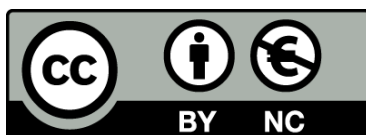




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Bases moleculars i estratègies terapèutiques contra les metàstasis del melanoma uveal

Mercè Alsina Jodar



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència [Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

This doctoral thesis is licensed under the [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).





# **BASES MOLECULARS I ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES CONTRA LES METÀSTASIS DEL MELANOMA UVEAL**

Memòria presentada per **Eduard Cabré Estivill** per  
optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada al grup de TGF- $\beta$  i Càncer de l'Institut d'Investigació  
Biomèdica de Bellvitge sota la direcció de la Dra. Àngels Fabra Fres i  
la tutoria de la Dra. M<sup>a</sup> Isabel Fabregat Romero, en el programa de  
Biomedicina

**Eduard Cabré  
Estivill**

**Dra. Àngels Fabra  
Fres**

**Dra. M<sup>a</sup> Isabel  
Fabregat**

Barcelona, 2018





Aquest treball ha estat possible gràcies al finançament de la Marató TV3, la Asociación Española Contra el Cáncer, el Instituto de Salud Carlos III i la Generalitat de Catalunya.

- “Fundació La Marató de TV3” (2015-2017) (Ref: 201331-32 a AFABRA)
- La “Asociación Española Contra el Cáncer” Grupos Consolidados modalidad B (GCB15152978SOEN al grup de A. FABRA)
- Instituto de Salud Carlos III: ISCIII (2014-2018) (Ref PI13/2272 a A. FABRA)
- Instituto de Salud Carlos III: ISCIII (2016-2018) (Ref PI15/01461 a JM CAMINAL)
- Generalitat de Catalunya - Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) 2009SGR-312 i 2014 SGR0334 a I. FABREGAT – A. FABRA).





# AGRAÏMENTS

**Bases Moleculars i Estratègies Terapèutiques contra les Metàstasis  
del Melanoma Uveal**





No és fàcil començar aquesta pàgina, i crec que aquesta imatge és una bona manera de representar l'agraïment que sento per cadascun dels que ha fet possible aquesta tesi. Moltes gràcies a tots els que formeu part d'aquestes lletres, perquè el vostre granet de sorra sens dubte ho ha fet infinitament més fàcil.

<b>Antònia, Caminal,</b>		<b>Yolanda,</b>
<b>Dani Lorenzo, Ana</b>		<b>Maria, Inés,</b>
<b>Fonseca, Àngels,</b>		<b>Paola, Helena,</b>
<b>Andrea, David, Noel,</b>		<b>Dani Caballero,</b>
<b>Miguel, Silvia, Laia,</b>		<b>Òscar, Antoni,</b>
<b>Ferreres, Irene, Xavi,</b>		<b>Erika, Raffa,</b>
<b>Jasmina, Joaquim, Juan,</b>		<b>Marta, Santi,</b>
<b>Sara, Rut,</b>		<b>Jaime, Iván,</b>
<b>Eva, Montse, Lourdes,</b>		<b>Esther, Kelly,</b>
<b>Mar, Dani Rodríguez,</b>		<b>Katja, Franzí,</b>
<b>Jose, Dani Bello,</b>		<b>Roser, Susana,</b>
<b>Joan, Ana Angulo,</b>		<b>Judith, Francesca,</b>
<b>Olga, Judit, Pedro,</b>		<b>Iratxe, Ricard,</b>
<b>Àlex, Fort, Eneida,</b>		<b>Macarena</b>

A partir d'aquí, m'agradaria expressar unes paraules addicionals a algunes d'aquestes persones, les quals han tingut un paper clau en aquesta etapa.

**Marta**, començo per tu perquè cronològicament ets qui té més culpa d'aquest èxit. Em sento molt afortunat que les nostres vides es topessin a Hull i de cadascun dels moments que hem compartit després. Gràcies també per haver-me aconseguit lloc on dormir el dia abans de l'entrevista i per haver-me presentat certes amistats ;) Espero compartir moltes més etapes junts, com per exemple la celebració la teva tesi, pròximament!!! **Dani**, mi lepero favorito, nunca imaginé que podría congeniar tanto con una persona en apenas un año, pero no sabes cuánto me alegra que haya sido así. Gracias por todos los viajes y por venir a Barcelona no una sino dos veces, Te debo otra escapada a Huelva pronto. Un abrazo crack.

