

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**EFECTO COMBINADO ANTITUMORAL CON WT1-siRNA  
Y CURCUMINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE  
MELANOMA MURINO B16F10 *in vitro*.**

**POR**

**JOSÉ LUIS ZACARÍAS HERNÁNDEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

**OCTUBRE, 2016**

**EFECTO ANTITUMORAL COMBINADO CON WT1-siRNA  
Y CURCUMINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE  
MELANOMA MURINO B16F10 *in vitro*.**

**Comité de Tesis**

---

Dr. Pablo Zapata Benavides  
Presidente

---

Dr. Edgar Mendoza Gamboa  
Secretario

---

Dra. Laura Trejo Ávila  
Vocal

---

Dr. Moisés A. Franco Molina  
Vocal

---

M.C. Leonardo Castillo León  
Vocal

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al laboratorio de Inmunología y virología y a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por abrirme las puertas para el desarrollo de mi maestría en Ciencias, su apoyo financiero y la infraestructura para concluir mi tesis de investigación, así como el financiamiento obtenido del proyecto CONACYT- Ciencia Básica No. 182231. Al Dr. Pablo Zapata Benavides por su apoyo durante estos años, por aceptarme desde la licenciatura y poder concluir ahora mi etapa de posgrado; su apoyo y amistad siempre se lo agradeceré. A mis compañeros de laboratorio, donde compartimos discusiones, aprendizajes y trabajo, gracias por su valioso apoyo durante mi estancia Edgar, Ramiro, Chago, Felipe, Mariela, Juan, con quienes fueron con los que más conviví no haciendo menos a nadie, gracias. Sin duda que durante este tiempo pasaron muchas cosas; muchas de las cuales aprendí y valoré durante esta etapa, gracias amigos que, aunque las cosas fueron duras o no como se esperaban, el tiempo que estuvieron durante este sueño, su apoyo para la realización de la tesis y lo que aprendimos y vivimos de todo: Fernanda, Martín, Nancy, Yaris, Alex, Zyanya, Carlos, Daniela, Leonardo, por mencionarlos, esperando no omitir a nadie gracias por todos los momentos vividos dentro y fuera del laboratorio. A los doctores que se volvieron amigos de igual forma todo su apoyo y amistad: Dr. Moises Franco, Dra. Diana Zarate, Dra. Diana Caballero, Dr. Edgar Mendoza, M.C. Leonardo Castillo, Dra. Lydia Rivera, Dra. Laura Trejo; agradezco mucho su apoyo, sus regañones y soluciones para que las cosas salieran de la mejor manera, su tiempo y su amistad las aprecio bastante.

Por último, no menos importante si no lo es todo, quiero agradecer a mi familia, a mis padres María Guadalupe Hernández Vázquez y José Luis Abelardo Zacarías Arzola, mis hermanas Evelyn y Leslie porque sin ellos no podría haber conseguido esto, sin su apoyo amor y dedicación no sería posible y les agradezco todo para seguir construyendo mis sueños.

Y siempre al escribir este tipo de agradecimientos es posible omitir a alguien, agradezco mucho a toda persona que hizo posible esto. ¡Muchas Gracias! ☺

## DEDICATORIA

*A mi familia:*

*sin ustedes nada, con ustedes todo.*

# ÍNDICE

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Cáncer.....	3
2.1.1 Breve historia del cáncer.....	3
2.1.2 Cáncer de piel.....	4
2.1.3 Melanoma maligno.....	5
2.1.4 Epidemiología.....	5
2.1.5 Factores de riesgo.....	7
2.1.6 Diagnóstico.....	8
2.1.7 Estadificación y pronóstico.....	10
2.1.8 Tratamiento.....	13
2.2 Terapia génica en melanoma.....	15
2.2.1 Terapia génica dirigida a células del tumor.....	16
2.2.2 Terapia con genes “suicidas”.....	16
2.2.3 Inactivación de oncogenes.....	17
2.2.4 Transferencia de genes supresores de tumor.....	18
2.2.5 Inserción de genes que codifican moléculas inmunológicas importantes.....	18
2.2.6 Bloqueo de la angiogénesis.....	19
2.2.7 Terapia génica dirigida a células del sistema inmune...	20
2.2.8 Terapia de silenciamiento génico.....	21
2.2.9 RNA de interferencia (siRNA).....	21
2.3 WT1.....	24
2.3.1 WT1 como blanco para terapia génica.....	26
2.3.2 WT1 como blanco de inmunoterapia para cáncer.....	27
2.4 Curcumina.....	28
2.4.1 Mecanismos de muerte de la curcumina.....	29
2.4.2 Modulación de citoquinas por la curcumina.....	30
2.4.3 Modulación de enzimas por la curcumina.....	31

2.5 Curcumina y WT1.....	31
3. JUSTIFICACIÓN.....	33
4. HIPÓTESIS.....	34
5. OBJETIVO GENERAL.....	35
5.1 Objetivos específicos.....	35
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
6.1 Obtención del plásmido con la secuencia del WT1-siRNA y su purificación a gran escala.....	37
6.2 Funcionalidad del plásmido.....	37
6.3 Cultivo celular.....	38
6.4 Tratamiento de células con el WT1-siRNA y curcumina <i>in vitro</i> .....	38
6.5 Ensayo de viabilidad celular mediante MTT.....	38
6.6 Evaluación de la muerte celular por medio de la técnica de Anexina y Yoduro de propidio.....	39
6.7 Ensayo de ciclo celular.....	39
6.8 Ensayo clonogénico.....	39
6.9 Extracción de proteínas y Western blot.....	40
6.9.1 Cuantificación de proteínas.....	40
6.9.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.....	40
6.9.3 Inmunodetección y revelado.....	40
6.10 Ensayo de fragmentación para ver muerte regulada por apoptosis.....	41
7. RESULTADOS.....	42
7.1 Evaluación del plásmido con el WT1-siRNA.....	42
7.2 Efecto de la transfección del plásmido WT1-iRNA en la viabilidad de la línea celular B16F10.....	44
7.3 Viabilidad de la línea celular B16F10 tratadas con WT1-siRNA, curcumina y la combinación de ambas...	44
7.4 Evaluación de la muerte celular por citometría de flujo....	47
7.5 Análisis de la expresión de la proteína de WT1.....	49
7.6 Capacidad de la línea celular B16F10 para la formación de colonias.....	51
7.7 Ensayo de fragmentación del DNA.....	52
8. DISCUSIÓN.....	53
9. CONCLUSIONES.....	58
10. PERSPECTIVAS.....	59
11. LITERATURA CITADA.....	60
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	74

## ÍNDICE DE TABLAS

		<b>Página</b>
Tabla 1	Sistema de clasificación TNM para melanoma maligno.	12
Tabla 2	Rangos de supervivencia a 5 años para pacientes con melanoma.	13
Tabla 3	Ejemplos de investigaciones utilizando iRNA en melanoma	23
Tabla 4	Sobre expresión de WT1 en tumores sólidos y enfermedades hematológicas.	27

## ÍNDICE DE FIGURAS

		<b>Página</b>
Figura 1	Mecanismo de silenciamiento génico por RNA de interferencia.	22
Figura 2	Organización del gen de WT1, mostrando sus isoformas alternas.	25
Figura 3	Estructura de la curcumina.	28
Figura 4	Modulación de diferentes vías de muerte por la curcumina.	30
Figura 5	Transformación de <i>E. coli</i> DH5- $\alpha$ con el plásmido WT1-siRNA.	42
Figura 6	Purificación del plásmido WT1-siRNA.	43
Figura 7	Efecto sobre la viabilidad producido sobre las células de melanoma murino	44
Figura 8	. Efecto sobre la viabilidad de la línea B16F10 con plásmido WT1- siRNA.	45
Figura 9	Efecto sobre la viabilidad de la línea B16F10 con curcumina.	45
Figura 10	Evaluación de la viabilidad celular combinando WT1-siRNA y Curcumina	46
Figura 11	Efecto sobre la viabilidad de células normales comparadas con células B16F10.	47
Figura 12	Citometría de flujo para observar muerte celular.	48
Figura 13	Morfología y viabilidad de las células B16F10 con los diferentes tratamientos.	48
Figura 14	Microscopia de fluorescencia para las células con los diferentes tratamientos a una CC50.	49
Figura 15	Western Blot para observar la expresión de WT1.	50
Figura 16	Efecto de los tratamientos en la capacidad clonogénica de la línea celular	51
Figura 17	Ensayo de fragmentación del DNA.	52



## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Ac.	Anticuerpo
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
BCNU	Carmustina
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
°C	Grados Celsius
Caspasa	Cisteína-aspartato-proteasa
CBDT	Cisplatino-Carmustina-Dacarbazina-Tamoxifeno
CCNU	Lomustina
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CC50	Concentración citotóxica media.
DTIC	Dacarbazina
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
g	Gramo
H <sub>2</sub> O	Agua
IL-2	Interleucina 2
IL-8	Interleucina-8

INF $\alpha$ 2b	Interferón alfa 2b
kDa	Kilodalton
mg	Miligramo
$\mu$ g	Microgramo
min.	Minuto
mL	Mililitro
$\mu$ L	Microlitro
mM	Milimolar
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
O <sub>2</sub>	Oxígeno
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimeriaza
PBS	Amortiguador fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas

pg	Picogrammo
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBS	Amortiguador tris salino
Tie-2	Receptor endotelial de tirosina quinasa
V	Volt
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGF-R2	Receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular

## RESUMEN

El gen del tumor de Wilm's (WT1), es un factor de transcripción involucrado en la modulación de genes en procesos de proliferación, crecimiento y apoptosis en muchas células transformadas donde se encuentra sobre expresado, además de ser indispensable para la supervivencia celular. WT1 es importante como marcador para el diagnóstico de melanoma. En este trabajo investigamos si el silenciamiento de WT1 en la línea celular de melanoma murino B16F10 con un RNA de interferencia (siRNA) en combinación de curcumina (*Curcuma longa*) tiene un efecto potencializador antitumoral. Las células B16F10 fueron tratadas con el plásmido que contiene el iRNA, curcumina y la combinación de ambos, obteniendo una concentración citotóxica media (CC50) por medio de la técnica de [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5- diphenyl tetrazolium bromide] MTT a las 24 horas de 0.5  $\mu$ g para el WT1-iRNA y de 7.5  $\mu$ M para la curcumina. Además, se evaluó el efecto citotóxico dependiente de dosis a las 48 y 72 horas. Se observó que la administración combinada de WT1-iRNA y curcumina tienen un efecto sinérgico en inhibir la proliferación celular en más de un 85%. Comprobado el silenciamiento de WT1 por western blot, en las células tratadas se observó apoptosis temprana con la técnica de Anexina V/ Yoduro de propidio, así como la formación de cuerpos apoptóticos y fragmentación del DNA; de igual forma, la nula capacidad de proliferación con el ensayo clonogénico. Estos resultados indican la inducción de apoptosis con el silenciamiento de la proteína de WT1 con iRNA y curcumina solos o combinados. Sugerimos que la estrategia de combinación de estos compuestos tiene potencial en la utilización alternativa a la quimioterapia para el tratamiento de melanoma de una forma no agresiva y con resultados prometedores.

## ABSTRACT

The Wilm's tumor gene (WT1), is a transcriptional factor involved in the modulation of certain genes that are involved in proliferation, growth and apoptosis in many types of transformed cells where it is overexpressed, also it is necessary for the cell survival. WT1 is important for the diagnosis of melanoma. In this study, was investigated whether the treatment in the silencing of WT1 in the murine melanoma B16F10 cell line with interference RNA (siRNA) in combination with curcumin (*Curcuma longa*) have an antitumor potential effect. B16F10 cells were treated with the plasmid WT1-siRNA, curcumin and both, getting an average cytotoxic concentration (CC50) after 24 hours of 0.6 µg for WT1-siRNA and 7.5 µM for curcumin. Also, was evaluated the cytotoxic effect after 48 and 72 hours a [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay] MTT assay was performed. We observed that the combined administration of WT1-siRNA and curcumin acted synergistically to inhibit B16F10 cell proliferation in 85%. WT1 silencing was demonstrated by western blotting, early apoptosis was observed by AnnexinV/PI, as well as apoptotic body formation, DNA fragmentation and cellular arrest in G1 phase, as well as no colony formation after the treatments with WT1-siRNA and curcumin. These results implicate the induction of apoptosis with the silencing of WT1 protein levels with siRNA or curcumin and both. This suggests that these combination strategies are potentially an alternative utilized to chemotherapy for the melanoma therapy in a security form with promising results.

*Se escucha a lo lejos,  
Una voz que sólo suspira,  
Un sonido que sólo ensordece. . .*

*Se observa a lo lejos,  
Una silueta que sólo descansa  
Una entidad que no dice nada. . .*

*¿Y qué espera hacer el científico?,  
¡Razonar!*

*Porque no hay serendipia sin comprensión,  
ni avances sin investigación.*

*Y porque él y sólo él transformará su entorno,  
Sin confiar en nadie, pues ya ha sido defraudado,*

*Y dudando hasta de su propia sombra,  
pues inclusive en la oscuridad se pierde,*

*¡No está, no existe!,*

*Así como la ideología creacionista. . .*

*Todo debe tener un ¿por qué?,*

*Todo debe ser demostrado. . .*

*El científico, sólo sin más,*

*Será capaz de aportar,*

*Pues morirá sin gloria ni honor,*

*Pero tendrá algo más grande:*

*El perdón de Dios. . .*

*JLZH*

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades que representan un serio problema de salud pública. De acuerdo con estadísticas nacionales como internacionales, observamos que las cifras van en aumento anualmente, y los pacientes afectados en estadios avanzados de la enfermedad con tratamiento no garantizan un desenlace prometedor incrementando así la mortalidad por esta enfermedad.

Actualmente el pilar de las terapias contra la enfermedad, dependiendo del sitio de afección, se basan en la cirugía, quimioterapia y radioterapia, donde podemos encontrar que dichas terapias son invasivas, conllevan a la pérdida de función del tejido y/u órgano; y que, a su vez, el conjunto de quimioterapia y radioterapia no son específicas para las células transformadas, llegando incluso a deteriorar más la salud del paciente y no garantizando que la enfermedad sea erradicada por completo.

El conocimiento adquirido en la inmunología, la biología molecular, la bioinformática, entre otras disciplinas, nos lleva a buscar alternativas y el desarrollo de nuevos tratamientos con resultados prometedores y menos costosos que las terapias actuales. Una de las herramientas en la terapia génica proporcionada del conocimiento aplicado son los iRNA en contra de un blanco potencial. El éxito de dicho tratamiento, se basa en evitar la expresión de una proteína potencial para la sobrevivencia y proliferación de la célula maligna. Se han realizado numerosos ensayos, tanto *in vitro*, *in vivo* y clínicos donde se demuestra la eficacia y resultados satisfactorios con el uso de terapia génica, desde enfermedades por agentes infecciosos, hasta el desarrollo y aplicación de terapias contra cáncer.

El blanco seleccionado en contra de nuestro siRNA es la proteína del gen del tumor de Wilm's (WT1). Esta proteína fue descubierta en 1990 primeramente como un oncogen, después como un gen supresor de tumor. Más adelante en diversos trabajos se observó que esta proteína está sobre expresada en muchos tipos de cáncer, lo que la asociaba al desarrollo y progresión de la enfermedad; además que WT1 juega un rol muy importante en la proliferación celular, la diferenciación de varios tipos de tejidos y en la apoptosis,

por lo cual es considerado un antígeno tumoral universal, y con ello, un blanco altamente específico para usarla en la terapia contra cáncer. El incremento de la expresión de WT1 está asociado con una prognosis desfavorable de múltiples tipos de cáncer y su baja regulación por diferentes estrategias de terapia génica conlleva a una disminución en la proliferación celular y conducir a la apoptosis.

Complementando la terapia génica con el WT1-iRNA para mejorar su eficacia, se han utilizado diferentes tipos de adyuvantes, principalmente el adyuvante incompleto de Freund, sales minerales, e incluso Citocinas como IL-2 o INF-  $\alpha$ , donde se demuestra que tienen un efecto positivo en la activación del sistema inmunológico, y así, para la vacunación; sin embargo, el uso de estos adyuvantes como complementos se limita en pacientes debido a que causan dolor en la zona de administración, una inflamación prolongada, altos costos y efectos adversos. El conocimiento ancestral en el uso de compuestos naturales extraídos de plantas para el tratamiento de múltiples enfermedades y llevado en la actualidad a estudios serios comprobando su eficacia, nos llevó a seleccionar al compuesto extraído de la raíz *Curcuma longa*, la curcumina, un polifenol, el cual en diversos estudios se ha comprobado su eficacia en efectos antivirales, anti-inflamatorios, bactericidas, y antitumoral. Se tiene documentado su uso en diferentes tipos de cáncer y se observa que la curcumina tiene la capacidad de modular diferentes moléculas involucradas en la supervivencia de las células transformadas, ya sea por diferentes vías de señalización o directamente modulando factores de transcripción.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Cáncer.

Si queremos definir al cáncer como enfermedad, debemos entender primeramente que no solamente es una, sino un conjunto de enfermedades que dependiendo del sitio de afección tendrá una nomenclatura para poder clasificarla (ASC, 2012). El cáncer comienza de manera general cuando las células de nuestro cuerpo comienzan a crecer de una manera anormal y descontrolada; este crecimiento está dado por diversos factores, ya sean genéticos, daños mecánicos, químicos y extrínsecos; así como por el estilo de vida, en los cuales se pierde la capacidad de la célula en respuesta a su propia regulación proliferativa, provocando en sus formas más severas “metástasis”, dañando a los tejidos adyacentes u órganos (Bertram, J. 2000). El tener una definición clara sobre esta enfermedad causa confusiones debido a la orientación ya sea clínica o en la investigación. Para obtener una definición concisa en la clínica, podemos decir que el cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por un crecimiento descontrolado y desregulado de las células, las cuales pueden llevar a provocar un tumor maligno por su invasión a otros tejidos (metástasis) provocando daño y/o pérdida de la función (DeBerardinis, A., et al. 2008).

#### 2.1.1 Breve historia del Cáncer

El cáncer no es una enfermedad actual, más bien es una enfermedad que se ha documentado por cientos de años. La primera definición fue utilizada por primera vez por Hipócrates (460-370 A.C.) cuando describió formaciones no ulcerosas y formaciones de tumores ulcerosos acuñando los términos de *carcinosis* y *carcinoma*. En griego, estas palabras se refieren a un cangrejo, más probable fue aplicada a la enfermedad debido a la forma de un dedo como la extensión de las proyecciones en un cáncer imaginándonos la forma de un cangrejo. Más adelante el físico Aulus Cornelius Celsus (28-50 A.C.), tradujo el término utilizado por Hipócrates en “cáncer”, el término en latín para cangrejo. Otro griego, Galen (130-200 D.C.), utilizó la palabra *oncos* (del griego para bulto) para describir a los tumores. El término de Galen es usado actualmente para los especialistas de cáncer: los oncólogos.

A lo largo de la historia, los seres humanos y otros animales han tenido cáncer, por lo cual, no es de extrañarse que desde los primeros registros de la historia las personas han escrito sobre el cáncer. Algunas de las primeras evidencias las encontramos entre los tumores óseos fosilizados de las momias humanas en el antiguo Egipto. Crecimientos que sugieren ser cáncer de hueso (osteosarcoma) se han visto en las momias. La destrucción del cráneo como se ve en el cáncer de cabeza y cuello se ha encontrado también. La descripción más antigua del cáncer (aunque no se utilizó la palabra cáncer) fue descubierto en Egipto y data de alrededor de 3000 A.C. Se llama el Papiro de Edwin Smith y es una copia de parte de un antiguo libro de texto egipcio en cirugía de trauma. En él se describen 8 casos de tumores o úlceras de mama que se elimina mediante la cauterización con una herramienta, siendo una posible cirugía. La escritura dice acerca de la enfermedad, "No existe un tratamiento".

Durante el siglo XV, los científicos desarrollaron un gran conocimiento sobre el cuerpo humano, algunos como Galileo y Newton comenzaron a utilizar el método científico, que después se utilizó para estudiar la enfermedad. Algunas autopsias llevadas a cabo por Harvey (1628), permitieron el entendimiento de la circulación de la sangre a través del corazón y el cuerpo, que hasta entonces era un misterio. En 1761, Giovanni Morgagni de Padua fue el primero que hizo lo que hoy en día es rutinario; el realizó autopsias relacionando la enfermedad del paciente a los hallazgos patológicos después de la muerte. Esto sentó las bases de la oncología científica, el estudio del cáncer. El cirujano John Hunter (1728-1793), sugirió que algunos tipos de cáncer pueden ser "curados" por cirugía y describió como la cirugía podía decidir cuales tipos de cáncer podían operarse (Sudhakar, A. 2009).

