C. Treating advanced melanoma: current insights and opportunities. *Cancer Manag Res* 2014; 6:349-356.

Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *N Engl Med* 2004; 351(10):998-1012.

Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev* 2012; 26(11):1131-1155.

Tulley S, Chen WT. Transcriptional regulation of seprase in invasive melanoma cells by transforming growth factor- β signaling. *J Biol Chem* 2014; 289(22):15280-15296.

Tzima E, Trotter PJ, Orchard MA, Walker JH. Annexin V relocates to the platelet cytoskeleton upon activation and binds to a specific isoform of actin. *Eur J Biochem* 2000; 246:4720-4730.

Valastyan S, Weinberg RA. Tumor Metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 2011; 147(2):275-292.

Valer P, Paul B, Eugenia B, Camelia B. Annexin A5 as independent predictive biomarker for subclinical atherosclerosis and endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus patients. *Clin Lab* 2013; 59(3-4):359-367.

Van Buul JD, Geerts D, Huveneers S. Rho GAPs and GEFs. *Cell and Migr* 2014; 8(2):108-124.

Van Genderen HO, Kenis H, Hofstra L, Narula J, Reutenlingsperger CPM. Extracellular annexin A5: Functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008; 1783:953-963.

Van Heerde WL, Lap P, Schoormans S, de Groot PG, Reutelingsperger CPM, Vroom TM. Localization of Annexin A5 in human tissues. *Annexins* 2004; 1:37-43.

Vandooren J, Geurts N, Martens E, Van den Steen PE, Opdenakker G. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nat Methods* 2013; 10(3):211-20.

- Veronesi U, Cascinelli N, Adamus J, Balch C, Bandiera D, Barchuck a, et al. Thin stage I primary cutaneous malignant melanoma. Comparison of excision with margins of 1 or 3 cm. *N Engl J Med* 1988; 318:1159-1162.
- Vicente-Manzanares M, Webb DJ, Horwitz AR. Cell migration at a glance. *J Cell Sci* 2005; 118:4917-4919.
- Volkovova K, Bilanicova D, Bartonova A, Letasiova S, Dusinska M. Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. *Environ Health* 2012; 11:1-12.
- Wang J, Zhang Y, Liu X, Ma J, Liu P, Hu C, Zhang G. Annexin A5 inhibits diffuse large B-cell lymphoma cell invasion and chemoresistance through phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Oncol Rep* 2014; 32(6):2557-2563.
- Wang KL, Wu TT, Resetkova E. Expression of annexin A1 in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Clin Cancer Res* 2006; 12:4598-4604.
- Wang RF, Zhang LH, Shan LH, Sun WG, Chai CC, Wu HM, Ibla JC, Wang LF, Liu JR. Effects of the fibroblast activation protein on the invasion and migration of gastric cancer. *Exp Mol Pathol* 2013; 95(3):350-356.
- Wehder L, Arndt S, Murzik U, Bosserhoff AK, Kob R, Von Eggeling F, Melle C. Annexin A5 is involved in migration and invasion of oral carcinoma. *Cell Cycle* 2009; 8(10):1552-1558.
- Weide B, Elsässer M, Büttner P, Pflugfelder A, Leiter U, Eigentler TK, Bauer J, Witte M, Meier F, Garbe C. Serum markers lactate dehydrogenase and S100B predict independently disease outcome in melanoma patients with distant metastasis. *Br J Cancer* 2012; 107(3):422-428.
- Weinstein D, Leininger J, Hamby C, Safai B. Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. *J Clin Aesthet Dermatol* 2014; 7(6):13-24.
- Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques* 2005; 39(1):75-85.

- Wu L, Yang L, Xiong Y, Guo H, Shen X, Cheng Z, Zhang Y, Gao Z, Zhu X. Annexin A5 promotes invasion and chemoresistance to temozolomide in glioblastoma multiforme cells. *Tumour Biol* 2014; 35(12):12327-12337.
- Wu X, Suetsugu S, Cooper LA, Takenawa T, Guan JL. Focal adhesion kinase regulation of N-WASP subcellular localization and function. *J Biol Chem* 2004; 279(10):9565-9576.
- Xue G, Hao LQ, Ding FX, Mei Q, Huang JJ, Fu CG, Yan HL, Sun SH. Expression of annexin a5 is associated with higher tumor stage and poor prognosis in colorectal adenocarcinomas. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43(9):831-837.
- Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND, Goto Y, Takeda K, Yamanoshita O, Iida M, Ohgami N, Tamura H, Kawamoto Y, Kato M. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT signaling in malignant melanoma. Progression and therapy. *Dermatol Res Pract* 2012:354191.
- Yang J, Yang F, Nie J, Zou X, Tian H, Qin Y, Liu C. Evaluation of Annexin A2 as a novel diagnostic serum biomarker for lung cancer. *Cancer Biomark* 2015; 15(2):211-217.
- Yang SF, Hsu HL, Chao TK, Hsiao CJ, Lin YF, Cheng CW. Annexin A2 in renal cell carcinoma: expression, function, and prognostic significance. *Urol Oncol* 2015; 33(1):11-21.
- Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28(1-2):15-33.
- Young P, Purdie D, Jackman L, Molloy D, Green A. A study of infertility treatment and melanoma. *Melanoma Res* 2001; 11(5):535-541.
- Zaravinos A. The regulatory role of microRNAs in EMT and Cancer. *J Oncol* 2015; 2015:865816.
- Zarogoulidis P, Tsakiridis K, Karapantzou C, Lampaki S, Kioumis I, Pitsiou G, Papaiwannou A, Hohenforst-Schmidt W, Huang H, Kesisis G, Karapantzou I, Chlapoutakis S, Korantzis I, Mpakas A, Karavasilis V, Mpoukovinas I, Li Q, Zarogoulidis K. Use of proteins as biomarkers and their role in carcinogenesis. *J Cancer* 2015; 6(1):9-18.

Zhai H, Achatya S, Gravanis I, Mehmood S, Seidman RJ, Shroyer KR, Haijar KA, Tsirka SE. Annexin A2 promotes glioma cell invasion and tumor progression. *J Neurosci* 2011; 31(40):1446-1460.

Zhang D, Golubkov VS, Han W, Correa RG, Zhou Y, Lee S, Stongin AY, Dong PD. Identification of Annexin A4 as a hepatopancreas factor involved in liver cell survival. *Dev Biol* 2014; 395(1):96-110.

Zhang HJ, Yao DF, Yao M, Huang H, Wang L, Yan MJ, Yan XD, Gu X, Wu W, Lu SL. Annexin A2 silencing inhibits invasion, migration, and tumorigenic potential of hepatoma cells. *World J Gastroenterol.* 2013; 19(24):3792-3801.

Zhang Y, Moschetta M, Huynh D, Tai YT, Zhang Y, Zhang W, Mishima Y, Ring JE, Tam WF, Xu Q, Maiso P, Reagan M, Sahin I, Sacco A, Manier S, Aljawai Y, Glavey S, Munshi NC, Anderson KC, Pachter J, Roccaro AM, Ghobrial IM. Pyk2 promotes tumor progression in multiple myeloma. *Blood* 2014; 124(17):2675-2686.

ANEXOS