Abans d'endinsar-me a l'IDIBELL vull fer una parada a casa. Al lloc que sempre ha estat casa per molt que ja no hi visqui. **Mama, Papa**, gràcies pel suport incondicional i per l'educació que em va donar que m'ha permès arribar fins aquí. Gràcies pels valors transmesos i per escoltar-me i aconsellar-me sempre. Us estimo. **Àlex**, té molt de mèrit el fet que hagi sentit que sempre has estat aquí tot i haver estat a quasi 17000 km durant tota aquesta etapa. Gràcies per l'interès constant i ens veiem aviat! Ja que passem per casa en aquest punt vull agrair bàsicament la seva amistat al **Fort** i al **Pedro**. Fa mooolt temps que ens aguantem, osigui que ja sabeu de sobres el que penso de vosaltres, però no està de més reiterar-vos el meu agraïment per haver-me acompanyat també ara. Sou enormes!

Del lab, vull agrair-te **Àngels** la possibilitat que em vas donar d'iniciar-me en aquest món. Gràcies per confiar en mi aquell dia i tot el que m'has ensenyat. També per permetre'm formar part d'un grup multi-disciplinar interessantíssim on he conegut gent excepcional. **Dani**, ha estat un plaer topiar amb un metge com tu. Gràcies per buscar els congressos i contar amb mi a cada pas, ets un exemple a seguir i et desitjo el millor tan personal com professionalment. **Caminal**, gràcies per compartir el meu primer congrés internacional, pel viatge a Washington i per l'acollida que sempre m'has donat dins el teu grup. **Ferreres**, tu també ets un dels

culpables que jo tingui una imatge idealitzada dels metges que us interessa la ciència. Gràcies i molta sort!! A tots els de màster que també m'heu hagut d'aguantar en diferents moments: **Iñaki, Jose, Eva i Joan**. Sois todos completamente distintos, pero tenéis un denominador común, me habéis tenido que tragar y habéis dejado huella en el lab... Yo tampoco he sido el mismo durante las etapas en que hemos coincidido en estos tres años, pero de verdad os deseo todo lo mejor porque habéis tenido una paciencia infinita y una actitud inmejorable.

Del meu COM adoptiu (COM-2) vull agrair-vos la vostra rebuda des del primer dia i que em féssiu sentir un més. **Sílvia**, segueixes destacant per ser la persona més cuqui que conec, però a més ets moltíssimes altres coses que m'alegro haver descobert. Vaig notar moltíssim la teva marxa del COM i aquest és el millor exemple de l'important que has estat per mi en aquesta etapa. Gràcies per totes les estones al meu costat **Juan**, fue corto pero intenso, aunque parezca surrealista gracias por meterte conmigo, siempre seré tu rubia ;) **David y Santi**, a vosotros también os considero un *must* en mi acogida. Gracias por mantenerme al día y culturizarme tanto a nivel futbolístico como social (cada uno ya sabéis en qué participé más, xD). **Òscar**, gràcies per totes les vegades que m'has convidat al Camp Nou, malgrat saber que desitjo que baixi un dels equips catalans de 2a divisió. **Roser**, gràcies per un detall tan absurd com venir a saludar i despedir-te cada dia, aportes alegria al COM! **Susana**, fa poc que has arribat però has aportat dolçor al laboratori (guiño guiño), et desitjo el millor! Seguiré por la nueva pareja de italianas fichadas recientemente. **Paola y Francesca**. Sois energía y alegría para este departamento. Echaré de menos tus *tuppers* gigantes con deliciosa pasta, Paola, y tu actitud y buen humor por los pasillos, Francesca. Gracias a las dos. **Judith** te lo he dicho ya varias veces, pero soy muy fan del rollo que has aportado al COM-3 desde tu llegada. Gracias por tus charlas filosóficas y dejarnos el fuet a los demás en los pica-picas ;) eres un amor!! En cuanto a las peques de

los IFs, **Macarena** e **Irene**, tengo que agradeceros la locura que habéis aportado al COM. Macarena, echaré de menos oírte “cantar” desde el laboratorio de al lado. Irene, gracias por abrirme las puertas de tu lab siempre que buscaba chocolate, al final va a resultar que no eras tan borde ;) **Noel**, gràcies per obrir-me les portes de casa teva en repetides ocasions i per cedir la teva pala de pàdel sempre que ha estat necessari, tot i que tu i l'**Iván** no sapigueu perdre... (com en el partir amb l'**Iñaki** del plan “hasta que marque el Madrid!!”). **Dani**, mi actor favorito y de lejos, gracias por tus clases de interpretación que me han ayudado infinitamente en esta última etapa. Gracias también por ser el organizador oficial de fiestas y eventos en el COM, eres un grande, nunca dejes de serlo :) Finalmente, **Sara**, no t'imagines l'alegria que em va fer saber que tornaves. Només tinc paraules bones cap a tu, començant pel meu agraïment etern per fer realitat el meu “capritxo” de portada!! Gràcies per la infinitat de cafès i xocolates compartits durant aquests mesos, prometo no deixar de fer-los malgrat canviarem l'horari. Ànims amb l'etapa que acabes de començar i confiança, perquè estic convençut que t'anirà genial!!