### **2.1.2 Cáncer de piel**

El cáncer al ser una enfermedad multicausal, también es una enfermedad que de acuerdo a su sitio de afección se le da una nomenclatura específica. Hablando específicamente del cáncer de piel, observamos que incluye un conjunto de neoplasias con muy diversas características, tanto por su origen como por sus factores de riesgo y pronóstico, distinguiéndose dos grupos principales: el grupo de melanoma maligno y el

grupo de cáncer cutáneo no melanoma, que abarca esencialmente los carcinomas espinocelulares y basocelulares (Martínez J. and Otley C., 2001).

El cáncer de piel ocupa el segundo lugar en frecuencia en México, ocupando el primer lugar de incidencia entre los hombres y el tercero entre las mujeres (Secretaría de Salud, 2015); y aunque hace algunos años, era común en personas mayores de 50 años, hoy, gracias a la mayor exposición que se tiene al sol y la costumbre de asistir a camas de bronceado, es posible observar la enfermedad desde los 18 años de edad, con los grandes costos que esto implica. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015) señalan que el cáncer de piel es el más frecuente en los seres humanos, pues cada año se diagnostican dos millones de nuevos casos en todo el mundo.

### **2.1.3 Melanoma maligno**

El cáncer de piel, específicamente el melanoma maligno, ha tenido un enorme interés en su estudio y tratamiento debido a que es el cáncer de piel más agresivo y potencialmente letal (Austoker J. 1994). El melanoma es un tumor que deriva de la proliferación de melanocitos atípicos, con capacidad o no para producir pigmento. Afecta principalmente la piel (90%), pero también puede localizarse en úvea e iris (9%) y con menor frecuencia en mucosas y meninges, siendo su principal característica una elevada capacidad de metástasis, la cual puede ocurrir por la vía linfática a tejidos vecinos o por la vía hemática a vísceras, principalmente a pulmón e hígado (Denninghoff V, et al. 2006).

### **2.1.4 Epidemiología**

El melanoma afecta predominantemente a adultos en edad productiva, no obstante, existe una relación en la aparición en infantes con un nevo melanocítico congénito gigante, el síndrome de nevos displásicos o la enfermedad genética xeroderma pigmentoso. En el sexo masculino, la enfermedad se presenta muy frecuentemente en tronco, mientras en el sexo femenino suele manifestarse en extremidades inferiores (Goldstein BG and Goldstein AO, 2001). Igualmente se ha tenido un aumento en adultos jóvenes, debido a su estilo de vida, el uso frecuente de cámaras de bronceado, exposiciones prolongadas a los rayos solares sin utilizar protección en piel, entre otras diversas, por lo cual la incidencia va en aumento (Secretaría de Salud, 2015).

El número de casos de melanoma se ha incrementado más rápido que cualquier otro cáncer. El crecimiento anual en la incidencia muestra variabilidad según las distintas poblaciones, pero en general fluctúa entre 3 a 7 % por año para personas caucásicas.

Se estima que esta enfermedad se duplica cada 10 a 20 años y se manifiesta con mayor preferencia en personas de piel clara, quienes son más sensibles a los rayos solares, sin embargo, puede darse en cualquier grupo étnico; el lugar que presenta la más alta incidencia de este tumor es Auckland, Nueva Zelanda, mientras que las cifras más bajas se dan en poblaciones asiáticas: China, India, Japón y Singapur (Leitner R., 2006).

En el año 2000, la incidencia de melanoma en el mundo fue de 2.4 por 100,000 para hombres y 2.21 por 100,000 para mujeres, produciéndose en los países desarrollados alrededor de 100,000 nuevos casos, lo que representa un 7-8% de todos los cánceres (Desmond R. and Soong S., 2003), mientras la mortalidad en el mismo año fue de aproximadamente 0.75 por 100,000 en varones y de 0.56 por 100,000 en mujeres (Walsh P., et al. 2000).

En los últimos 30 años, se ha registrado en varias partes del mundo un aumento de esta neoplasia de hasta 400% (Jemal A., et al. 2004). En Latinoamérica no existen estadísticas fidedignas sobre la incidencia de melanoma, pero estimaciones de la *Internacional Agency for Research on Cancer*, (2002), arrojan cifras que ubican a México en una incidencia de 2 por 100,000 habitantes y, la Clínica de Melanoma del Instituto Nacional de Cancerología aporta evidencia de un desarrollo de casi 500% en años recientes (Martínez-Saíd H, et al. 2004).

En contraste con otras neoplasias de detección temprana, incluyendo cáncer de mama, próstata, colo-rectal y cáncer cervical, el rango de mortalidad por melanoma en los Estados Unidos mostró un incremento del 29 % de 1975 al 2000 (Ries LAG, et al. 2003).

La *American Cancer Society* estima que tan solo este año habrá en los Estados Unidos más de un millón de nuevos casos de cáncer no melanoma, contra 62,480 nuevos casos de melanoma y calcula que se registrarán un promedio de 2,780 defunciones al año

por cáncer de piel no epitelial y 8,420 muertes por melanoma (American Cancer Society, 2010).

### **2.1.5 Factores de riesgo.**

Debido a que la etiología del melanoma es muy compleja, se siguen investigando factores que podrían estar asociados con su aparición y desarrollo, entre los que se encuentran factores ambientales, así como otros dependientes del huésped, principalmente de tipo genético.

Los diversos estudios destacan los siguientes como factores de riesgo asociados a melanoma:

- *Piel clara.* Los caucásicos presentan incremento de hasta 10 veces en incidencia de melanoma comparado con personas de raza negra, y de 7 veces en contraste con poblaciones indígenas y criollas de Latinoamérica. El cabello rojizo, las efélides y otros indicadores de daño solar, aumentan el riesgo 3 veces (Schaffer J., et al. 2004).
- *Presencia de más de 50 nevos melanocíticos y/o nevos displásicos.*
- *Antecedente familiar o personal de melanoma.* Entre 6-12% de los melanomas se desarrollan en este contexto (Greene M., 1999).
- *Exposición intermitente e intensa a las radiaciones ultravioletas,* particularmente en edades tempranas (Kraehn M., et al. 1994).
- *Otros factores geográficos,* como la latitud geográfica, altitud sobre el nivel del mar o época de año, pues influyen en la intensidad de los rayos solares.
- *Síndromes hereditarios raros* como el albinismo, xeroderma pigmentoso, síndrome de Li-Fraumeni (MacKie, R. 1998).
  
- *El status socioeconómico y el nivel de educación* (Rodríguez García R, et al. 2001).

El 50% de los melanomas se originan de novo, no obstante, se consideran lesiones precursoras: nevos melanocíticos congénitos gigantes, nevos displásicos y nevos melanocíticos adquiridos (Tannous Z., et al. 2005).

Análisis genéticos en familias con síndrome de nevos displásicos han llevado a la identificación de genes relacionados con la aparición del melanoma.

Diferentes autores coinciden en que alrededor del 20-40% de las familias con antecedentes de múltiples casos de melanoma, presentan alteraciones en el gen del inhibidor de la cinasa dependiente de la ciclina 2A (CDKN2A). Dichas mutaciones permiten que las células superen el punto de control en G1/S, dando como resultado proliferación y crecimiento descontrolado de las mismas (Piepkorn, M.2000); también se han encontrado alteraciones en p53 (Greene M. 1999). Otros estudios muestran que algunas familias presentan mutaciones en la proteína cinasa 4 (CDK4), que es el compañero de unión de p16 (Tsao H and Niendorf K, 2004).

Por otra parte, se han reportado mutaciones en otros genes implicados en casos esporádicos de melanoma, como son: NRAS, BRAF y PTEN/MMAC1 (Tsao H., et al. 2004).

### **2.1.6 Diagnóstico**

Para poder tener un diagnóstico de melanoma en primer lugar se da por sospecha clínica, seguido por la dermatoscopia y otros métodos diagnósticos no invasivos, pero solo se puede confirmar por medio de la Histopatología.

Por lo anterior, conviene dividir el diagnóstico en dos apartados: Diagnóstico Clínico y Diagnóstico Histológico.

- Diagnóstico Clínico. Un aspecto fundamental es el diagnóstico preciso y precoz de melanoma; éste puede comenzar con una detallada exploración física que permita determinar el número total de nevos, detectando aquellos con características clínicas sugestivas de malignidad.

Clásicamente, se emplea la regla del ABCD, la cual describe la mayor parte de las características clínicas de los melanomas, incluyendo lesiones pigmentadas con Asimetría, Bordes irregulares, cambios de Color y Diámetro mayor a 6 mm; sin embargo, esta regla no resulta fiable en el diagnóstico de melanoma en etapas iniciales, pues las lesiones pueden medir menos de 6 mm, ser simétricas y de bordes regulares. Adicionalmente, el prurito, la ulceración y el sangrado en una lesión pigmentada son

signos de alerta (Goldstein BG and Goldstein AO., 2001). Algunos autores incluyen la letra E, de Evolución o Elevación.

Se sabe que la acertividad diagnóstica del melanoma con el examen clínico es de aproximadamente 60% (Grin C, et al. 1990).

El diagnóstico diferencial se debe plantear principalmente con nevos melanocíticos atípicos, y con otras lesiones como son: nevos traumatizados o irritados, léntigo actínico, nevo azul, queratosis seborréica, carcinoma basocelular pigmentado, angioqueratoma, hematoma, lago venoso, hemangioma, dermatofibroma y queratosis actínica pigmentada (Goldstein B., and Goldstein A. 2001).

La dermatoscopia ha aumentado la capacidad de diagnosticar correctamente lesiones pigmentadas en un 10 a un 20% y es útil, particularmente en la diferenciación del melanoma de las lesiones pigmentadas no melanocíticas, con una sensibilidad que va desde un 60 hasta un 95% dependiendo del grado de experiencia del observador, de la dificultad diagnóstica de la lesión y de los criterios dermatoscópicos utilizados, etc. (Grin C, et al. 1990).

- Diagnóstico Histológico. Puesto que el melanoma es curable cuando se diagnostica precozmente, es importante realizar una biopsia de las lesiones pigmentadas con características clínicas sospechosas, para su estudio histopatológico.

Se reconocen dos tipos de biopsias: escisional e incisional (Swanson N., et al. 2002).

La biopsia escisional con un margen de 1 a 2 mm es la más recomendada, puesto que extirpa la lesión totalmente y permite su análisis completo. No obstante, antes de realizar la biopsia deben examinarse los ganglios regionales, pues en caso de tratarse de un melanoma, la inflamación reactiva de los ganglios puede resultar en falsos positivos. La biopsia debe orientarse en sentido de drenaje linfático y, en lo posible, siguiendo las líneas de tensión de la piel.

La biopsia incisional se puede realizar en lesiones grandes sospechosas, tomándose la muestra de la zona más pigmentada o de la zona más elevada. Se ha comprobado que este procedimiento no aumenta el riesgo de extensión local o recurrencia de melanoma, no

obstante, puede caerse en errores diagnósticos en caso de que la muestra no sea tomada del sitio adecuado.

La exploración y evaluación del estado de los ganglios linfáticos en el estudio patológico es el factor pronóstico más importante en los pacientes con melanoma (Brady M., 2004); el ultrasonido de los ganglios puede aumentar la sensibilidad (de 85.4% hasta 99.1%) en el diagnóstico de metástasis ganglionares (Saiag P, et al. 2005).

En la actualidad, la biopsia del ganglio centinela se considera apropiada para los pacientes sin ganglios palpables y para aquellos con tumores de grosor igual o superior a 1 mm, ulcerados, con nivel de Clark IV-V, datos de regresión, biopsia por rasurado e incongruencia clínica con el Breslow reportado (Dubois R., et al. 2001).

También se ha empleado inmunohistoquímica para el diagnóstico de melanoma, siendo los principales marcadores utilizados el S100 y el HMB-45, aunado a otros marcadores tales como antígenos de diferenciación melanocítica (MelanA/MAET1, MITF y tirosinasa) y marcadores de proliferación celular (Ki-67), (Brady M. 2004). Los niveles séricos de la proteína S100 y lactato deshidrogenasa se consideran marcadores de carga tumoral en pacientes con enfermedad avanzada (Schaffer J., et al. 2004).

### **2.1.7 Estadificación y pronóstico**

Los esquemas de clasificación y estadificación en cáncer son de mucha utilidad, ya que permiten identificar a aquellos pacientes que presentan un alto riesgo de presentar enfermedad avanzada, comparar opciones de tratamiento, recomendar las terapias más adecuadas, así como ofrecer información pronóstica al paciente.

Al igual que en la mayoría de las neoplasias malignas, en melanoma los factores pronósticos a nivel histológico se agrupan en dos metodologías principales: *Índice de Breslow* y *niveles de Clark*.

El índice de Breslow es considerado el indicador pronóstico más útil. Se basa en la medición del grosor del melanoma; por regla general, entre más delgada sea la lesión,



mejor será el pronóstico del paciente, quedando establecidos los siguientes criterios (Ferrándiz, C. 2001).

- Bajo riesgo; melanomas de espesor menor de 1.5 mm.
- Riesgo moderado; melanomas de entre 1.5 y 4 mm de grosor.
- Riesgo elevado; melanomas de más de 4 mm de espesor.

Los niveles de (Clark WH., et al. 1969) permiten establecer el grado de compromiso vertical existente, siendo éstos:

I.- Intraepidérmico

II.- Zona de unión dermo-epidérmica

III.- Dermis papilar

IV.- Dermis reticular

V.- Tejido subcutáneo

Se utiliza con mucha frecuencia el sistema TNM, oficializado en 2002 por el *American Joint Committee on Cancer -AJCC-* para describir la extensión anatómica de distintas neoplasias. La letra T se refiere al espesor del tumor, la N al número de ganglios regionales cercanos que se hallan afectados y la M a presencia de metástasis a distancia.

Para melanoma, el sistema TNM agrupa en general los estadios mostrados en la tabla 1 (Balch C., et al. 2001):

**Tabla 1.** Sistema de clasificación TNM para melanoma maligno.

<b>ESTADÍO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
<b>O</b>	Melanoma in situ, sin metástasis a nodos linfáticos, sin metástasis a distancia
<b>IA</b>	Tumor de 1 mm o menos de espesor, nivel II o III de Clark sin ulceración, sin metástasis a nodos linfáticos, sin metástasis a distancia
<b>IB</b>	Tumor de 1 mm o menos de espesor, nivel IV o V de Clark o con ulceración o lesión de más de 1mm, pero menos de 2 mm de grosor sin ulceración, en ambos casos sin metástasis a nodos linfáticos y sin metástasis a distancia
<b>IIA</b>	Tumor de más de 1 mm, pero menos de 2 mm de grosor con ulceración o melanoma de más de 2 mm, pero menos de 4 mm de grosor sin ulceración, en ambos casos sin metástasis a nodos linfáticos y sin metástasis a distancia
<b>IIB</b>	Tumor de más de 2 mm, pero menos de 4 mm de grosor con ulceración o lesión de más de 4 mm de espesor sin ulceración, en ambos casos sin metástasis a nodos linfáticos y no hay metástasis a distancia
<b>IIC</b>	Tumor de más de 4 mm de espesor con ulceración, sin metástasis a nodos linfáticos ni metástasis a distancia
<b>III</b>	Para todos los casos cualquier espesor de tumor. a) Metástasis a un solo nodo linfático; b) Metástasis a dos o tres nodos regionales o metástasis regional intralinfática sin metástasis nodal; c) Metástasis a más de cuatro nodos regionales, o nódulos linfáticos enmarañados, o metástasis en tránsito o satélite con nodos regionales metastáticos. Para ningún inciso se presenta metástasis a distancia
<b>IV</b>	Cualquier grosor de tumor, cualquier número de ganglios regionales metastáticos, con metástasis distante.

En la tabla 2 se muestran los rangos de supervivencia de pacientes a cinco años, según estadio y presencia o no de ulceraciones:

**Tabla 2.** Rangos de supervivencia a 5 años para pacientes con melanoma.

	<b>Tumor no ulcerado</b>	<b>Tumor ulcerado</b>
<b>IA</b>	95%	-
<b>IB</b>	89%	91%
<b>IIA</b>	79%	77%
<b>IIB</b>	67%	63%
<b>IIC</b>	-	45%
<b>IIIA</b>	67%	-
<b>IIIB</b>	54%	52%
<b>IIIC</b>	28%	24%

En cuanto al estadio IV, debido a que se presenta metástasis a distancia, se han formado tres categorías, de acuerdo al sitio de afectación, las cuales son: M1a (piel, tejido subcutáneo y nodos linfáticos), M1b (pulmón) y M1c (otras vísceras); los rangos de supervivencia a un año se han estimado en 59% para M1a, 57% para M1b y 41% para M1c (Balch C., et al. 2001).

Se ha establecido que el ser hombre y presentar melanoma en tronco implica un peor pronóstico, además se considera que el subtipo clínico lentigo maligno es el de mejor pronóstico y si se trata en fase de extensión radial la mortalidad es prácticamente nula. Asimismo, se ha observado un mal pronóstico en casos con invasión tumoral de vasos en la biopsia, y peor aún en melanomas con ulceraciones y en aquellos con elevado índice mitótico (Ferrándiz, C. 2001).

### **2.1.8 Tratamiento**

La escisión quirúrgica en etapas tempranas es, sin duda, la terapia más efectiva en el manejo de melanoma maligno (Zitelli J., et al. 1997).

Desafortunadamente muchos de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas, lo cual ha llevado a la búsqueda y desarrollo de diversas modalidades de tratamiento, pero a pesar de numerosos esfuerzos ensayando combinaciones con terapias existentes, no se ha logrado incrementar la sobrevida de los pacientes en forma significativa.

Las opciones de tratamiento y los intervalos de respuesta para pacientes con melanoma varían, según la profundidad de la lesión primaria y el estadio en que se halle el tumor.

En general, las estrategias terapéuticas contra esta neoplasia incluyen, además de la cirugía: radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y combinaciones entre éstas.

Desde hace varias décadas se reconoció la relativa resistencia del melanoma a la radioterapia; no obstante, en la actualidad se indica su uso en pacientes con elevado riesgo de recurrencia, como terapia adyuvante enfocada al sitio de tumor primario. Las indicaciones son: melanoma de cabeza y cuello, melanoma primario profundo o ulcerado, recurrencia local y metástasis cutáneas, subcutáneas y ganglionares (Ballo M, and Ang K. 2003).

Respecto a la quimioterapia, ha resultado ineficaz para el tratamiento de melanoma metastásico, siendo la dacarbazina (DTIC) la única droga aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) para combatir estadios avanzados del tumor, con rangos de respuesta de 10-20%, pero sin mejoras en la supervivencia a 5 años (Legha S. 1989), (Anderson C., et al. 1995).

Los escasos resultados obtenidos con quimioterapia con único agente, incluyendo además de dacarbazina compuestos de platino, vinca alcaloides, nitrosureas, taxanos, etc., llevaron al desarrollo de la poliquimioterapia, ensayando combinaciones como el BOLD (bleomicina, vincristina, CCNU, DTIC), CVD (cisplatino, vinblastina y DTIC) y el esquema Darmouth o CBDT (cisplatino, BCNU, DTIC y tamoxifeno), obteniendo rangos de respuesta de 30-50%, con efectos de corta duración, elevada toxicidad y sin aumento en la supervivencia de los pacientes (O'Day S., et al. 2002).

Varios estudios *in vitro* han reportado la presencia de receptores estrogénicos en células de melanoma derivadas de tumores metastásicos (Fisher R., et al. 1973), (Walker M., et al. 1987), por lo que se ha probado el tratamiento con tamoxifeno. No obstante, largos estudios randomizados no han podido demostrar un papel positivo de la terapia antiestrogénica en el manejo de melanoma metastásico (Lens M., et al. 2003).

Se han efectuado también numerosos ensayos clínicos utilizando IL-2 e INF- $\gamma$ 2b, con rangos individuales de respuesta en alrededor del 15-20 % y raros casos de remisión durable, asociado a una significativa toxicidad (O'Day S., et al. 2002); por otro lado, la inyección de *Corynebacterium parvum* y BCG han servido poco como adyuvantes en inmunoterapia (Lipton A., et al. 1983).