Durant el recorregut pel COM m'he saltat 3 persones. No és que m'hagi oblidat de vosaltres sinó que considero que heu estat el meu pilar fonamental durant aquests anys i vull agrair-vos tot el que heu fet per mi. Seguint l'ordre alfabètic començaré per l'**Antònia**. Gràcies per tant... Et dec una gran part d'aquesta tesi i, de fet, estic convençut que ets una de les principals causes de que me n'hagi ensortit en aquest temps. Des del primer dia he après infinitat de tu. Gràcies per tot el que m'has ensenyat al laboratori, perquè et considero una científica brillant (cosa que sap tothom), però sobretot, per tot el que m'has donat com a persona. Gràcies per ajudar-me en els entrebancs, per comprendre'm en les frustracions, per saber estar al meu costat en tot moment i per esforçar-te sempre en ser molt més que la meva mentora. Estic molt feliç d'haver topat amb tu en aquesta etapa. En resum: GRÀCIES!! Seguim per tu **Judit**. Te lo dije un

día, pero conociéndote, no te lo creerías. Has sido mi modelo a seguir desde el primer día que entré. No me preguntes por qué porque no lo sé, pero mi intuición no se equivocó contigo. Gracias infinitas por aguantar que te chinchara al principio, por todas las birras, por las tardes de verano en la playa y por las charlas más profundas que compartimos (y gratis!! xD). Gracias en definitiva por preocuparte por mí y por todo lo que me has dado sin esperar nada a cambio. Me siento muy afortunado de haberte conocido, porque eres de las personas más buenas que conozco. Un abrazo enorme! Finalment, et toca **Olga!** Se que amb lo previsor que ets t'hauràs posat inclús nerviosa quan t'he saltat, però ja saps com sóc... així que et toca a última hora!! M'emporto un record boníssim d'aquesta etapa amb tu, perquè malgrat oferir-me mandarines a canvi de xocolata, ets una persona especial. Gràcies per totes les estones on hem estat arreglant el món després de dinar, de bon matí al teu lab, o a última hora de la tarda. Gràcies per aconsellar-me i ajudar-me sempre anant un pas per davant meu i gràcies per confiar en mi a l'hora de cuidar a la Kero. Me n'alegro de tenir un record de tu tan bonica com ella. Una abraçada gegant.

**Eneida**, ara sí que acabo. Ni en el millor dels meus somnis hagués imaginat que faria tot aquest viatge en tan bona companyia. Gràcies per ser al meu costat des del primer dia fins l'últim, en una de les etapes que més m'ha marcat fins ara. Gràcies pel suport incondicional, per aconseguir treure'm somriures estúpids i per aguantar-me en tots els moments. Gràcies en definitiva per ser la millor companya de viatge, perquè després d'aquesta etapa puc assegurar que segueixo sense imaginar-me ningú millor per ser al meu costat. Saps de sobres que prefereixo els fets que les paraules, així que espero aconseguir demostrar-te tot el que t'estimo i lo graït que em sento de tenir-te al meu costat. Gràcies