Importantes instituciones como la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (Keilholz U., et al. 1997) y el Centro de Cáncer M. D. Anderson (Legha S., et al. 1996) han desarrollado grandes estudios de fase III, combinando diversos regímenes de quimioterapia con IL-2 e INF- $\gamma$ 2b, para tratar pacientes con melanoma en estadio IV; el primero no reportó mejoras significativas en la supervivencia de los pacientes, en tanto el segundo obtuvo un incremento en el número de respuestas durables y un aparente aumento en la supervivencia media de los pacientes, aunque la toxicidad del régimen fue severa.

Estudios de fase III más recientes concluyeron que los resultados de la bioquimioterapia no son mejores que los de la poliquimioterapia (Atkins M., et al. 2003).

Los resultados obtenidos hasta hoy en el tratamiento de melanomas en estadios avanzados no han sido muy alentadores, por lo que el conocimiento adquirido de la inmunología y la biología molecular han hecho esfuerzos en aplicar herramientas de terapias eficaces mediante el desarrollo de vacunas y estudios sobre terapia génica.

## **2.2 Terapia génica en melanoma**

La terapia génica (TG) es una modalidad emergente y muy prometedora para el tratamiento del cáncer.

Se define como la transferencia de nuevo material genético dentro de una célula para obtener un beneficio terapéutico, esto mediante: a) reemplazo o inactivación de genes disfuncionales, b) reemplazo o adición de genes funcionales, o c) inserción de un gen dentro de una célula para inducir una respuesta inmune o citotóxica (Mulherkar R. 2001).

La transferencia de genes a las células blanco, puede ocurrir en dos formas (Lazo P. 1996):

- *Ex vivo*: células de un tejido seleccionado son removidas para ser modificadas genéticamente y luego reintroducidas en el cuerpo del paciente.

- *In vivo*: el material genético es inyectado directamente al paciente, generalmente en el tejido o área a tratar.

En la actualidad, la TG enfocada al tratamiento de melanoma metastásico se basa en la introducción de genes exógenos, ya sea en células tumorales o en células del sistema inmune.

### **2.2.1 Terapia génica dirigida a células del tumor**

Dentro de esta categoría se pueden englobar: 1) introducción de genes que estimulan la sensibilidad a fármacos citotóxicos o genes “suicidas”, 2) inactivación de oncogenes, 3) transferencia de genes supresores de tumor, 4) inserción de genes que codifican moléculas inmunológicas importantes y 5) bloqueo de angiogénesis.

### **2.2.2 Terapia con genes “suicidas”**

Se basa en la transferencia de un gen, cuyo producto es capaz de metabolizar un fármaco inactivo y convertirlo en un derivado tóxico que mata a las células en que se generó. Ampliamente usado en cáncer, incluido melanoma ha sido el sistema de la timidina quinasa derivada del virus herpes (HSV-*tk*), el cual genera derivados trifosfato de la droga ganciclovir (GCV), inhibiendo la síntesis de DNA (Moolten F. 1994).

Vile et al, inyectaron directamente DNA codificante para HSV- *tk* en ratones C57/BL con melanomas B16 establecidos y luego administraron GCV, resultando en reducciones significativas del tamaño de los tumores, en comparación al grupo que no recibió el gen (Vile R., et al. 1993).

Posteriormente, en un estudio clínico en fase I/II se trató a 8 pacientes con melanoma avanzado con inyección directa de células de una línea de melanoma murino transfectadas con el gen HSV- *tk* sobre nódulos metastásicos, administrando después de una semana infusiones diarias de GCV por 14 días; el tamaño de los tumores disminuyó moderadamente y en 3 pacientes se observó necrosis de los nódulos (> 50%), (Klatzmann D., et al. 1998).

También ha sido utilizado en esta neoplasia el sistema de la citosin desaminasa (CD) presente en bacterias y levaduras, el cual convierte la droga 5-fluorocitosina (5-FC) en el producto citotóxico 5-fluorouracilo.

En un estudio desarrollado *in vitro* e *in vivo* con células B16F10 de melanoma murino, emplearon *Bifidobacterium infantis* transformada con un plásmido recombinante codificando el gen CD y 5-FC; *in vitro*, las células sufrieron marcados daños morfológicos y el crecimiento celular fue significativamente inhibido, mientras que en los ratones con tumores establecidos el volumen de los tumores tuvo una disminución importante, en comparación con los controles (Yi C., et al. 2005).

### **2.2.3 Inactivación de oncogenes**

Los oncogenes provienen de protooncogenes, que son genes que codifican proteínas con una función en la célula normal, con un papel en el control del crecimiento celular. No obstante, alteraciones moleculares en solo uno de los dos alelos de un protooncogen bastan para que éste se convierta en oncogen y promueva el crecimiento descontrolado y la conversión de la célula a un estado maligno. En melanoma, se han considerado blancos de terapia génica los siguientes oncogenes: miembros de la familia *Ras*, *c-Myc* y *Stat3*.

Son los oncogenes de la familia *Ras* los que se han encontrado activados más frecuentemente en tumores humanos y animales -entre ellos el melanoma-, por lo que se considera a estos genes como un buen blanco para frenar el progreso del cáncer. En un estudio realizado en 1998, se ensayó la actividad de un compuesto antagonista de *Ras* en dos grupos de ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) xenotransplantados con células de melanoma humanas 518A2 y 607B, observando que existía una inhibición estadísticamente significativa del crecimiento de los tumores (82 y 90%, respectivamente), mientras que *in vitro* ocurría disminución del número de células y reversión del fenotipo transformado en ambas líneas celulares (Jansen B., et al. 1999).

En años recientes, se ha encontrado una fuerte asociación entre la desregulación en la expresión del gen *c-Myc* y la tumorigénesis en melanoma.

(Leonetti C, et al. 1996) inhibieron la proliferación de tres líneas celulares de melanoma humano *in vitro* e *in vivo* usando oligodesoxinucleótidos antisentido dirigidos contra *c-Myc*, logrando inducción de apoptosis. En los ratones xenotransplantados se obtuvo una citotoxicidad dependiente de dosis y una marcada disminución del crecimiento tumoral, reducción del número de metástasis pulmonares y un aumento en la sobrevivencia.

Otro gen cuya activación ocurre con alta frecuencia en melanoma, contribuyendo directamente a la oncogénesis y progresión maligna es *Stat3*.

(Niu et al. 1999) usaron terapia génica para inhibir a *Stat3* activado en células de melanoma B16 *in vivo*. Para ello usaron un dominante negativo de *Stat-3*, obteniendo una regresión significativa de los tumores y una apoptosis masiva en los mismos.

#### **2.2.4 Transferencia de genes supresores de tumor**

El gen supresor de tumor *p53* es el que se halla alterado con más frecuencia en tumores humanos, incluido melanoma. Por lo tanto, se ha convertido en candidato ideal para terapia génica, mediante transferencia de una copia normal del gen mutado, con lo cual se reestablece la función perdida.

En un ensayo se usó un adenovirus para sobreexpresar *p53* wild type en las líneas de melanoma B16 (murina) y SK-MEL-24 (humana). Se logró inducir apoptosis *in vitro* e inhibir el crecimiento tumoral en ratones transplantados con ambos tipos celulares (Cirielli C., et al. 1996).

#### **2.2.5 Inserción de genes que codifican moléculas inmunológicas importantes**

Considerando que el melanoma es capaz de inducir en algunos pacientes una respuesta inmune celular y humoral antitumoral, se han realizado numerosos estudios buscando nuevas estrategias que permitan aprovechar la transferencia de genes para desarrollar y potenciar la frecuencia e intensidad de la respuesta inmune contra esta neoplasia.



Por lo anterior, para el diseño de vacunas basadas en células tumorales, varios estudios clínicos han probado la eficacia de células de melanoma, generalmente autólogas o bien alogénicas, transfectadas por ejemplo con citocinas como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o moléculas co-estimuladoras como el antígeno leucocitario humano B7 (HLA-B7).

Se ha demostrado que la vacunación con células de melanoma humano autólogas modificadas para producir GM-CSF, muestra histológicamente una intensa infiltración con células T (CT), células dendríticas, macrófagos y eosinófilos en los sitios de inmunización en 21/21 pacientes. Además, lesiones metastásicas post-vacunación fueron densamente infiltradas con CT y plasmáticas, observándose destrucción extensa de tumores (80%), fibrosis y edema en 11/16 pacientes (Soiffer R., et al. 1998).

Por otra parte, la expresión de moléculas de HLA-B7 por células, origina que éstas sean reconocidas por el sistema inmune como extrañas, lo que ha sido aprovechado para potenciar la respuesta contra melanoma.

Stopeck y Hersh analizaron datos disponibles de cuatro estudios clínicos fase I/II de inyección intratumoral de un complejo HLA-B7/lípido en pacientes con melanoma metastásico. De 36 pacientes, el 36% experimentaron regresión de tumor en nódulos inyectados y un 19% mostraron evidencia de regresión en nódulos de melanoma distantes que no fueron inyectados (Hersh E. and Stopeck A. 1997).

### **2.2.6 Bloqueo de la angiogénesis**

La inducción de angiogénesis se considera un mecanismo esencial para garantizar el aporte de oxígeno y nutrientes para el crecimiento, invasión y metástasis de los tumores malignos, siendo el melanoma una de las neoplasias más activas en ese contexto.

Es por eso que se han realizado investigaciones que buscan frenar la angiogénesis, teniendo como blanco a numerosos factores pro-angiogénicos sintetizados por células de melanoma, incluyendo VEGF, bFGF, IL-8, PDGF, entre otros.

Jendreyko, et al., diseñaron un modelo puro con la línea de melanoma humano M21, en el cual bloquearon VEGF-R2 y Tie-2 simultáneamente o el VEGF-R2 solo, por inyección

subtumoral de adenovirus recombinantes expresando anticuerpos biespecíficos (intradiabodies), resultando en una inhibición significativa tanto del crecimiento del tumor como de la angiogénesis (92.2 vs. 74.4%, respectivamente) (Jendreyko N., et al. 2005).

### **2.2.7 Terapia génica dirigida a células del Sistema Inmune**

En melanoma, se han efectuado estudios que involucran la administración de vacunas con linfocitos T y células dendríticas genéticamente modificadas.

Anteriormente se había logrado aislar de pacientes vacunados contra esta malignidad, células T capaces de reconocer tumores autólogos, permitiendo el desarrollo de estudios de transferencia adoptiva, que han mostrado regresión de melanomas en modelos experimentales.

En un experimento, se insertó el gen que codifica para la neomicina fosfotransferasa en una porción de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) de pacientes con melanoma avanzado, usando un vector retroviral. Los TIL modificados fueron reintroducidos en los enfermos, obteniéndose regresión de melanomas metastásicos en casi la mitad de los casos (Rosenberg S., et al. 1990). Por otro lado, se han empleado estrategias de transferencia génica basada en células presentadoras de antígeno profesionales, como son las células dendríticas (DCs), las cuales tienen una potente capacidad para iniciar una respuesta inmune efectiva mediada por células T.

En una investigación se transdujeron mediante retrovirus DCs humanas con el antígeno de melanoma MART-1, mostrando la capacidad de las DCs para desplegar una fuerte respuesta de linfocitos T citotóxicos y una potente producción de TIL específicos de antígeno (Reeves M., et al. 1996).

Kikuchi et al., modificaron DCs *ex vivo* mediante un vector adenovirus recombinante CD40L, luego las inyectaron intratumoralmente en nódulos de melanoma B16, resultando en regresión de tumor, también observada en nódulos metastásicos distantes, además de mejora en la supervivencia de los ratones (Kikuchi T., et al. 2000).

### **2.2.8 Terapia de silenciamiento génico**

La posibilidad de atenuar o bloquear selectivamente la expresión de genes blanco específicos involucrados en la progresión tumoral, representa en la actualidad un método revolucionario en la lucha contra el melanoma maligno y otros cánceres.

Los agentes de silenciamiento de genes más ampliamente conocidos son: ribozimas, oligonucleótidos antisentido y RNA de interferencia (iRNA), (Bhindi R., et al. 2007).

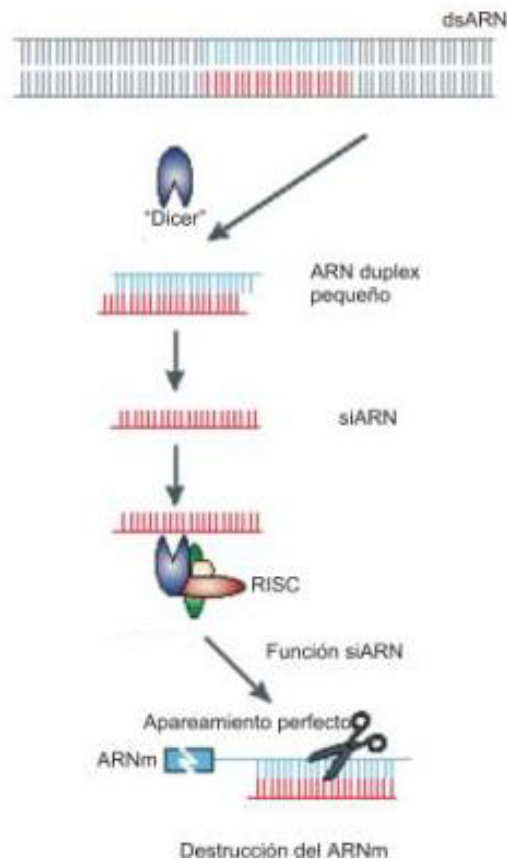
### **2.2.9 RNA de interferencia (iRNA)**

En 1990, un grupo de biólogos moleculares trabajaba en la obtención de petunias de un color púrpura más intenso, para lo cual introdujeron en la planta una copia extra del gen codificante de la enzima chalcona sintasa, la cual participa en la producción de pigmentos de antocianina, responsables del color púrpura en las petunias. Inesperadamente obtuvieron petunias con flores bicolor y otras blancas y denominaron al fenómeno observado co-supresión, puesto que la introducción de una copia extra de un gen resultaba en la supresión del mismo gen endógeno presente en la planta (Napoli C., et al. 1990). Dos años más tarde, Romano y Macino publicaron resultados obtenidos al intentar sobreproducir el pigmento naranja que sintetiza el hongo *Neurospora crassa*, introduciendo copias extra de genes involucrados en la producción de carotenos. Obtuvieron hongos de color blanquecino y llamaron a lo ocurrido “quelling” (Romano N., and Macino G. 1992).

Posteriormente en un estudio se buscaba inhibir la expresión de algunos genes involucrados en el desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, para lo cual se emplearon oligonucleótidos antisentido. Tras analizar los resultados, los investigadores encontraron que cuando introducían el oligo sentido y antisentido juntos, la supresión del gen de interés era mucho más eficiente y duradera, más no pudieron explicar el mecanismo que llevaba a dicho efecto (Guo S., and Kemphues K. 1996).

Ya para 1998, el grupo del doctor Craig Mello demostró que el fenómeno era producido por la formación de RNA de doble cadena en *C. elegans*, siendo el doctor Andrew Fire quien le dio el nombre de RNA de interferencia (iRNA), (Fire A., et al. 1998).

Hoy sabemos que el iRNA constituye un proceso de silenciamiento génico post-transcripcional altamente específico, conservado evolutivamente, el cual usa RNA de doble cadena (dsRNA) como señal para activar la degradación de un RNA mensajero (mRNA) homólogo (Sharp P. 2001). El mecanismo por el cual dsRNA induce el silenciamiento de un gen involucra dos pasos. Primero, un dsRNA largo es reconocido por una enzima ribonucleasa tipo III (RNAasa III) denominada Dicer, la cual corta el dsRNA en sRNA más pequeños de 21-23 nucleótidos (nt). A estos se les conoce como pequeños RNA interferentes (siRNAs), los cuales son luego incorporados dentro de un complejo nucleasa multicompetente conocido como RISC (Complejo de silenciamiento inducido por RNA), el cual reconoce y destruye el mRNA blanco, impidiendo que sea traducido a la proteína correspondiente (Hannon G. 2002). El mecanismo de acción del iRNA se ilustra en la Figura 1.



**Figura 1.** Mecanismo de silenciamiento génico por RNA de interferencia.

Se ha observado un fenómeno de amplificación del efecto del iRNA en *C. elegans* y en plantas, el cual se ha explicado por la existencia de RNA polimerasas dependientes de RNA, las cuales no se han hallado en células de mamífero (Hannon G. 2002).

El éxito del uso de la tecnología del iRNA en cáncer depende, en gran medida, de hallar los mejores blancos terapéuticos.

Para melanoma, se han utilizado ya iRNA dirigidos contra distintos genes, involucrados en la progresión tumoral y metástasis. En la Tabla 3 se resumen algunos trabajos que han echado mano de esta valiosa herramienta molecular contra distintos melanomas, mostrando el blanco terapéutico, función propuesta por los investigadores y principales resultados obtenidos (Tabla 3):

**Tabla 3.** Ejemplos de investigaciones utilizando iRNA en melanoma.

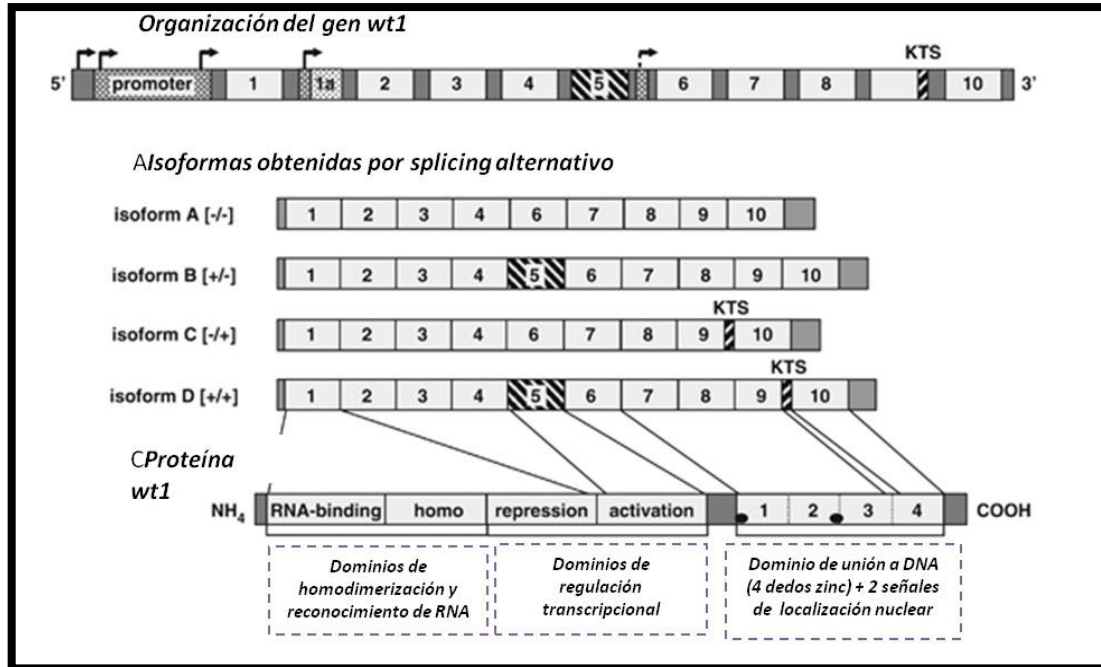
<b>Año de la publicación</b>	<b>Blanco terapéutico</b>	<b>Función propuesta</b>	<b>Resultados</b>
Sumimoto H. et al. 2004	BRAF	Crecimiento invasividad	e Inhibición del crecimiento celular por supresión de actividad MAPK y pérdida de invasividad por baja de MPM
Chen X, et al. 2006	CD147	Proliferación, invasividad metástasis	y Disminución del tamaño de tumores y de angiogénesis (baja de VEGF)
Hong J, et al. 2006	c-MYC y Stat3	Proliferación	Inhibición de la proliferación celular (sinergismo)
Katagiri Y, et al. 2006	Skp2	Proliferación	Inhibición de la proliferación tumoral por pérdida de degradación de p27 <sup>Kip1</sup>
Nakai N., et al. 2007	Mitf	Supervivencia melanoma	de Disminución de viabilidad celular por inducción de apoptosis
Qian F, et al. 2008	PRL-3	Invasividad metástasis	y Marcada inhibición de la proliferación del tumor, pérdida de invasividad y aumento en la supervivencia de ratones
Qian H., et al. 2009	MTA-1	Metástasis	Supresión del crecimiento tumoral e inhibición de metástasis

BRAF= *Gen transformante Braf*; CD147= *Inductor de metaloproteinasas de matriz extracelular*; c-MYC= *Proto-oncogén c-myc*; Stat3= *Transductor de señal y activador de transcripción 3*; Skp2= *Proteína cinasa 2 asociada a fase S*; Mitf= *Factor de transcripción asociado a microftalmia*; PRL-3= *Fosfatasa de regeneración hepática 3*; MTA-1= *Proteína asociada a metástasis 1*; MAPK= *Proteína cinasa activada por mitógeno*; MPM= *Metaloproteinasas de matriz*; VEGF= *Factor de crecimiento del endotelio vascular*

Dada la multitud de publicaciones usando iRNA para suprimir el crecimiento, invasividad y metástasis de melanoma y otros tipos de cáncer obteniendo resultados alentadores, se han empezado a desarrollar una nueva gama de investigaciones proponiendo la aplicación del iRNA combinado con otros regímenes de tratamiento y se ha visto que éste es capaz de sensibilizar distintos tipos celulares a agentes convencionales como la radioterapia o la quimioterapia. El éxito de esta estrategia se basa en la selección precisa de un blanco terapéutico. En este caso, de un antígeno tumoral el cuál sea necesario para la proliferación y supervivencia de la célula. Nuestra selección nos condujo al gen del tumor de Wilm's (WT1).

### **2.3 WT1**

El gen de WT1, clonado por primera vez en 1990, es localizado en el cromosoma 11p13 (Call KM, *et. al.* 1990). El gen codifica para 10 exones y genera un mRNA de 3kb. Aunque demasiadas modificaciones transcripcionales pueden ocurrir, hay dos alternativas predominantes de "splicing". Esto incluye un deslizamiento o splicing en los exones 5 (17 amino ácidos), y de un tramo de nueve nucleótidos (tres aminoácidos, lisina, treonina, y serina (KTS)) en el final 3' del exón 9. Deslizamientos alternos de estos dos sitios dan origen a cuatro diferentes isoformas de la proteína designadas A, B, C, y D, o (-/-), (+/-), (-/+) y (+/+), representando la presencia o ausencia del exón 5 y los insertos KTS, respectivamente (Haber DA, *et. al.* 1991). Bajo condiciones fisiológicas normales, la expresión de KTS (+)/KTS (-) se mantiene en promedio aproximadamente en 2:1. (Haber DA, *et al.* 1991). La Figura 2 representa de manera esquemática al gen de la proteína de WT1.



**Figura 2.** Organización del gen de WT1, mostrando sus isoformas alternas.

En las primeras publicaciones, WT1 fue descrito como un gen supresor de tumores (Call, KM, et al. 1990), pero mientras se continuó investigando se encontró que también puede actuar como un oncogen (Menke, AL., et al. 1998).

WT1 es una importante molécula reguladora involucrada en el crecimiento celular y el desarrollo. Se expresa de manera específica dependiendo del tejido. En el desarrollo embrionario, la expresión de WT1 es encontrada primordialmente en el sistema urogenital (Rivera MN, 2005). En tejidos maduros, la expresión de WT1 es encontrada en sistema urogenital, el sistema nervioso central y tejidos involucrados en la hematopoyesis, incluyendo la médula ósea y los nódulos linfáticos (Menke AL, et al. 1998). Por otro lado, el gen del tumor de Wilms WT1 es expresado en altos niveles en células leucémicas, principalmente en Leucemias agudas y leucemias linfoides. En el síndrome mielodisplástico, los niveles de expresión del mRNA de WT1 incrementan junto la progresión de la enfermedad; por lo que, el mRNA de WT1 es considerado un marcador tumoral para células leucémicas. El mRNA de WT1 también es expresado en altos niveles en varios tipos de cánceres sólidos, incluyendo cáncer de pulmón, de mama, de colon y páncreas (Haruo Sugiyama, et al. 2005).

Teniendo el conocimiento de esta molécula, la evidencia a sugerido que una determinada proteína puede exhibir función como supresor de tumor y/ o la activación de oncogenes bajo diferentes condiciones celulares. Un ejemplo de esto es el oncogen Myc (Evan GI, *et. al*, 1992). Sabemos además que la proteína del Tumor de Wilms 1 (WT1) tiene un comportamiento dual similar dependiendo del tipo de célula en la que se expresa.

### **2.3.1 WT1 como blanco para terapia génica**

#### **- Uso de anti sentidos**

Se han obtenido estudios *in vitro* donde Zapata P., et al. 2002, reportaron que utilizando oligodeoxinucleótidos anti sentido contra WT1 encontraron una baja regulación a la expresión de la proteína de WT1, lo que permitió la inhibición del crecimiento de las células de cáncer de mama y la reducción de los niveles de expresión de la proteína ciclina D1; estos resultados indicaron que la proteína de WT1 contribuye a la progresión y promoción de la proliferación de células de cáncer de mama.

De igual forma, utilizando iRNA contra WT1 en la línea B16F10 *in vitro*, se observó que la disminución de WT1 por su interferencia conduce a la apoptosis de las células transformadas, con lo que se demostró que WT1 es esencial para la proliferación y viabilidad (Zamora, D., et al. 2007). Más adelante, con el uso de un iRNA como tratamiento en aerosol en un modelo murino *in vivo* con la línea celular B16F10 en cáncer de pulmón, se demostró que es posible inhibir la progresión de la metástasis una vez implantado en el ratón (Zamora, D. et al. 2009). Esto también demuestra que WT1 es una proteína blanco específica contra este tipo de cáncer.

#### **- WT1 y el uso de drogas**

Como adyuvante para el tratamiento de células de cáncer con agentes quimioterapéuticos, se propuso una sinergia con los agentes doxorubicina y cisplatino y construcciones de plásmidos con secuencias de iRNA, demostrando que existe una sensibilización en combinación de las drogas y las construcciones de iRNA contra



WT1, y con ello proponer la disminución de la quimioterapia combinándolos con esta tecnología como adyuvante (Zapata, P. et al. 2012).

### 2.3.2 WT1 como blanco de inmunoterapia para cáncer

Hay una creciente lista de nuevas evidencias de que la proteína WT1 es un antígeno tumoral prometedor para el desarrollo de una nueva clase de vacunas contra el cáncer universal. Recientemente, en un proyecto de priorización del Instituto Nacional del Cáncer (NCI por sus siglas en inglés), WT1 se clasificó en primer lugar en una lista de 75 antígenos del cáncer (Van Driessche, A., et al. 2012), muchas características de este gen lo hacen un blanco en inmunoterapia. Primeramente, este es altamente expresado en muchos tipos de enfermedades hematológicas, así como también en tumores malignos (Tabla 4). Se ha descrito que la proteína WT1 se expresa preferencialmente en células leucémicas y no en las células normales (Miwa, H., et al. 1992), (Menssen, H, et al., 1995). En un trabajo de Ohminami y col. han propuesto que la inmunoterapia con linfocitos T citotóxicos activados con CD pulsadas con un péptido derivado de la proteína WT1 podría ser eficaz para el tratamiento de las leucemias (Ohminami H., et al. 2000).

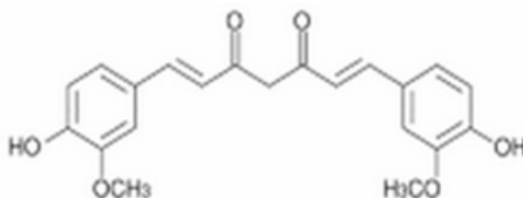
**Tabla 4.** Sobre expresión de WT1 en tumores sólidos y enfermedades hematológicas

<b>Tipo de Tumor</b>	<b>Método de detección para WT1 sobreexpresado</b>
Cáncer Biliar	Inmunohistoquímica
Carcinoma de Hueso	RT-PCR e Inmunohistoquímica
Tumor en Cerebro	Inmunohistoquímica
Cáncer de mama	RT-PCR, Southern blot e Inmunohistoquímica
Cáncer cervical	Inmunohistoquímica
Cáncer de Colón	Inmunohistoquímica
Cáncer de Pulmón	RT-PCR e Inmunohistoquímica
Cáncer de Próstata	Inmunohistoquímica
Leucemia linfocítica aguda	RT-PCR e Inmunohistoquímica
Leucemia mieloide aguda	RT-PCR e Inmunohistoquímica
Leucemia mieloide crónica	RT-PCR e Inmunohistoquímica
Mieloma múltiple	RT-PCR

Esta terapia y la selección de nuestro blanco de interés se acompaña de la curcumina para potencializar el efecto antitumoral de nuestro WT1-siRNA.

## 2.4 Curcumina

La curcumina se aisló por primera vez como un extracto crudo en 1815 por Vogel y Pelletier, y su estructura química y la síntesis fue confirmada por Lampe et al. en 1910 y 1913, respectivamente (Milobedeska J, et al. 1910), (Lampe V, et al. 1913). Químicamente, la curcumina es un bis- $\alpha$ ,  $\beta$ -dicetona- $\beta$  insaturado, llamado (E, E) -1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5 diona (Milobedeska J, et al. 1910) (Fig. 3). El primer estudio sobre el uso de la curcumina en enfermedades humanas fue publicado en 1937 (Albert, O. 1937). Su efecto antibacteriano y la capacidad de disminuir los niveles de azúcar en sangre en humanos se documentó en 1949 y 1972, respectivamente (Aggarwal BB, Sung B. 2009).



**Figura 3.** Estructura de la curcumina

La curcumina (diferuloilmetano), es un componente de color amarillo anaranjado constituido de polifenoles aislados a partir del rizoma de la cúrcuma (*Curcuma longa* . Además de la curcumina, la cúrcuma también contiene otros componentes denominados curcuminoides. La curcumina, demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina, y la ciclocurcumina identificada recientemente, son los principales curcuminoides aislados a partir de la cúrcuma.

Durante siglos, la curcumina se ha utilizado en una preparación medicinal o utilizada como un agente colorante para alimentos. En los últimos años, extensos estudios *in vitro* e *in vivo* sugiere que la curcumina tiene una actividad antiviral, antiartrítico, antioxidantes y propiedades anti-inflamatorias, así como anticancerígena. Los mecanismos subyacentes

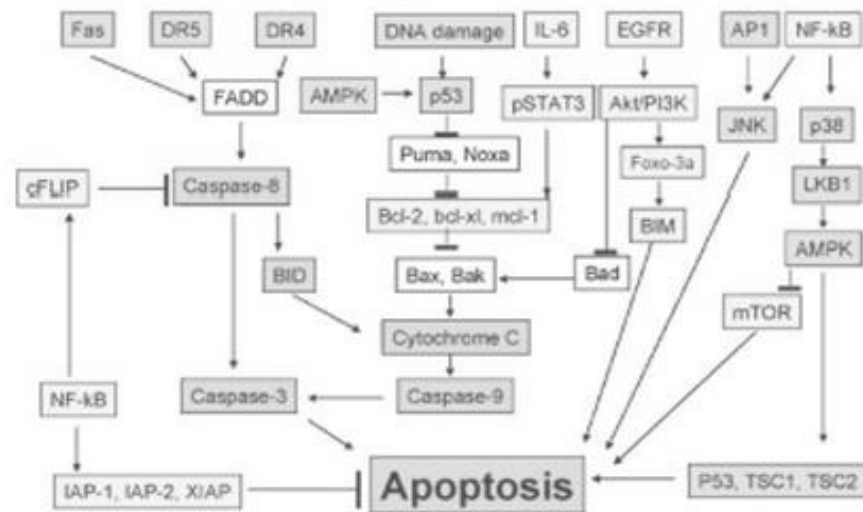
de estos efectos son diversos y parecen implicar la regulación de diversos blancos moleculares, incluyendo factores de transcripción (tales como el factor nuclear-kappa B), factores de crecimiento (tales como factor de crecimiento celular endotelial vascular), citocinas inflamatorias (tales como factor de necrosis tumoral, la interleucina 1 y la interleucina 6), proteínas quinasas (tales como blancos de la rapamicina, proteínas quinasas, y Akt) y otras enzimas (tales como la ciclooxigenasa 2 y 5 lipoxigenasa). Por lo tanto, debido a su eficacia y la regulación de múltiples blancos, así como su seguridad para uso humano, la curcumina ha recibido considerable interés como un agente terapéutico potencial para la prevención y / o tratamiento de enfermedades, artritis, alergias y otras enfermedades inflamatorias y enfermedades malignas (Kiuchi F, et al. 1993).

Varios estudios han demostrado que la curcumina es más activa que la demetoxicurcumina o bisdemetoxicurcumina (Ahsan H, et al, 1999), (Sandur S., et al. 2007). Las preparaciones comerciales disponibles de "curcumina" contienen aproximadamente 77% de curcumina, el 17% y el 3% demetoxicurcumina bisdemetoxicurcumina.

#### **2.4.1 Mecanismos de muerte de la curcumina**

La curcumina tiene un amplio rango de blancos moleculares, apoyando el concepto de que actúa sobre numerosas cascadas bioquímicas y moleculares. La curcumina se une físicamente a un máximo de 33 proteínas diferentes, incluyendo tioredoxina reductasa, la ciclooxigenasa-2 (COX-2), la proteína quinasa C, 5-lipoxigenasa (5-LOX) y tubulina. Varios blancos moleculares modulados por este agente incluyen factores de transcripción, factores de crecimiento y sus receptores, citoquinas, enzimas, y los genes que regulan la proliferación celular y la apoptosis (Aggarwal BB, et al. 2007). La curcumina se ha demostrado que inhibe la proliferación y la supervivencia de casi todos los tipos de células tumorales. La acumulación de pruebas sugiere que el modo de la muerte celular inducida por la curcumina es mediada tanto por la activación de las vías de muerte celular y por la inhibición de crecimiento de las vías de proliferación. Muchos estudios indican la función selectiva de la curcumina hacia las células cancerosas que a las células normales.

Podríamos identificar más de 40 biomoléculas que están implicados en la muerte celular inducida por la curcumina (fig. 4), (Ravindran J., et al. 2009).



**Figura 4.** Modulación de diferentes vías de muerte por la curcumina.

#### 2.4.2 Modulación de citoquinas por la curcumina

Durante la infección grave o después de una lesión grave, la síntesis excesiva y la producción de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$  y  $IL-6$ , juegan un papel importante en el desarrollo de la inflamación local y sistémica, causando trastorno fisiopatológico (Munford RS, Pugin J. 2001). Genes de citoquinas y la expresión de proteínas están estrechamente controlados en las células que producen, y uno de los pasos más importantes en esta regulación es la transcripción de genes. Por lo tanto, la inhibición de la producción de citoquinas pro-inflamatorias por regulación de factores de transcripción, como NF-kappa B, es una estrategia potencial para el control de las respuestas inflamatorias (Baeuerle PA, Henkel T. 1994), (Tak PP, Firestein GS. 2001). Varios estudios han demostrado que la curcumina fue capaz de modular la producción de diversas citoquinas inflamatorias, exhibiendo así la actividad anti-inflamatoria potente (Chen D, Nie M, Fan MW, 2008), (Abe Y, et al. 1999).

### **2.4.3 Modulación de enzimas por la curcumina**

Una variedad de enzimas que están estrechamente relacionados con la inflamación y el cáncer resultan ser moduladas por la curcumina. Estas enzimas incluyen a COX-2, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), 5-LOX, y fosfolipasas A2 (PLA2).

COX-2, la forma inducible de COX, se puede inducir selectivamente por estímulos mitógenos e inflamatorios, lo que resulta en una mayor síntesis de prostaglandinas en los tejidos inflamados y neoplásicos (Seibert K, Masferrer JL. 1994). Varias líneas de investigación demostraron que COX-2 se sobreexpresa en una amplia variedad de cánceres humanos, como de colon, hígado, páncreas, mama, pulmón, vejiga, piel, estómago, cánceres de cabeza y cuello (Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. 2003). La curcumina puede regular negativamente la expresión y la actividad de COX-2 tanto *in vitro* como *in vivo* (Chun KS, et al, 2003), (Kunnumakkara AB, et al. 2007). En piel de ratón tratados con TPA, la curcumina inhibe potentemente la expresión de COX-2 de proteínas, así como estimulada por TPA activación de NF- $\kappa$ B (Chun KS, et al, 2003). En ratones desnudos implantados con células de carcinoma hepatocelular, el tratamiento de cúrcuma reduce la sobreexpresión inducida por tumor de dos biomarcadores angiogénicos, COX-2 y VEGF, lo que indica que la curcumina podría inhibir la angiogénesis tumoral (Yoysungnoen P, et al. 2006). Más recientemente, activada por la proteína AMP quinasa (AMPK), un regulador maestro de la homeostasis de la energía celular, se encontró que actuar como un regulador de ERK1 / 2, p38, y COX-2 en células de cáncer (Lee YK, et al. 2009).

## **2.5 Curcumina y WT1**

Con la información presentada a la modulación de una amplia variedad de moléculas por parte de la curcumina, los últimos estudios demuestran el efecto que tiene sobre la proteína de WT1. Por mencionar algunos trabajos, se demostró *in vitro* que la curcumina tenía un efecto inhibitorio de WT1 en la línea celular K562 de leucemia humana, donde WT1 es altamente sobre expresada (Anuchapreeda, S., et al. 2006), también se observó con pacientes que presentaban leucemia, obteniendo que la curcumina reduce la expresión del gen de WT1 en más del 50% de todos los pacientes (Anuchapreeda, S., et al. 2006) sin

importar el origen mieloide o linfoide. Más adelante, con la línea celular PANC-1 de cáncer de páncreas, se estudió el efecto de la curcumina en la expresión de WT1, observando una disminución de manera dosis dependiente y con ello la inhibición de la proliferación celular (Wolfgang G. et al. 2009).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un serio problema de salud pública y cada año las cifras de personas con esta enfermedad van en aumento. Los tratamientos actuales son inespecíficos; además que no garantizan la supervivencia de personas con la enfermedad en estados avanzados y el conjunto de tratamientos con quimioterapia y radioterapia perjudican más la salud del paciente. Los avances en las disciplinas de la biología molecular, inmunología y bioinformática nos proporcionan herramientas para poder buscar terapias alternas para el tratamiento contra esta enfermedad; que sean específicas, con mejores resultados en menores dosis y que sean más accesibles. Una de estas herramientas es la terapia génica mediante el silenciamiento de proteínas blanco con RNA de interferencia (iRNA) para atacar el cáncer. El éxito de esta terapia consiste en que su gen blanco sea un marcador tumoral específico, que sea una proteína importante para la supervivencia y proliferación de las células malignas y que su expresión en los diferentes tipos de cáncer sea alta. Nuestra selección fue al gen del tumor de Wilm's (WT1) para efectuar tal función al ser considerado un marcador tumoral universal, donde se ha observado su sobreexpresión en diferentes tipos de cáncer y que esta proteína es necesaria para la supervivencia y proliferación de la célula. Complementando el tratamiento de terapia génica con iRNA contra WT1, seleccionamos a la curcumina como un potencializador en nuestro tratamiento; este es un extracto natural el cuál se ha utilizado por cientos de años como terapéutico y que en la actualidad en diversos estudios se ha demostrado su eficacia como antitumoral. Con todo lo anterior, queremos que con la combinación de nuestro tratamiento obtengamos resultados prometedores, sin daño a células sanas y con compuestos naturales que puedan ser más accesibles y específicos para futuros ensayos.

#### **4. HIPÓTESIS**

La curcumina potencializa el efecto antitumoral del iRNA contra WT1 en células B16F10 de melanoma murino.