# ABREVIACIONS

**Bases Moleculares i Estratègies Terapèutiques contra les Metàstasis  
del Melanoma Uveal**





## ABREVIACIONS

<b>3' UTR</b>	3' Untranslated Region
<b>ABC</b>	ATP Binding Cassette
<b>ABCB5</b>	ATP Binding Cassette Subfamily B Member 5
<b>ABCC5</b>	ATP Binding Cassette Subfamily C Member 5
<b>ABCG2</b>	ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2
<b>ADAM12</b>	A Disintegrin And Metalloproteinase 12
<b>ADN</b>	Deoxiribonucleic Acid
<b>ALDH</b>	Aldehyd Desydragenase
<b>ALIX</b>	Programmed Cell Death 6 Interacting Protein
<b>AMOT</b>	Angiomotin
<b>APC</b>	Adenomatosis Polyposis Coli
<b>ARF6</b>	ADP Ribosylation Factor 6
<b>ARN</b>	Ribonucleic Acid
<b>ARNm</b>	Messenger RNA
<b>ARNsh</b>	Short Hairpin RNA
<b>ARNsi</b>	Small Interfering RNA
<b>ASAP1</b>	ArfGAP With SH3 Domain, Ankyrin Repeat And PH Domain 1
<b>ATP</b>	Adenosine Triphosphate
<b>AXIN2</b>	Axis Inhibition Protein 2
<b>BAP1</b>	BRCA1 associated protein-1
<b>BARD1</b>	BRCA1-associated RING domain protein-1
<b>BCA</b>	Bicinchoninic Acid assay
<b>bFGF</b>	Basic Fibroblast Growth Factor
<b>BrdU</b>	5-Bromo-2'-Deoxyuridine
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>CBP</b>	CREB-Binding Protein
<b>CITED</b>	Cbp/P300 Interacting Transactivator with Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal
<b>CM</b>	Cutaneous Melanoma
<b>CNKSR3</b>	Membrane-associated Guanylate Kinase-interacting Protein-like 1
<b>COX2</b>	Cyclooxygenase-2
<b>CSC</b>	Cancer Stem Cell

## ABREVIACIONES

<b>CTLA4</b>	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
<b>CXCR4</b>	C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
<b>CYSLTR2</b>	Cysteinyl Leukotriene Receptor 2
<b>DAG</b>	Diacylglycerol
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
<b>DCT</b>	Dopachrome Tautomerase
<b>DHH</b>	Desert Hedgehog Homolog
<b>DLL1</b>	Delta Like canonical Notch Ligand 1
<b>DLL3</b>	Delta Like canonical Notch Ligand 3
<b>DLL4</b>	Delta Like canonical Notch Ligand 4
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>dNTP</b>	Deoxynucleotides
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>Dvl</b>	Dishevelled homologue phosphoprotein
<b>ECM</b>	Extracellular Matrix
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EIF1AX</b>	Eukaryotic Initiation Factor 1A
<b>EMT</b>	Epithelial to Mesenchymal Transition
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FADD</b>	Fas Death Domain Protein
<b>FN</b>	Fibronectin
<b>FN-EDA</b>	Fibronectin Extra-Domain A
<b>Fz</b>	Frizzled receptor
<b>GAS8</b>	Growth Arrest-Specific 8
<b>GDP</b>	Guanosine Diphosphate
<b>GEP</b>	Gene Expression Profiling
<b>GNA11</b>	G Protein Subunit Alpha 11
<b>GNAQ</b>	G Protein Subunit Alpha Q
<b>GPCR</b>	G protein-coupled receptors
<b>GRB2</b>	Growth Factor Receptor Bound Protein 2
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glycogen synthase kinase 3 beta
<b>GTP</b>	Guanosine-5'-Triphosphate
<b>H&amp;E</b>	Haematoxylin and Eosin

## ABREVIACIONES

<b>HAdase</b>	Histone Deacetylase
<b>hEGF</b>	Human Epidermal Growth Factor
<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>HH</b>	Hedgehog
<b>HIF-1</b>	Hypoxia-Inducible Factor-1
<b>HSP70</b>	Heat Shock Protein 70
<b>HSP90</b>	Heat Shock Protein 90
<b>hTERT</b>	Human Telomerase Reverse Transcriptase
<b>IF</b>	Intermediate Filament protein
<b>IGF</b>	Insulin Growth Factor
<b>IGFBP6</b>	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 6
<b>IGFR-1<math>\beta</math></b>	Insulin Growth Factor Receptor 1 Beta
<b>IHH</b>	Indian Hedgehog Homolog
<b>IHP</b>	Isolated Hepatic Perfusion
<b>IP</b>	Propidium Iodide
<b>IP3</b>	Inositol 1,4,5-trisphosphate
<b>IP3R3</b>	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 3
<b>IRS</b>	Insulin Receptor Substrates
<b>KC</b>	Keratinocyte Chemoattractant
<b>LATS</b>	Large Tumor Suppressor
<b>LB</b>	Luria Broth
<b>LRP5/6</b>	Lipoprotein Receptor-related Protein
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MAPKAPK5</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 5
<b>MCF</b>	Fibroblasts Conditioned Media
<b>MCH</b>	Hepatocyte Conditioned Media
<b>MCP1</b>	Monocyte Chemoattractant Protein 1
<b>MDSC</b>	Myeloid-Derived Suppressor Cells
<b>MET</b>	Mesenchymal to Epithelial Transition
<b>MIF</b>	Macrophage Migration Inhibitory Factor
<b>MIP-1</b>	Macrophage Inflammatory Protein 1
<b>MIP-2</b>	Macrophage Inflammatory Protein 2
<b>MITF</b>	Melanogenesis Associated Transcription Factor