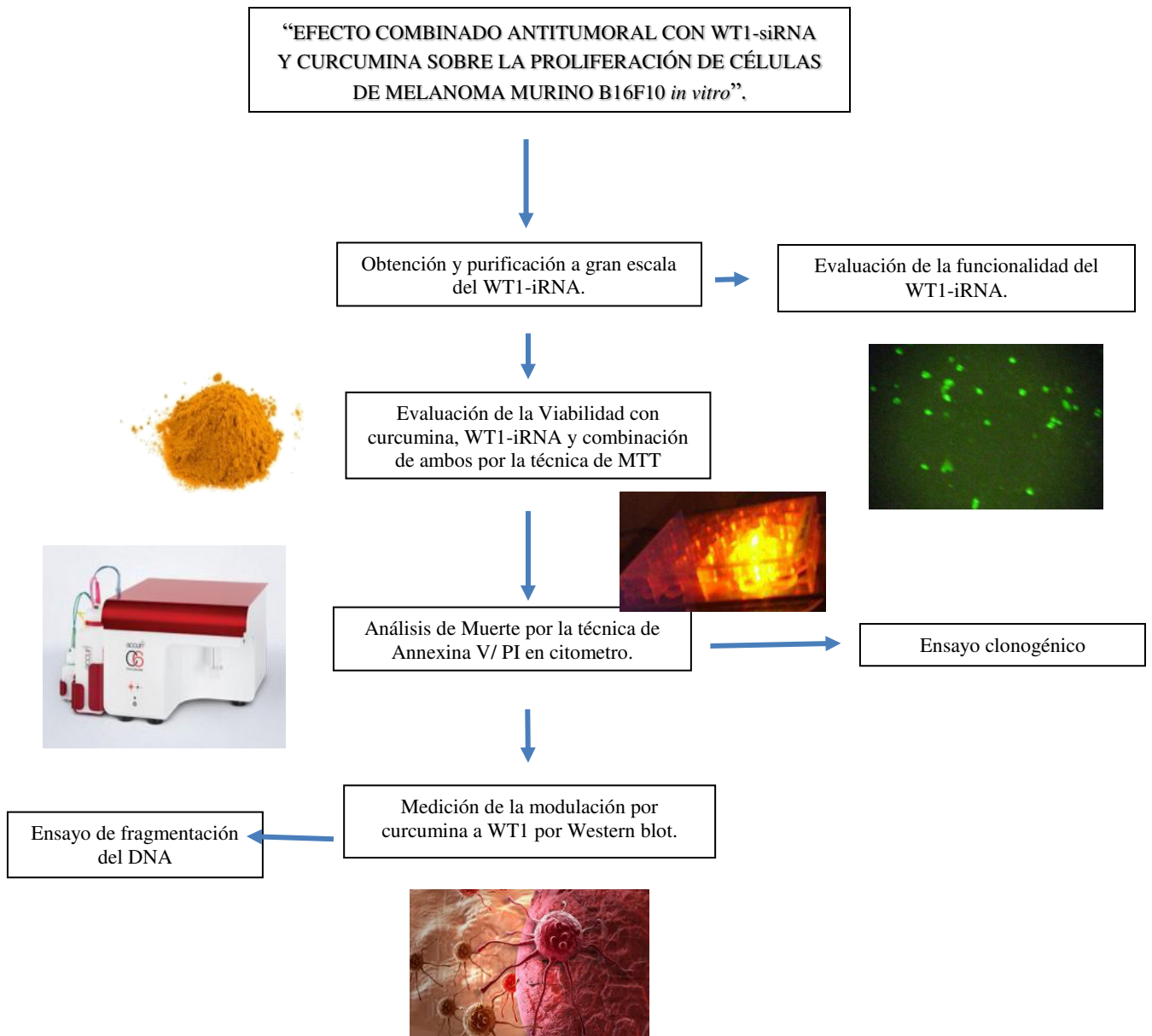
## **5. OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar el efecto antitumoral de un RNA de interferencia contra WT1 en combinación con curcumina en células de melanoma murino B16F10 *in vitro*.

### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la CC50 en la viabilidad de la línea celular B16F10 tratadas con el WT1-iRNA.
2. Determinar la CC50 en la viabilidad de la línea celular B16F10 tratadas con curcumina.
3. Determinar la CC50 en la viabilidad de la línea celular B16F10 tratadas con la combinación de curcumina y el WT1-iRNA.
4. Observar si existe disminución en la expresión de la proteína de WT1 después de los tratamientos.
5. Evaluar la capacidad de formación de colonias después de los tratamientos.
6. Analizar la apoptosis inducida por curcumina, iRNA y la combinación de ambos tratamientos.

# ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Obtención del plásmido con la secuencia del WT1-iRNA y su purificación a gran escala:

Se utilizaron cepas vírgenes de la bacteria *Escherichia coli* DH5- alfa calcio competentes para su transformación. Se activaron las cepas de *E. coli* DH5-alfa, sembrando 50  $\mu$ L de la cepa en 5ml de caldo Luria durante 4 h a 37° C. Se centrifugó 10 minutos a 5000 rpm en una centrifuga “SPECTRAFUGE” dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 400  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M en frío para incubar por 20 min en hielo. Una vez pasado el tiempo se centrifuga a 5000 rpm, decantando el sobrenadante y se añade 1  $\mu$ L del plásmido con la secuencia para el WT1-iRNA añadiendo 20  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 0.1M; se incubó en hielo por 1 h 40 min. Después se realizó un shock térmico a 40° C por un minuto e inmediatamente se incubó en hielo por 2 min. Se agregaron 200  $\mu$ L de Caldo Luria, incubando 1 h en “shaker” a 200 rpm y 37°C. Se tomó 50  $\mu$ L del cultivo y se incubó en 5  $\mu$ L de Caldo luria por 24 horas a 37°C con 50  $\mu$ g / mL de Ampicilina.

Después el crecimiento se pasó a otro matraz con 500 mL de Caldo Luria, se adicionó 50  $\mu$ L / mL de Ampicilina y se incubó por 24 horas a 37°C. Posteriormente, se obtuvieron los “pellets” celulares centrifugando en tubos de 50 mL concentrando los 500 mL a 3,000 rpm por 10 minutos.

Para su purificación se utilizó un kit de purificación a gran escala (Pure Link Hi Pure Plasmid Midi Prep Kit de Invitrogen)” para la extracción del plásmido, siguiendo el protocolo sugerido. Después de la realización completa del protocolo se procedió a la cuantificación en nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y guardado a -20°C hasta su uso.

### 6.2 Funcionalidad del plásmido:

Para ver la funcionalidad del plásmido se procedió a la transfección del plásmido en la línea celular B16F10 para la medición de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) observada en un microscopio con focal de fluorescencia ( Zeiss).

### **6.3 Cultivo celular:**

Se utilizará la línea celular B16F10 de melanoma murino en medio DMEM-F12 con Suero Fetal Bovino al 10%, más Antibiótico a 37° C, con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>, en una humedad relativa al 70%.

*Obtención de células polimorfonucleares de sangre periférica humana (PBMC):*

Como ensayo control de tratamiento de células sanas, empleamos las PBMC. Se extraen 12 mL de sangre periférica por vía intravenosa, se homogeniza y se disuelve a 1:1 en buffer PBS. Después por la técnica de trizol, se utiliza la misma cantidad en un tubo de 50 mL, vaciando lentamente para tener dos capas, una con trizol arriba y otra abajo con la sangre en PBS. Se centrifuga a 5000 rpm por 30 minutos, y se separa la parte media donde se encuentran ahí las células PBMC.

### **6.4 Tratamiento de células con el WT1-iRNA y curcumina *in vitro*.**

Para la determinación de la DL<sub>50</sub> del WT1-iRNA, curcumina y combinación de ambos en la línea celular B16F10 se cultivaron en una caja de 96 pozos con 5000 células. Se le añadió una concentración de 2 µM, 5 µM, 7.5 µM, 10 µM, 12.5 µM, 15 µM y 20 µM, por triplicado para el ensayo con curcumina y dosis de 0.2 µg, 0.5 µg 1 µg y 2 µg para el plásmido con el iRNA. Su viabilidad se evaluó por el ensayo de MTT. Como controles se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a las diferentes concentraciones, y como control del vector se utilizó un plásmido con la secuencia de GFP.

### **6.5 Ensayo de viabilidad celular mediante MTT**

Para la determinación de la viabilidad celular se empleó la técnica de Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT), que consta en la preparación en solución de 5mg/mL de MTT en buffer PBS estéril, posteriormente se agregaron 20µL de esta solución a cada pozo y la placa se incubó de 45 a 90 minutos a 37°C; pasado el tiempo de incubación se procedió a decantar el sobrenadante para después agregar 200 µL de

DMSO para solubilizar las sales precipitadas; finalmente la placa se llevó al lector de ELISA empleando la longitud de onda 570nm.

#### **6.6 Evaluación de la muerte celular por medio de la técnica de Anexina y Yoduro de propidio.**

Se cultivaron 50,000 células por pozo y se aplicó el tratamiento de curcumina, WT1-iRNA, Curcumina y WT1-iRNA, una vez pasadas las 24 horas se procedió a colectar las células y se les agregó 100  $\mu$ L de buffer PBS, se centrifugaron por 10 minutos a 1600 rpm y se añadió el buffer con Anexina/PI. Se dejó incubar en frio por 20 minutos y se pasó a la lectura en citometría con el software Accuri.

#### **6.7 Ensayo de ciclo celular**

Para el ensayo de ciclo celular se colectaron las células y se lavaron con Buffer PBS a 1600 rpm por 10 minutos. El paquete celular se fija con 1mL de etanol al 70% incubando por 30 minutos en hielo. Se lavaron dos veces con PBS y se agregó ribonucleasa A, a una concentración de 10 mg/ mL para 50  $\mu$ L por pellet. Se agregaron 4  $\mu$ L de yoduro de propidio por millón de células y se homogenizó. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se analizó en citometría con PI/RNAsa A con el software accury y flow Jo.

#### **6.8 Ensayo clonogénico**

Para el ensayo clonogénico se utilizó la línea B16F10 en placas de 6 pozos a una DL30, DL50 y DL75 del plásmido con la secuencia de WT1-iRNA, curcumina y la combinación de ambos, todos ensayos independientes por triplicado. Se sembraron 1000 células por pozo y después de 24 horas de tratamiento se retiró poniendo medio DMEM nuevo. Se dejaron por diez días posterior al tratamiento y se procedió a lavar con PBS, se removió el PBS y se agregó 2-3 mL de una solución 6.0% de glutaraldehído y 0.5% de cristal violeta. Se dejó incubar por 30 minutos y se removió la solución lavando con agua bidestilada. El número de colonias se contaron para su análisis.

## **6.9 Extracción de proteínas y Western blot**

Las pastillas celulares que se obtuvieron de cada ensayo, se lavaron con PBS para después tener un paquete celular, el cual se re suspenderá en 100  $\mu$ L de buffer de lisis (Tritón 1%, NaCl 150mM, Tris 25mM, pH 7.6) y se incubaron en hielo por 30 minutos. Posteriormente las células se centrifugaron a 10000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y fueron almacenados a -80 °C para su uso posterior.

### **6.9.1 Cuantificación de proteínas**

La concentración de proteínas se determinó usando el Kit Bio-Rad DC Protein Assay siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la cuantificación de los extractos proteínicos se prepararon diluciones de 1:5 utilizando como diluyente el buffer de lisis; después se prepararon las diluciones 1:20 con los reactivos S y A; posteriormente se agregaron 177 $\mu$ L de reactivo B para después incubar por 10 min a temperatura ambiente. Después se pasó a leer la placa en el lector de ELISA a una longitud de 595 nm.

### **6.9.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS**

Se tomaron 50  $\mu$ g de proteína total y se desnaturalizaron en buffer de carga que contiene SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol, se colocaron a 95°C por 5 minutos y después se cargaron en geles de acrilamida-SDS page al 12%, se corrió a 40 volts por 20 min y posteriormente se incrementó el voltaje a 100 volts por 90 min, después se procedió transferir las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa usando un casete de transferencia de proteínas en condiciones de 25 volts por 2.5 h, finalizando con la transferencia de proteínas se continuó con el bloqueo de la membrana con una solución de TBS con leche al 5 % y Tween al 0.5 % por una hora.

### **6.9.3 Inmunodetección y revelado**

Para la inmuno detección se emplearon anticuerpos primarios: anti-WT1 policlonal (Santa Cruz Biotechnology) y  $\beta$ -actina monoclonal (Sigma-Aldrich); para las proteínas del ciclo celular se utilizaron los anticuerpos: ciclina D1, p21, p53 y caspasa 3; y como segundos anticuerpos se emplearon anti-ratón y anti-conejo proveídos por BIORAD; para su detección se empleó el Kit de quimioluminiscencia. Una vez expuesto al reactivo para la

quimioluminiscencia, se procedió al revelado con películas especiales en condiciones sin luz.

#### **6.10 Ensayo de fragmentación de DNA para ver muerte regulada por apoptosis**

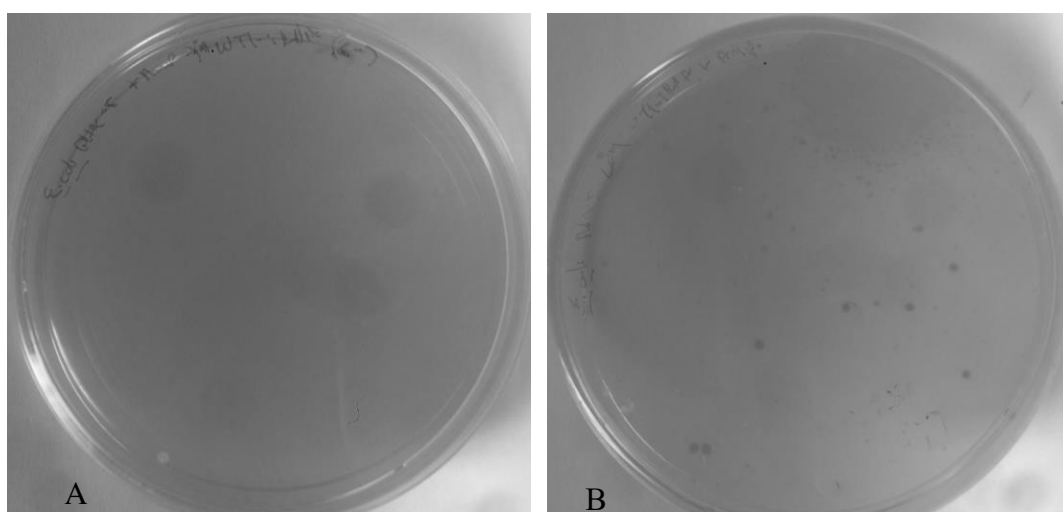
Se utilizaron 500,000 células y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se removi6 el sobrenadante. Se agregaron 20 µL de buffer de lisis TES (), se homogenizo y después se agregaron 10 µL de RNAsa A, incubando 120 minutos a 37°C.

Una vez pasado el tiempo, se agregó 10 µL de proteinasa K y se incubo a 50°C durante toda la noche. Una vez terminado, se corri6 en gel de Agarosa al 1%, a 35 V por 4 horas.

## 7 RESULTADOS

### 6.1 Evaluación del plásmido con el WT1-iRNA.

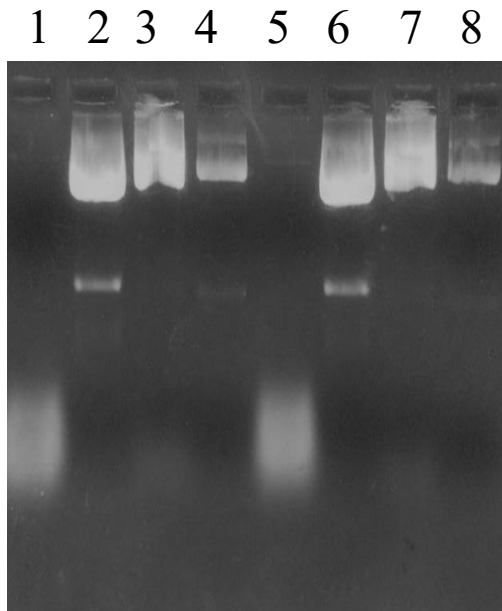
El plásmido con la secuencia para el WT1-iRNA empleando fue utilizado (1 $\mu$ g/ 50  $\mu$ L de caldo) para transformar la cepa de *E. coli* DH5- $\alpha$  vírgenes; utilizando el protocolo sugerido y agregando ampicilina como antibiótico de selección para las bacterias transformadas. Las clonas positivas fueron seleccionadas por crecimiento en placas de agar Luria, como se muestra en la figura 5:



**Figura 5. Transformación de la cepa de *E. coli* DH5- $\alpha$  con el plásmido con la secuencia para el WT1-iRNA. A) Control (-); no existe crecimiento con ampicilina., B) bacterias en crecimiento con ampicilina y el plásmido.**

Se verificó que las bacterias *E. coli* DH5- $\alpha$  vírgenes no fueran transformadas con algún plásmido y se analizaron mediante electroforesis en agarosa para comprobar la transformación exitosa utilizando los controles negativos (bacterias vírgenes), control de plásmido (plásmido comercial) y un control positivo (plásmido previamente demostrada su funcionalidad por el laboratorio), como se muestra en la figura 6.



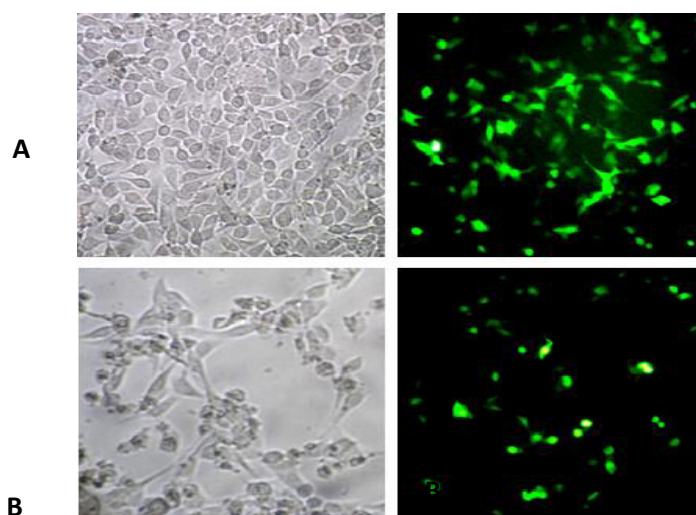


**Figura 6. Purificación del plásmido WT1-iRNA.** Carriles: 1 y 5. Controles (-), 2 y 6. Control plásmido, 3 y 7. pWT1-iRNA, 4 y 8. Controles (+).

Una vez que la transformación fue exitosa obteniendo un número importante de colonias para su producción a gran escala, procedimos con la purificación mediante kit (Pure Link Hi Pure Plasmid Midi Prep Kit de Invitrogen), el plásmido pEGFP-N2 fue utilizado como control para estimar la eficiencia de transfección (expresión de la proteína verde fluorescente -GFP-) y a la vez como control negativo, es decir para mostrar el efecto real del plásmido WT1-iRNA sobre la viabilidad de la línea celular B16F10.

## 6.2 Efecto de la transfección del plásmido WT1-iRNA en la viabilidad de la línea celular B16F10.

El efecto del plásmido en la viabilidad celular y en el silenciamiento de la expresión endógena del gen de WT1 en la línea celular B16F10 se demostró con la transfección del plásmido. El control negativo no mostró efectos aparentes en la viabilidad celular ni en morfología, en tanto las células transfectadas con WT1-iRNA mostraron alteraciones morfológicas y muerte celular (figura 7).

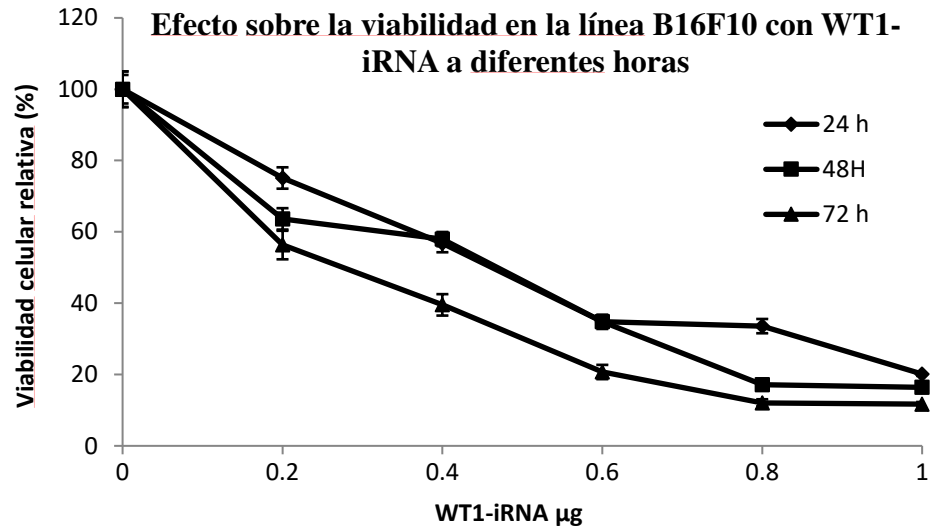


**Figura 7. Efecto sobre la viabilidad producido sobre las células de melanoma murino.** A) Plásmido control pEGFP-N2 (0.6  $\mu$ g). B) Plásmido con WT1-iRNA (0.6  $\mu$ g) a 48 horas de incubación con expresión de la proteína reportera GFP. Las fotografías fueron obtenidas de un microscopio de fluorescencia confocal, bajo luz visible (izquierda) y ultravioleta (derecha).

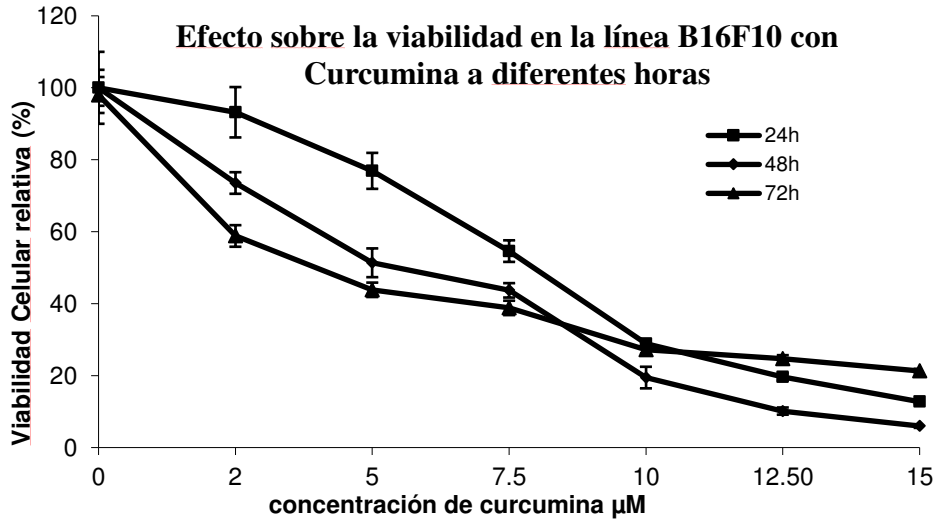
## 6.3 Viabilidad de la línea celular B16F10 tratadas con WT1-siRNA, curcumina y la combinación de ambas.

Una vez confirmado el efecto anti proliferativo del plásmido WT1-siRNA sobre las células B16F10 se probaron concentraciones crecientes del plásmido, de curcumina y la combinación de ambos siguiendo el protocolo descrito a detalle en la sección Material y métodos. Las curvas de viabilidad fueron obtenidas a las 24, 48 y 72 horas para el WT1-iRNA y la curcumina. Para la combinación de los tratamientos solamente fue evaluada a las 24 horas. Los análisis de viabilidad fueron evaluados mediante el ensayo de MTT (ver Material y métodos). De las gráficas resultantes se calculó la  $CC_{50}$  para el plásmido WT1-

iRNA y curcumina, obteniendo una  $CC_{50}$  de  $0.6\mu\text{g}$  y  $7.5\mu\text{M}$  respectivamente a las 24 horas (figura 8 y 9), además el efecto que se obtiene es dependiente de dosis y con el tiempo se muestra reducción de viabilidad (48 y 72 horas) independiente de cada tratamiento.

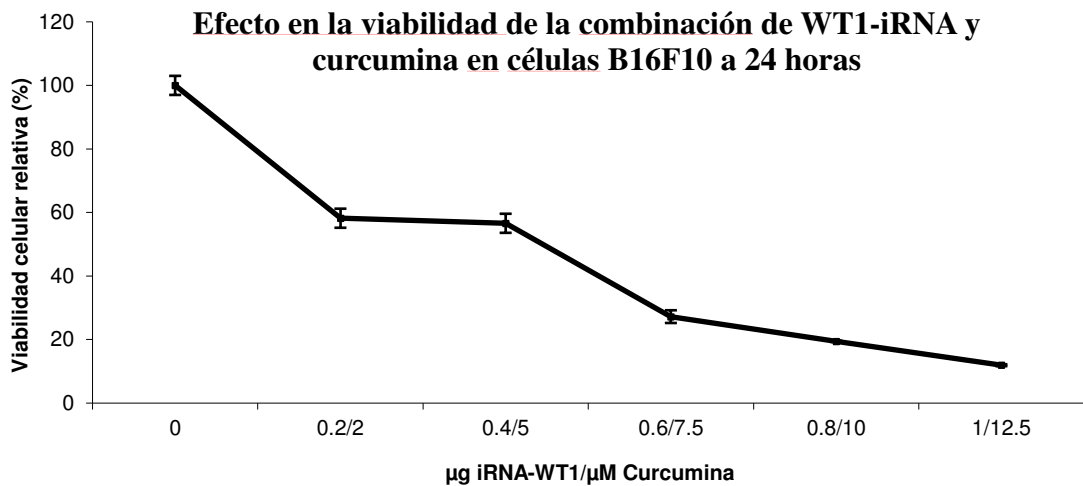


**Figura 8.** Efecto sobre la viabilidad de la línea B16F10 con plásmido WT1-siRNA. Estimando una  $CC_{50}$  a 24 horas de WT1-iRNA a  $0.5\mu\text{g}$ .



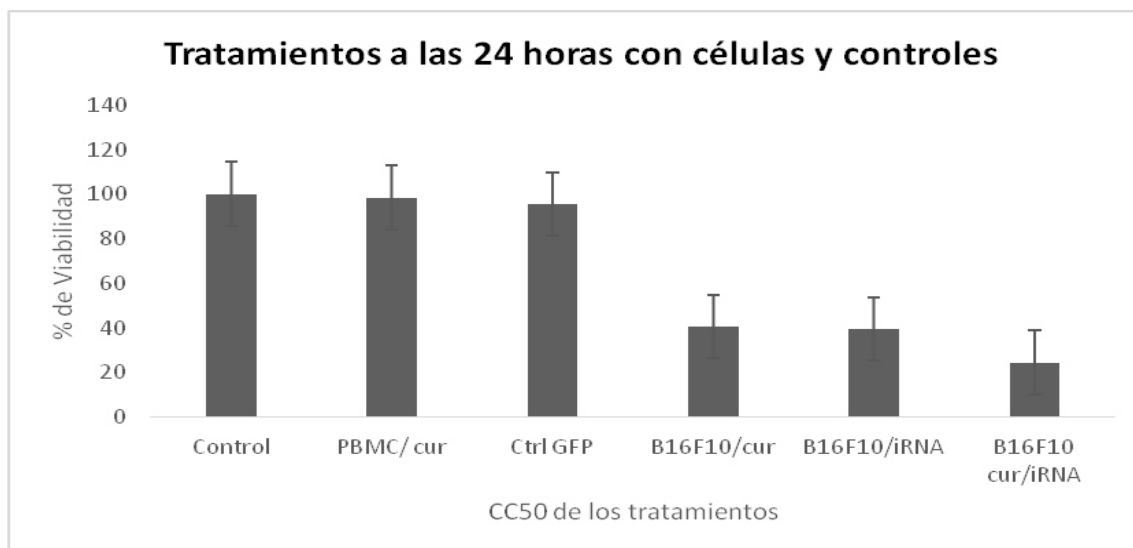
**Figura 9.** Efecto sobre la viabilidad de la línea B16F10 con curcumina. Estimando una  $CC_{50}$  a 24 horas de  $7.5\mu\text{M}$

Después de haber evaluado la viabilidad relativa con los tratamientos de forma independiente, se procedió a probar la combinación de ambos tratamientos sobre su viabilidad, evaluando una curva de dosis respuesta a 24 horas, donde se pudo observar un efecto aditivo con la combinación de los tratamientos (fig. 10), esto quiere decir que comparado a la viabilidad control que es del cien por ciento, los tratamientos que se combinaron con la CC50 correspondiente de manera individual para la curcumina y el WT1-iRNA muestran una reducción del casi 75 por ciento y a manera que aumenta la concentración del tratamiento, disminuye la viabilidad.



**Figura 10. Evaluación de la viabilidad celular combinando WT1-siRNA y Curcumina.** Se puede observar que la inhibición en la viabilidad disminuye de manera dependiente de dosis.

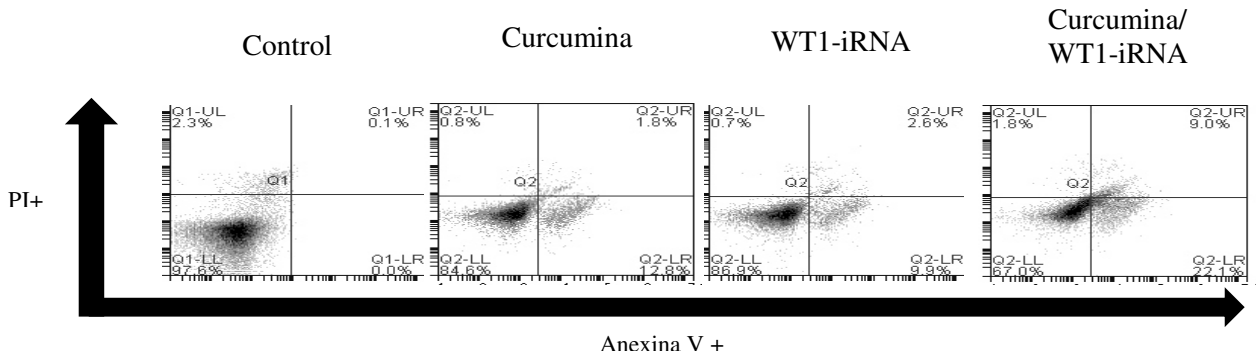
Obtenidos los resultados con los tratamientos sobre las células malignas, se procedió a hacer la evaluación en la aplicación de curcumina en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como un control sano y de plásmido con GFP en la línea celular B16F10 como control negativo a la CC50 de cada tratamiento (Fig. 11). Se observa que no existe diferencia significativa de viabilidad comparada al control sin tratamiento; en cambio, comparados con los tratamientos individuales y la combinación de ambos, hay una diferencia significativa como ya se mencionó. Con esto, se comprueba que los tratamientos son específicos para las células transformadas y no afecta las células sanas, así como el GFP no tiene efecto inhibitorio en las células B16F10.



**Figura 11. Efecto sobre la viabilidad de células normales comparadas con células B16F10.** Se puede observar que los tratamientos son específicos para las células malignas.

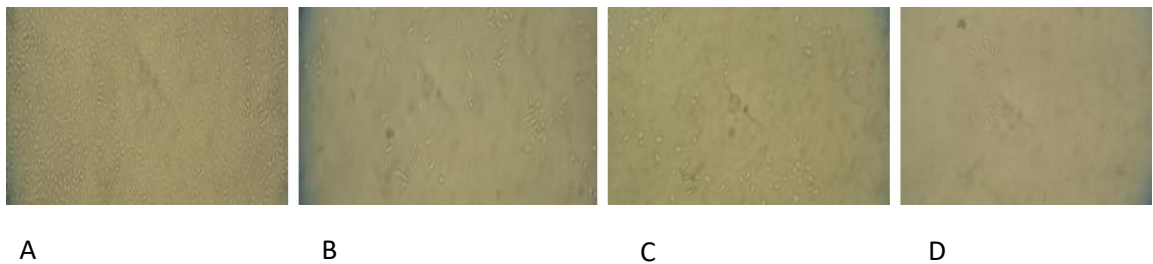
#### 6.4 Evaluación de la muerte celular por citometría de flujo

Una vez obtenida la CC50 se planteó observar la manera en que es conducida la muerte celular. Para ello, procedimos con la técnica de Anexina V/ PI que nos permite poder evaluar si existe una muerte regulada por apoptosis temprana mediante la translocación de la fosfatidilserina en la membrana celular a su parte externa. Por medio de los histogramas, podemos observar que el control tiene una viabilidad de más del 95 por ciento, comparado con los tratamientos ajustando la CC50, empieza a ver los marcajes positivos que nos demuestran la apoptosis temprana y la viabilidad disminuye a 86 por ciento con el WT1-iRNA, 84 por ciento con curcumina y un 67 por ciento con la combinación de ambos (fig. 12).



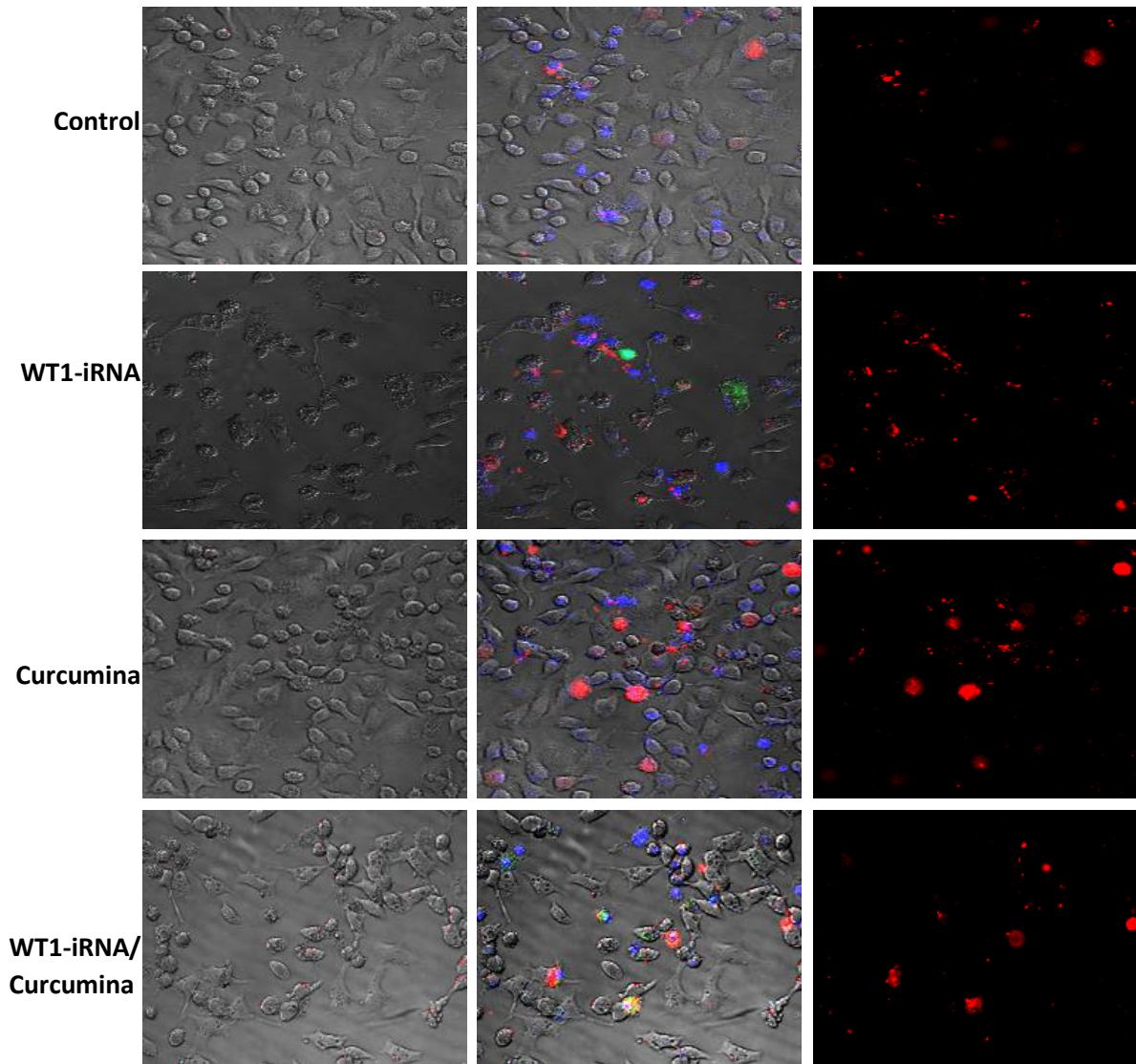
**Figura 12. Ensayo de Anexina V/PI por citometría de flujo.** Podemos ver que existe una muerte regulada por apoptosis temprana, donde las células en control se desplazan hacia el cuadril superior derecho, donde es positivo para Anexina V.

De forma física, podemos observar que la morfología celular con la CC50 de cada tratamiento se muestra afectada; las siguientes imágenes nos muestran como la viabilidad se ve reducida con los diferentes tratamientos una vez pasadas 24 horas de aplicación (fig. 13):



**Figura 13. Morfología y viabilidad de las células B16F10 con los diferentes tratamientos.** A) Control negativo, B) CC Wt1-iRNA, C) CC50 Curcumina, D) combinación WT1-iRNA/curcumina.

La morfología celular se pudo observar mediante microscopia de fluorescencia, esto para obtener mejores imágenes y determinar el efecto de los tratamientos sobre la línea celular utilizando el fluoroforo para núcleo DAPI, yoduro de propidio para observar la integridad de la membrana y el daño al núcleo; y la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) para el WT1-iRNA (fig. 14). Los diferentes tratamientos muestran diferencias en cuanto a morfología, denotando muerte por la tinción dentro de la célula comparada con el control.

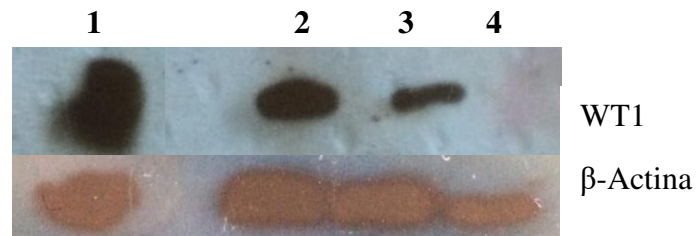


**Figura 14. Microscopia de fluorescencia para las células con los diferentes tratamientos a una CC50.** Se puede observar que existen cambios de morfología y pérdida de la morfología celular, por un evento posible de apoptosis con los tratamientos.

### **6.5 Análisis de la expresión de la proteína de WT1**

Una vez que observamos y evaluamos el efecto de nuestro plásmido con el WT1-iRNA, la curcumina y la combinación de ambos sobre la proliferación y viabilidad de la línea celular B16F10, el siguiente objetivo fue analizar la expresión de la proteína de WT1 en las células transfectadas, observándose una disminución en la expresión de la proteína WT1 con el plásmido WT1-iRNA, curcumina y la combinación de ambos comparando con las células control. Estos resultados nos indican que la disminución en la proliferación

celular e inducción de muerte observada anteriormente bajo el microscopio confocal, se correlaciona con la efectividad del iRNA para silenciar al gen WT1, así mismo del efecto propio de la curcumina y la combinación de los tratamientos (Fig. 15).



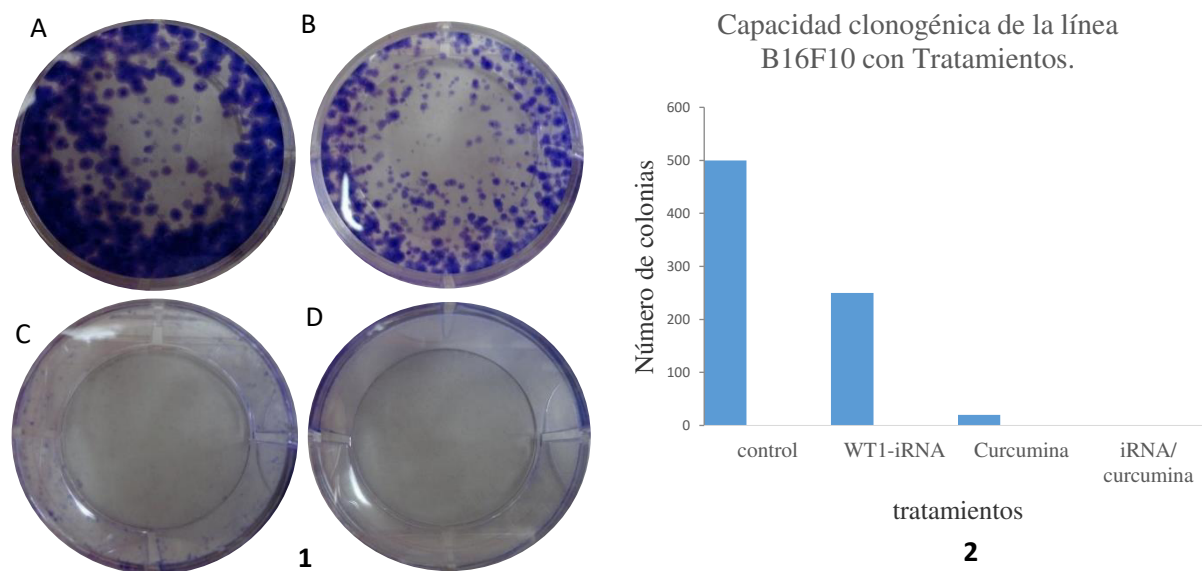
**Figura 15. Western Blot para observar la expresión de WT1.** 1. Control, 2. Curcumina., 3. WT1-siRNA., 4. Combinación Curcumina/ WT1-siRNA. Se puede observar que existe una disminución en la expresión de la proteína en comparación con el control. La combinación de ambos tratamientos sugiere una disminución importante. La parte inferior es el control de carga para la proteína β-Actina.

En cuanto a nuestro western Blot, podemos destacar que la disminución de la expresión de la proteína de WT1 con la  $CC_{50}$  de cada tratamiento es significativa en comparación al control. Igualmente, en el Western Blot con la combinación de ambos tratamientos es posible observar que la expresión no se puede cuantificar como los tratamientos individuales; sugiriendo que también actúan de forma aditiva en el bloqueo de la expresión para esta proteína.



## 6.6 Capacidad de la línea celular B16F10 para la formación de colonias

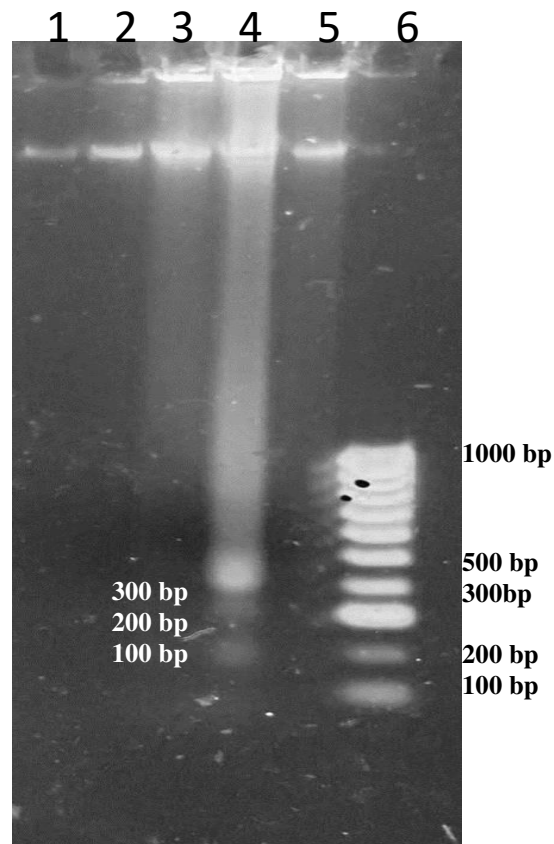
Después de la evaluación de nuestros tratamientos para la proliferación y viabilidad celular, correspondió evaluar la capacidad de la línea celular para la generación de clonas después de ser tratadas; donde encontramos que con el WT1-iRNA se produjeron aproximadamente 50 por ciento menos de colonias con respecto al control. Sin embargo, con el tratamiento de la CC50 de la curcumina y la combinación de WT1-iRNA con curcumina, el número de clonas no tuvo significancia, por lo cual no hubo formación de colonias y no se pudieron contar (fig.16). Con estos resultados podemos decir que el efecto de la curcumina sobre la proliferación de la línea celular, así como de la combinación de los tratamientos conducen a la muerte de las células sin que se generen clonas y aumenten la viabilidad.



**Figura 16. Efecto de los tratamientos en la capacidad clonogénica de la línea celular B16F10. 1. A) control, B) WT1-iRNA, C) curcumina, D) combinación WT1-iRNA/ curcumina. 2. Representación gráfica de la formación de colonias.**

## 6.7 Ensayo de fragmentación del DNA

Para analizar la muerte regulada por apoptosis, otro ensayo que realizamos fue el de fragmentación del DNA. En una electroforesis de agarosa, colocamos el control negativo de la línea, y los tratamientos fueron la CC30, CC50 y CC75, donde se pudo observar en las dos primeras, pequeños fragmentos de DNA que corresponden entre 300, 200 y 100 bp (Fig.17).



**Figura 1/ . Ensayo de fragmentación del DNA.** Carriles: 1 y 2 controles (-), 3. CC30, 4. CC50, 5. CC75, 6. Marcador de PM de 1000 pb (hyperloader IV®). Se pueden observar los fragmentos del DNA consecuencia de una muerte regulada por apoptosis.

## 7. DISCUSIÓN

El cáncer es un serio problema de salud pública, tanto en nuestro país, como a nivel mundial. Las estadísticas demuestran que las personas con cáncer han aumentado; específicamente tratando al melanoma vemos una tendencia alarmante de incidencias en los últimos años. Los reportes demuestran que las personas con melanoma aumentaron un 500% de 1991 al año 2000, y que para el 2011 la tendencia se mantuvo en aumento; así mismo el melanoma es el cáncer de piel más agresivo y resistente a quimioterapias y radioterapia (Rebecca L., *et al.* 2015).

Por otro lado, podemos decir que la mayoría, si no es que todas las neoplasias tienen desregulaciones en el ciclo celular, donde las mutaciones y/o aberraciones genéticas conducen a la pérdida del control y desregulación del ciclo celular provocando con ello que las células se transformen para provocar una proliferación desmedida, inmortalidad y metástasis (Carnero, A. 2002).

Debido a que los quimioterapéuticos convencionales causan numerosos efectos colaterales, los cuales se incluyen: nefrotoxicidad, toxicidad gastrointestinal, neuropatía central y periférica, daños en médula ósea y ototoxicidad, alopecia, anemia, náuseas, inmunosupresión, fatiga general y cardiomiopatías, con el riesgo de sufrir insuficiencia cardiaca congestiva (Goodman A, *et al.* 2003), se requieren modalidades de tratamiento inocuas en contra del cáncer, tecnología génica como compuestos de origen natural, los cuales ocuparán un lugar preponderante en la supresión del crecimiento e invasividad tumoral, mediante el reconocimiento de blancos específicos asociados al proceso neoplásico.

Las diferentes investigaciones y numerosos ensayos en fases preclínica y clínica acerca de opciones de tratamientos para pacientes con melanoma, no nos proporcionan a la fecha un tratamiento efectivo contra formas diseminadas de esta neoplasia, lo cual obliga a diseñar y aplicar el conocimiento adquirido de la inmunología y genética, a nuevas y eficaces estrategias de tratamiento, en la identificación de genes que se relacionan con las funciones biológicas de la enfermedad y usarlos como blanco para el tratamiento por

técnicas innovadoras (Parmiani, G., et al. 2001), de la cual, seleccionamos a la terapia génica.

La terapia génica engloba un conjunto de tecnologías prometedoras para el tratamiento de muchas enfermedades, incluyendo el cáncer, siendo el RNA de interferencia (iRNA) parte de éstas herramientas moleculares, el cual permite el bloqueo específico de la expresión de genes involucrados en tumorigénesis (Chada S., et al. 2008).

Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han utilizado iRNA para silenciar genes asociados a procesos tales como proliferación (Sumimoto H., et al. 2004), invasividad (Chen X., et al. 2006: and Hong J, et al. 2006) y metástasis de melanoma (Qian F, et al. 2007), con resultados alentadores.

En nuestro trabajo se propone al gen del tumor de Wilm's (WT1) como blanco de terapia génica con iRNA; debido a que WT1 es un factor de transcripción involucrado en diferenciación, proliferación celular y apoptosis, que inicialmente fue identificado como supresor de tumor, pero desde hace años se sabe que su sobreexpresión está implicada en numerosas neoplasias, desde malignancias hematológicas (Rosenfeld C., *et al.* 2003) hasta tumores sólidos de mama, ovario, estómago, útero, colon, pulmón, etc. (Oji Y., et al. 1999), dándole un rol oncogénico (Nakatsuka S., et al. 2006).

Utilizamos la línea celular de melanoma murino B16F10, previamente reportada por su alta expresión de WT1 (Zapata P. et al. 2006). Nuestro plásmido con la secuencia para el iRNA contra WT1 (WT1-siRNA) se probó *in vitro* a diferentes cantidades obteniendo una curva respuesta para poder medir la viabilidad celular con cada dosis administrada, obteniendo una CC50 (concentración citotóxica media) en 0.5 µg para 5000 células a las 24 horas. También se demuestra que el efecto citotóxico es dependiente de dosis y la viabilidad se ve disminuida transcurridas las 24, 48 y 72 horas. Previamente se demostró en nuestro laboratorio que el mecanismo de muerte de las células B16F10 por WT1-siRNA involucra apoptosis (activación de caspasa-3 y PARP, formación de cuerpos apoptóticos, condensación de cromatina y fragmentación de DNA), (Zamora, D. et al. 2007).

Por el otro lado, la curcumina ha sido estudiada por su amplio rango de acción en tumorigénesis (Rao CV, et al. 1993), angiogénesis (Gururaj AE, et al. 2002) y vías de señalamiento molecular (Lu YP, et al. 1994). Nosotros demostramos con la curcumina un efecto citotóxico dependiente de dosis, con una CC50 de 7.5  $\mu$ M a las 24 horas e igualmente con disminución de la viabilidad a las 24, 48 y 72 horas. Nuestros resultados se relacionan con los obtenidos por Shahar Lev-Ari, et al. 2007; donde en células de adenocarcinoma pancreático obtuvieron una curva de dosis respuesta, teniendo una CC50 con curcumina a 20  $\mu$ M. Tang, X.-q., et al. 2005, obtuvieron una CC50 de 10  $\mu$ M sobre la línea SGC7901 de carcinoma gástrico humano y Odot, J. et al. 2004, demostraron un efecto citotóxico medio a 27  $\mu$ M en una línea B16-R murino; observamos que en la línea B16F10 se requiere de una menor concentración de tratamiento para su CC50.

Al evaluar la combinación de nuestro WT1- iRNA con la curcumina, se observa una disminución en la viabilidad celular en un 75% a la CC50 independiente de cada tratamiento, efecto con definición farmacológica de adición (Goodman A, et al. 2003). Esto nos demuestra la sinergia en la utilización de ambos tratamientos para la citotoxicidad de las células transformadas. Además, tal como lo demostraron Khar A, et al. 2001, que en un cultivo sano de hepatocitos la curcumina no tuvo un efecto citotóxico como en líneas de tumor, nosotros no tuvimos efecto alguno en nuestras células normales mononucleares de sangre periférica (PBMC), denotando que la curcumina tiene efecto citotóxico en las células transformadas específicamente; los resultados de (Tong Q., et al. 2006) en células epiteliales, (Ramachandran C., et al. 1996) en células de riñón y (Syng-Ai C., et al 2004) en linfocitos y fibroblastos, no tuvieron efecto citotóxico para las dosis que se requerían en el tratamiento terapéutico contra las líneas celulares de cáncer. igualmente, la carga del plásmido únicamente con la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP), no tuvo efecto citotóxico como control de nuestro plásmido WT1-siRNA. Con lo anterior, el efecto citotóxico de cada tratamiento se amerita a nuestro plásmido con la secuencia del WT1-siRNA.

Por sus numerosas propiedades biológicas, el uso de curcumina en terapia anticancerígena se ha utilizado en numerosos estudios para atacar moléculas blanco específicas, entre ellas, a la proteína de WT1. En el análisis de la expresión de la proteína de WT1 por western

blot, muestra que existe una disminución en su expresión una vez tratadas las células B16F10 con curcumina; de igual manera, disminuye su expresión tratadas con nuestro WT1-siRNA, y que la estrategia de combinación de estos compuestos, no permite visualizar la expresión de la proteína, inhibiéndola completamente. Estos resultados se correlacionan con lo obtenido de (Anuchapreeda S., et al. 2006), donde utilizando diferentes dosis de curcumina en la línea celular K562 observan una disminución en la expresión de WT1 y con ello, en la proliferación de la línea celular. Así mismo, la modulación de la curcumina en la expresión de la proteína de WT1 en células de cáncer pancreático, muestran una disminución altamente significativa en su expresión y su transcripción, donde se implica que la disminución en la transcripción de WT1 tratadas con curcumina tiene un rol significativo en la proliferación celular (Wolfgang G., et al. 2009). Como mencionamos, la incubación en conjunto de Curcumina y WT1-siRNA muestran una dramática disminución en la expresión de WT1, pues no se observa en nuestro western blot. Sugerimos que la modulación con nuestro WT1-siRNA permite la potencialización de la curcumina en combinación.

Las estrategias terapéuticas diseñadas para incrementar la susceptibilidad de la muerte de células tumorales por apoptosis tienen el potencial de aumentar significativamente la eficacia de una amplia variedad de tratamientos contra cáncer (Welters M., et al. 1998). Esto nos conduce a la selección de compuestos alternos como la curcumina para omitir los agentes quimioterapéuticos.

Anteriormente mencionamos que en nuestro laboratorio ha sido demostrada en la línea celular B16F10 la muerte regulada por apoptosis por nuestro WT1-siRNA; con nuestros resultados de citometría de flujo, encontramos que la muerte de la línea celular B16F10 es regulada por apoptosis tratadas con curcumina. El ensayo de Anexina V/ PI, muestra que existe apoptosis temprana a las 24 horas, incluyendo la combinación de tratamiento WT1-siRNA/ curcumina. Este resultado se sustenta con los que han obtenido Min-Liang Kuo, et al 1996., al utilizar células de leucemia HL-60 observado por citometría de flujo con Anexina V y especies reactivas de oxígeno; Ju-Hyung Woo, et al. 2003 donde con 50  $\mu$ M de tratamiento en células de cáncer renal obtuvieron muerte regulada por apoptosis mediante la activación de caspasas observando también fragmentación de DNA, y

Tathagata Choudhuri et al. 2002, que obtuvieron muerte regulada por apoptosis a través de la vía de p53 en células de cáncer de mama. Los experimentos adicionales como la fragmentación del DNA, y la microscopía de fluorescencia mostrando la formación de cuerpos apoptóticos respaldan nuestros resultados. Además, también la formación de colonias se vio disminuida después del tratamiento.

Estos resultados indican que la disminución en la expresión de WT1 mediante Wt1-siRNA pueden inhibir el crecimiento de células de melanoma y se puede potencializar su sensibilidad para la curcumina. Consideramos que nuestro iRNA contra WT1 en combinación con curcumina aumentan su potencial como tratamiento contra melanoma y las perspectivas conducen a un buen pronóstico y el escalamiento siguiente depende de un modelo *in vivo*.

## 8. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos, concluimos lo siguiente:

1. El tratamiento con el WT1-siRNA, curcumina y la combinación de ambos permiten disminuir la viabilidad de la línea celular B16F10 dependiente de dosis; obteniendo una CC50 del WT1-iRNA a 0.5  $\mu$ g y de curcumina de 7.5  $\mu$ M.
2. La combinación de los tratamientos a su CC50 tiene un efecto aditivo en la viabilidad celular, reduciendo la viabilidad en más del 75%.
3. El uso de curcumina, WT1-siRNA y la combinación de ambos, tienen un efecto inhibitorio en la expresión de la proteína de WT1.
4. El uso de curcumina a la CC50 no afecta a células sanas (PBMC), por lo cual se puede considerar como una alternativa natural en el tratamiento anticancerígeno.
5. La producción de clones después de los tratamientos es mínima.
6. La muerte de la línea celular B16F10 después de los tratamientos es regulada por apoptosis.

Todo lo anterior respalda que la terapia génica utilizando a WT1 como blanco terapéutico, podría ser usada en combinación simultánea con curcumina, para obtener mejores resultados: incrementando la destrucción tumoral, utilización de agentes no tóxicos y con ello mejorando la vida y calidad del paciente.



## 9. PERSPECTIVAS

1. Llevar la estrategia génica a un modelo *in vivo*.
2. Evaluación antitumoral y de supervivencia en combinación de los tratamientos.
3. Evaluación y modulación de diferentes citocinas y factores de transcripción en el microambiente tumoral.

## 10.LITERATURA CITADA

1. Abe Y, Hashimoto S, Horie T. 1999. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res.* 39:41–7.
2. Aggarwal BB, Harikumar KB. 2009. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol*; 41:40–59.
3. Ahsan H, Parveen N, Khan NU. 1999. Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Chem Biol Interact*; 121:161–75.
4. Albert O. 1937. Turmeric (curcumin) in biliary diseases. *Lancet*; 229:619–21.
5. American Society of Clinical Oncology. 2010. Clinical Cancer Advances 2010: ASCO's Annual Report on Progress Against Cancer. Accessed at [www.cancer.net/patient/Publications%20and%20Resources/Clinical%20Cancer%20Advances/CC\\_A\\_2010.pdf](http://www.cancer.net/patient/Publications%20and%20Resources/Clinical%20Cancer%20Advances/CC_A_2010.pdf)
6. American Society of Clinical Oncology. 2012. Clinical Cancer Advances 2009: Major Research Advances in Cancer Treatment, Prevention and Screening. Accessed at [www.cancer.net/patient/ASCO%20Resources/Research%20and%20Meetings/CA\\_2009.pdf](http://www.cancer.net/patient/ASCO%20Resources/Research%20and%20Meetings/CA_2009.pdf) on June 8, 2012.
7. Anderson CM, Buzaid AC and Legha SS.1995. Systemic treatments for advanced cutaneous melanoma. *Oncology (Huntingt)*. 9:1149-1158.
8. Atkins M, Lee S, Flaherty LE, Sosman JA, Sondak VK and Kirkwood JM. 2003. A prospective randomized phase III trial of concurrent biochemotherapy (BCT) with cisplatin, vinblastine, dacarbazine (CVD), IL-2 and interferon alpha-2b (IFN) versus CVD alone in patients with metastatic melanoma (E3695): An ECOG-coordinated intergroup trial. Abstract. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 22:708.
9. Austoker J. 1994. Melanoma: Epidemiología y diagnóstico precoz. *BMJ.* 2:408-413.

10. Baeuerle PA, Henkel T. 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*;12:141–79.
11. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA and Thompson JF. 2001. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 19:3635-3648.
12. Ballo M, Ang KK. 2003. Radiation therapy for malignant melanoma. *Surg Clin North Am.* 83:323-342.
13. Bertram,J. 2000. The molecular biology of cancer, *Molecular Aspects of Medicine*, Volume 21, Issue 6, Pages 167-223.
14. Bhindi R, Fahmy RG, Lowe HC, Chesterman CN, Dass CR, Cairns MJ, Saravolac EG, Sun LQ and Khachigian LM. 2007. DNA Enzymes, Short Interfering RNA, and the Emerging Wave of Small-Molecule Nucleic Acid-Based Gene-Silencing Strategies. *American Journal of Pathology.* 171:1079-1087.
15. Brady MS. 2004. Sentinel lymph node mapping in patients with cutaneous melanoma. *Dermatol Surg.* 30:272-278.
16. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J and Haber DA. 1990. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell.* 60: 509–520.
17. Carnero, A. 2002. Targeting the cell cycle for cancer therapy. *British Journal of Cancer* (2002) 87, 129–133.
18. Chada S, Menander KB, Bocangel D, Roth JA, Ramesh R. 2008. Cancer targeting using tumor suppressor genes. *Front Biosci*; 13: 1959–1967.
19. Chen D, Nie M, Fan MW. 2008. Anti-inflammatory activity of curcumin in macrophages stimulated by lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*. *Pharmacology*;82:264–9.
20. Chen H , Zhang ZS , Zhang YL , Zhou DY 1998. Curcumin inhibits cell proliferation by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis in colon carcinoma cells.

21. Chen X, Lin J, Kanekura T, Su J, Lin W, Xie H, Wu Y, Li J, Chen M and Chang J. 2006. A small interfering CD147-targeting RNA inhibited the proliferation, invasiveness, and metastatic activity of malignant melanoma. *Cancer Res.* 66:1323-1330.
22. Chun KS, Keum YS, Han SS. 2003. Curcumin inhibits phorbol ester-induced expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through suppression of extracellular signal-regulated kinase activity and NF-kappaB activation. *Carcinogenesis*;24:1515–24.
23. Cirielli C, Riccioni T, Yang C, Pili R, Gloe T, Chang J, Inyaku K, Passaniti A and Capogrossi MC. 1995. Adenovirus-mediated gene transfer of wild-type p53 results in melanoma cell apoptosis in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* 63:673-679.
24. Clark WH Jr, From L, Bernardino EA and Mihm M. 1969. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 29: 705-726.
25. DeBerardinis, A., Lum, J., Hatzivassiliou, G., Thompson, C. 2008 The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation, *Cell Metabolism*, Volume 7, Issue 1, Pages 11-20.
26. Denninghoff V, Falco J, Curutchet HP and Elsner B. 2006. Estudio del ganglio centinela, Diagnóstico y tratamiento del Melanoma Maligno Cutáneo, estadíos I y II. *MEDICINA (Buenos Aires).* 66:144-146.
27. Desmond RA and Soong SJ. 2003. Epidemiology of malignant melanoma. *Surg Clin North Am.* 83:1-29.
28. Dubois RW, Swetter SM, Atkins M, McMasters K, Halbert R, Miller SJ, Shiell R and Kirkwood J. 2001. Developing indications for the use of sentinel lymph node biopsy and adjuvant high-dose interferon alpha-2b in melanoma. *Arch Dermatol.* 137:1217-1224.
29. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M. 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell.* 69: 119–128.
30. Ferrándiz, C. 2001. *Dermatología clínica*, 2ª. edición. Madrid, España. Editorial Elsevier. 363-364.

31. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:806-811.
32. Fisher RI, Neifeld JP and Lippman ME. 1976. Estrogen receptors in human malignant melanoma. *Lancet*. 2:337–338.
33. Goldstein BG and Goldstein AO. 2001. Diagnosis and management of malignant melanoma. *Am Fam Physician*. 63:1359-1368.
34. Greene M. 1999. The genetics of hereditary melanoma and nevi. *Cancer*. 86:2464-2477.
35. Grin CM, Kopf AW, Welkovich B, Bart RS and Levenstein MJ. 1990. Accuracy in the clinical diagnosis of malignant melanoma. *Arch Dermatol*. 126:763-766.
36. Guo S and Kempthues KJ. 1996. Molecular genetics of asymmetric cleavage in the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Curr Opin Genet Dev*. 6:408-415.
37. Gururaj AE, Belakavadi M, Venkatesh DA, Marmé D, Salimath BP. 2002. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *Biochem Biophys Res Commun*; 297: 934–42.
38. Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM and Housman DE. 1991. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:9618-9622
39. Hannon GJ. 2002. RNA interference. *Nature*. 418:244–251.
40. Haruo Sugiyama, Naoya T., Yusuke O., Naoko T., Asako T., Mari H., Sayaka A., Ikuyo F., Ken I., Junya N., Satoshi T., Yayoi K., Saori M., Tanyarat J., Zheyu L., Toshiaki S., Sumiyuki N., Akihiro T., Yoshihiro O. 2008. Wilms' tumor gene WT1-shRNA as a potent apoptosis-inducing agent for solid tumors. *International Journal of Oncology*. 32:701-711.
41. Hersh EM, Stopeck AT. 1997. Advances in the biological therapy and gene therapy of malignant disease. *Clin Cancer Res*. 3:2623-2629.
42. Hong J, Zhao Y and Huang W. 2006. Blocking c-myc and stat3 by *E. coli* expressed and enzyme digested siRNA in mouse melanoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 348:600-605.

43. International Agency for Research on Cancer. 2002. GLOBOCAN. Cáncer Mundial. Página web: <http://www-dep.iarc.fr/>
44. Jansen B, Schlagbauer-Wadl H, Kahr H, Heere-Ress E, Mayer BX, Eichler HG, Pehamberger H, Gana-Weisz M, Ben-David E, Kloog Y and Wolff K. 1999. Novel Ras antagonist blocks human melanoma growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 14019-14024.
45. Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LA, Wu X, Jamison PM, Wingo PA, Howe HL, Anderson RN and Edwards BK. 2004. Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975-2001, with special feature regarding survival. *Cancer.* 101:3-27.
46. Jendreyko N, Popkov M, Rader C and Barbas CF (2005). Phenotypic knockout of VEGF-R2 and Tie-2 with an intradiabody reduces tumor growth and angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8293-8298.
47. Ju-Hyung Woo, Young-Ho Kim, Yun-Jung Choi, Dae-Gon Kim, Kyung-Seop Lee, Jae Hoon Bae, Do Sik Min, Jong-Soo Chang, Yong-Jin Jeong, Young Han Lee, Jong-Wook Park, and Taeg Kyu Kwon. 2003. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt *Carcinogenesis* 24 (7): 1199-1208.
48. Katagiri Y, Hozumi Y and Kondo S. 2006. Knockdown of Skp2 by siRNA inhibits melanoma cell growth in vitro and in vivo. *J Dermatol Sci.* 42:215–224.
49. Keilholz U, Goey SH, Punt CJ, Proebstle TM, Salzmann R, Scheibenbogen C, Schadendorf D, Lienard D, Enk A, Dummer R, Hantich B, Geueke AM and Eggermont AM. 1997. Interferon alfa-2a and interleukin-2 with or without cisplatin in metastatic melanoma: a randomized trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Melanoma Cooperative Group. *J Clin Oncol.* 15:2579-2588.
50. Khar A, Ali AM, Pardhasaradhi BVV, Varalakshmi Ch, Anjum R, Kumari AL. 2001. Induction of stress response renders human tumor cell lines resistant to curcumin-mediated apoptosis: role of reactive oxygen intermediates. *Cell Stress Chaperones;* 6:368 – 76.

51. Kikuchi T, Moore MA and Crystal RG. 2000. Dendritic cells modified to express CD40 ligand elicit therapeutic immunity against preexisting murine tumors. *Blood*. 96:91-99.
52. Kiuchi F, Goto Y, Sugimoto N. 1993. Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*; 41:1640–3.
53. Klatzmann D, Cherin P, Bensimon G, Boyer O, Coutellier A, Charlotte F, Boccaccio C, Salzmann JL and Herson S. 1998. A phase I/II dose escalation study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase “suicide” gene therapy for metastatic melanoma. Study Group on Gene Therapy of Metastatic Melanoma. *Hum Gene Ther*. 9:2585-2594.
54. Kraehn M, Schartl M and Peter R. 1994. Human melanoma: a genetic disease? *Cancer*. 75: 1228-1237.
55. Kunnumakkara AB, Guha S, Krishnan S. 2007. Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products. *Cancer Res*;67:3853–61.
56. Lampe V, Milobedzka J. Studien uber Curcumin. *Ber. Deut. Chem. Ges.* 1913;46:2235–7.
57. Lazo PA. 1996. Terapia génica humana: tendencias y problemas. *Med Clin (Barc)*. 106:469-476.
58. Lee YK, Park SY, Kim YM. 2009. Regulatory effect of the AMPK-COX-2 signaling pathway in curcumin-induced apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Ann N Y Acad Sci*;1171:489–94.
59. Legha SS, Ring S, Bedikian A, Plager C, Eton O, Buzaid AC and Papadopoulos. 1996. Treatment of metastatic melanoma with combined chemotherapy containing cisplatin, vinblastine and dacarbazine (CVD) and biotherapy using interleukin-2 and interferon-alpha. *Ann Oncol*. 7:827-835.
60. Legha SS. 1989. Current therapy for malignant melanoma. *Semin Oncol*. 16:34-44.
61. Leitner RMC. 2006. Epidemiología del melanoma cutáneo. *Rev Argent Dermatol*. 87:86-97.

62. Lens MB, Reinam T and Husain AF. 2003. Use of tamoxifen in the treatment of malignant melanoma. Systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *Cancer*. 98:1355-1361.
63. Leonetti C, Agnado ID, Lozupone F, Valentín A, Geiser T, Zon G, Calabretta B, Citro G and Zupi G. 1996. Antitumor Effect of c-myc Antisense Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides on Human Melanoma Cells In Vitro and in Mice. *J Natl Cancer Inst*. 88:419–429.
64. Lipton A, Harvey HA, Lawrence B, Gottlieb R, Kukrika M, Dixon R, Graham W, Miller S, Heckard R, Schelzel D and White DS. 1983. *Corynebacterium parvum* versus BCG adjuvant immunotherapy in human malignant melanoma. *Câncer*. 51:57-60.
65. Lu YP, Chang RL, Lou YR, Huang MT, Newmark HL, Reuhl K, Conney AH. 1994. Effect of curcumin on 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate- and ultraviolet B light-induced expression of c-jun and c-fos in JB6 cells and in mouse epidermis. *Carcinogenesis*; 15:2363–70.
66. MacKie RM. 1998. Incidence, risk factors and prevention of melanoma. *Eur J Cancer*. 34:3-6.
67. Martinez J and Otley C 2001. The management of melanoma and non melanoma skin cancer: a review for the primary care physician. *Mayo Clinic Proc*. 76:1253-1265.
68. Martínez-Saíd H, Cuellar-Hubbe M, Barrón Velásquez E, Padilla RA, Herrera-Gómez A, López Graniel CM, De la Garza SJ and Mohar-Betancourt A. 2004. Epidemiology of cutaneous melanoma in México (1980-2002). *Eur J Surg Oncol*. 30:163
69. Menke AL, Van der Eb AJ and Jochemsen AG. 1998. The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene? *Int. Rev. Cytol*. 181:151-212.
70. Menssen H, Renkl H and Rodeck U. 1995. Presence of Wilm's tumor gene (wt1) transcripts and WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia*. 9: 1060-1067.
71. Milobedeska J, Kostanecki V, Lampe V. 1910. Structure of curcumin. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*;43:2163–2170. 11



72. Min-Liang Kuo, Tze-Sing Huang, Jen-Kun Lin.1996. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells,
73. Miwa H, Beran M and Saunders G. 1992. Expression of the Wilm's tumor gene (wt1) in human leukemias. *Leukemia*. 6: 405-459.
74. Moolten FL. 1994. Drug sensitivity “suicide”genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther*. 1:279-287.
75. Mulherkar R. 2001. Gene therapy for cancer. *Current Science*. 81:555-560.
76. Munford RS, Pugin J. 2001. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med*;163:316–21.
77. Nakai N, Kishida T, Shin-Ya M, Imanishi J, Ueda Y, Kishimoto S and Mazda O. 2007. Therapeutic RNA interference of malignant melanoma by electrotransfer of small interfering RNA targeting Mitf. *Gene Ther*. 14:357-365.
78. Nakatsuka S, Oji Y, Horiuchi T, Kanda T, Kitagawa M, Takeuchi T, Kawano K, Kuwae Y, Yamauchi A, Okumura M, Kitamura Y, Oka Y, Kawase I, Sugiyama H and Aozasa K. 2006. Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Modern Pathology*. 19:804–814.
79. Napoli C, Lemieux C and Jorgensen R. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 2:279-289.
80. Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, Coppola D, Jaroszeski M, Dalton W, Jove R and Yu H. 1999. Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res*. 59:5059-5063.
81. O'Day SJ, Kim CJ and Reintgen DS. 2002. Metastatic melanoma: chemotherapy to biochemotherapy. *Cancer Control*. 9:31-38.
82. Odot, J., Albert, P., Carlier, A., Tarpin, M., Devy, J. and Madoulet, C. 2004. In vitro and in vivo anti-tumoral effect of curcumin against melanoma cells. *Int. J. Cancer*, 111: 381–387.
83. Ohminami H, Yasukawa M and Fujita S. 2000. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. *Blood*. 95: 286-293.

84. Oji Y, Ogawa H, Tamaki H, Oka Y, Tsuboi A, Kim EH, Soma T, Tatekawa T, Kawakami M, Asada M, Kishimoto T and Sugiyama H. 1999. Expression of the Wilm's tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res.* 90:194-204.
85. Organización Mundial de la Salud. 2015. Disponible en línea: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>
86. Parmiani G., Arienti F., Melani C., Belli F., Gallino G., Mazzocchi A. 2001. Melanoma Techniques and protocols. Volume 61 of the series Methods in Molecular medicine pp 203-222.
87. Piepkorn M. 2000. Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. *J Am Acad Dermatol.* 42:705-723.
88. Qian F, Li YP, Sheng X, Zhang ZC, Song R, Dong W, Cao SX, Hua ZC and Xu Q. 2007. PRL-3 siRNA Inhibits the Metastasis of B16-BL6 Mouse Melanoma Cells in vitro and in vivo. *Mol Med.* 13:151-159.
89. Qian H, Yu J, Li Y, Wang H, Song C, Zhang X, Liang X, Fu M and Lin C. 2007. RNA interference against metastasis-associated gene 1 inhibited metastasis of B16F10 melanoma cell in C57BL/6 model. *Biol Cell.* 99:573-581.
90. Ramachandran C, You W. 1999. Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin. *Breast Cancer Res Treat.,* 54: 269-278.
91. Rao CV, Simi B, Reddy BS. 1993. Inhibition by dietary curcumin of azoxymethanol-induced ornithine decarboxylase, tyrosine protein kinase, arachidonic acid metabolism and aberrant crypt foci formation in the rat colon. *Carcinogenesis;* 14: 2219–25.
92. Ravindran, J., Prasad, S., & Aggarwal, B. B. 2009. Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively? *The AAPS Journal,* 11(3), 495–510.
93. Rebecca L., Kimberly D. and Ahmedin Jemal. 2015 CA: A Cancer Journal for Clinicians Volume 65, Issue 1, pages 5–29.

94. Reeves ME, Royal RE, Lam JS, Rosengerg A and Hwu P. 1996. Retroviral transduction of human dendritic cells with a tumor-associated antigen gene. *Cancer Res.* 56:5672-5677.
95. Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Mariotto A, Fay MP, Feuer EJ and Edwards BK. 2003. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2000, National Cancer Institute. Bethesda, MD. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2000/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2000/)
96. Rivera MN and Haber DA. 2005. Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer.* 5: 699–712
97. Rodríguez García R, Hechavarría Miyares JH and Azze Pavón MA. 2001. Cáncer de piel y ocupación. *Revista Cubana de Medicina [en línea]* 40: 266-272. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75232001000400005&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75232001000400005&script=sci_arttext)
98. Romano N and Macino G. 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol.* 6:3343-3353.
99. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, Merino MJ, Culver K, Miller ADE, Blaes RM and Anderson WF. 1990. Gene transfer into humans: immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med.* 323:570-578.
100. Rosenfeld C, Cheever MA and Gaiger A. 2003. WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. *Leukemia.* 17:1301-1312.
101. Saiag P, Bernard M, Beauchet A, Bafounta ML, Bourgault-Villada I and Chagnon S. 2005. Ultrasonography using simple diagnostic criteria vs palpation for the detection of regional lymph node metastases of melanoma. *Arch Dermatol.* 141:183-189.
102. Sandur SK, Pandey MK, Sung B. 2007. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially

regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis*; 28:1765–73.

103. Schaffer JV, Rigel DS, Kopf AW and Bolognia JL. 2004. Cutaneous melanoma- Past, present and future. *J Am Acad Dermatol*. 51: S65-9.
104. Secretaria de Salud. 2015 Boletín bimensual sobre incidencias de cáncer, Boletín 2015, sem 05. Disponible en línea: [www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem05.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem05.pdf)
105. Seibert K, Masferrer JL. 1994. Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. *Receptor*;4:17–23.
106. Shahar Lev-Ari , Akiva Vexler , Alex Starr , Maia Ashkenazy-Voghera , Joel Greif , Dan Aderka , Rami Ben-Yosef. 2007. Curcumin Augments Gemcitabine Cytotoxic Effect on Pancreatic Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Investigation* Vol. 25, Iss. 6.
107. Sharp PA. 2001. RNA interference. *Genes & Dev*. 15:485–490.
108. Soiffer R, Lynch T, Mihm M, Jung K, Rhuda C, Schmollinger JC, Hodi FS, Lieber L, Lam P, Mentzer S, Singer S, Tanabe KK, Cosimi AB, Dudai R, Sober A, Bhan A, Daley J, Neuberg D, Parry G, Rokovich J, Richard L, Drayer J, Berns A, Clift S, Cohen LK, Mulligan RC and Dranoff G. 1998. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:13141-13146.
109. Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. 2003. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci*;24:96–102.
110. Sudhakar, A. 2009. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 1(2), 1–4. <http://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2>
111. Sumimoto H, Miyagishi M, Miyoshi H, Yamagata S, Shimizu A, Taira K and Kawakami Y. 2004. Inhibition of growth and invasive ability of melanoma by inactivation of mutated BRAF with lentivirus-mediated RNA interference. *Oncogene*. 23:6031-6039.

112. Swanson NA, Lee KK, Gorman A and Han H. 2002. Biopsy techniques. Diagnosis of melanoma. *Dermatol Clin.* 20:677-680.
113. Syng-Ai C, Kumari AL, Khar A. 2004. Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. *Mol Cancer Ther*, 3: 1101-1108.
114. Tak PP, Firestein GS. 2001. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*;107:7–11.
115. Tang, X.-q., BI, H., FENG, J.-q. and CAO, J.-g. 2005. Effect of curcumin on multidrug resistance in resistant human gastric carcinoma cell line SGC7901/VCR. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26: 1009–1016.
116. Tannous ZS, Mihm MC, Sober AJ and Duncan LM. 2005. Congenital melanocytic nevi: Clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management. *J Am Acad Dermatol.* 52:197-203.
117. Tathagata Choudhuri, Suman Pal, Munna L Agwarwal, Tanya Das, Gaurisankar Sa, 2002. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction.
118. Tong QS, Zheng LD, Lu P, Jiang FC, Chen FM, Zeng FQ, Wang L, Dong JH. 2006. Apoptosis-inducing effects of curcumin derivatives in human bladder cancer cells. *Anticancer Drugs*, 17: 279-287.
119. Tsao H and Niendorf K (2004). Genetic testing in hereditary melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 51:803-808.
120. Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G and Haluska FG (2004). Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol.* 122:337-341.
121. Van Driessche A, Berneman ZN and Van Tendeloo VF. 2012. Active specific immunotherapy targeting the Wilms' tumor protein 1 (WT1) for patients with hematological malignancies and solid tumors: lessons from early clinical trials. *Oncologist.* 17:250-259.
122. Vile RG and Hart IR. 1993. Use of Tissue-specific Expression of the Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Gene to Inhibit Growth of Established Murine Melanomas following Direct Intratumoral Injection of DNA. *Cancer Res.* 53:3860-3864.

123. Walker MJ, Beattie CW, Patel MK, Ronan SM and Das Gupta TK. 1987. Estrogen receptor in malignant melanoma. *J Clin Oncol.* 5:1256–1261.
124. Walsh P, Gibbs P and Gonzalez R. 2000. Newer strategies for effective evaluation of primary melanoma and treatment of stage III and IV disease. *J Am Acad Dermatol.* 42:480-489.
125. Welters MJ, Fichtinger-Schepmen AMJ, Baon RA, Flens MJ, Scheper RJ, Braakhuis BJM. 1998. Role of glutathione, glutathione S-transferases and multidrug resistance-related proteins in cisplatin sensitivity of head and neck cancer cell lines. *Br J Cancer;* 77:556 – 61.
126. Wolfgang Glienke, Luise Maute, Johannes Wicht, Lothar Bergmann. 2009. Wilms' tumour gene 1 (WT1) as a target in curcumin treatment of pancreatic cancer cells. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER* 45, 874–880.
127. Yi C, Huang Y, Guo ZY and Wang SR. 2005. Antitumor effect of cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy system mediated by *Bifidobacterium infantis* on melanoma. *Acta Pharmacol Sin.* 26:629-634.
128. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Bhattarakosol P. 2006. Effects of curcumin on tumor angiogenesis and biomarkers, COX-2 and VEGF, in hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice. *Clin Hemorheol Microcirc;*34:109–15.
129. Zamora-Avila DE, Franco-Molina MA, Trejo-Avila LM, Rodríguez-Padilla C, Reséndez-Pérez D, Zapata-Benavides P. 2007. RNAi silencing of the WT1 gene inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the B16F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Res. Dec;*17(6):341-8
130. Zamora-Avila DE, Zapata-Benavides P, Franco-Molina MA, Saavedra-Alonso S, Trejo-Avila LM, Reséndez-Pérez D, Méndez-Vázquez JL, Isaias-Badillo J, Rodríguez-Padilla C. 2009. WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI-RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth. *Cancer Gene Ther. Dec;*16(12):892-9.
131. Zapata-Benavides P, Manilla-Muñoz E, Zamora-Avila DE, Saavedra-Alonso S, Franco-Molina MA, Trejo-Avila LM, Davalos-Aranda G, Rodríguez-Padilla C. 2012. WT1 silencing by RNAi synergizes with chemotherapeutic agents

and induces chemosensitization to doxorubicin and cisplatin in B16F10 murine melanoma cells. *Oncol Lett.* Apr 1;3(4):751-755.

132. Zapata-Benavides P, Tuna M, Lopez-Berestein G, Tari AM. 2002. Downregulation of Wilms' tumor 1 protein inhibits breast cancer proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 26;295(4):784-90
133. Zitelli JA, Brown CD and Hanusa BH. 1997. Surgical margins for excision of primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 37:422-429.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

José Luis Zacarías Hernández

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con orientación en Inmunobiología.

Tesis: EFECTO COMBINADO ANTITUMORAL CON WT1-siRNA Y CURCUMINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10 *in vitro*.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Calpulalpan, Tlaxcala, el 10 de abril de 1991. Hijo de José Luis Abelardo Zacarías Arzola y María Guadalupe Hernández Vázquez.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grado obtenido de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2015; con mención honorífica en defensa de tesis para titulación.

Experiencia Profesional: Auxiliar de docencia en diferentes materias en la Facultad de Ciencias Biológicas, Ponente en diferentes congresos tanto nacionales como internacionales y participante de proyectos de investigación.