## ABREVIACIONES

<b>M-MLV RT</b>	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
<b>MMPs</b>	Metalloproteinases
<b>NAD</b>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
<b>OCT-4</b>	Octamer-binding Transcription Factor 4
<b>PAX</b>	Paired box
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PD-1</b>	Programmed Cell Death Protein 1
<b>PDX</b>	Patient Derived Xenograft
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide-3-Kinase
<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
<b>PKC</b>	Protein Kinase C
<b>PLCB4</b>	Phospholipase C-beta-4
<b>PLC-<math>\beta</math></b>	Phospholipase C-beta
<b>polyHEMA</b>	Poly-2-Hydroxyethyl Methacrylate
<b>PRAME</b>	Preferentially Expressed Antigen in Melanoma
<b>PTCH</b>	Patched receptor
<b>PTEN</b>	Phosphatase and Tensin homolog protein
<b>PVDF</b>	Polyvinylidene Fluoride
<b>qPCR</b>	Quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>RAB31</b>	Ras-related protein in brain 31
<b>RASEF</b>	Ras and EF-hand domain-containing protein
<b>RASGRP3</b>	RAS Guanyl Releasing Protein 3
<b>RASSF1A</b>	RAS association domain family 1 isoform A
<b>RIPA</b>	Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
<b>RTK</b>	Tyrosine Kinase Receptors
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
<b>SBF</b>	Serum Bovine Fetal
<b>SD</b>	Standard Deviation
<b>SDF-1</b>	Stromal Cell Derived Factor 1
<b>SEM</b>	Standard Error Measurement of the Mean

## ABREVIACIONES

<b>SF3B1</b>	Splicing factor 3b Subunit 1
<b>SHH</b>	Sonic Hedgehog Homolog
<b>SMO</b>	Smoothened
<b>SOC</b>	Super Optimal broth with Catabolite repression
<b>SOX</b>	SRY box containing
<b>SRSF2</b>	Serine Arginine-Rich Splicing Factor 2
<b>SSEA1</b>	Stage-Specific Embryonic Antigen 1
<b>TAM</b>	Tumor-Associated Macrophages
<b>TAN</b>	Tumor-Associated Neutrophils
<b>TAZ</b>	Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
<b>TBS</b>	Transfer Buffer Salt
<b>TCF/LEF</b>	T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor
<b>TEM</b>	Transmission Electron Microscope
<b>TF</b>	Transcription Factor
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor-Beta
<b>TIMPs</b>	Tissue inhibitors of MMPs
<b>TKI</b>	Tyrosine Kinase Inhibitor
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>TNF-RI</b>	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
<b>TRIO</b>	Trio Rho guanine nucleotide exchange factor
<b>TRPM1</b>	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 1
<b>TSG10</b>	Testis Specific Gene 10
<b>TYR</b>	Tyrosinase
<b>UM</b>	Uveal Melanoma
<b>uPAR</b>	Urokinase Receptor
<b>VEGFA</b>	Vascular Endothelial Growth Factor A
<b>WST-1</b>	Water-Soluble Tetrazolium 1
<b>WT</b>	Wild Type
<b>YAP</b>	Yes-associated protein
<b>ZEB1</b>	Zinc finger E-box-binding homeobox 1
<b>ZEB2</b>	Zinc finger E-box-binding homeobox 2



# RESUM EN ANGLÈS

**Bases Moleculares i Estratègies Terapèutiques contra les Metàstasis  
del Melanoma Uveal**





## SUMMARY

Uveal Melanoma (UM) is the most common intraocular tumour in adults. Surgery and brachytherapy have improved survival rates, but up to 40% of patients develop liver metastases that are refractory to conventional therapies and cause patients' death. Thus, targeting cancer metastasis is imperative for effective treatment to increase patients' overall survival.

It has been proposed that tumours may contain a subpopulation of cells with stem cell-like behaviour and increased drug resistance, which are the seeds of metastases. To find new targets and refine appropriate therapeutic doses we performed our *in vitro* drug-screening studies using both, anoikis-resistant populations and unselected cells from human uveal melanoma cell lines. These had different morphologies, metastatic or primary origin, and *GNAQ* or *GNA11* mutations.

First, we found that anoikis-resistant populations were able to grow in non-adherent conditions as multicellular spheroids and melanospheres which displayed traits associated with stemness. They showed increased chemoresistance and expression of stem-cell markers such as CD133, CD44, CD15, and the transcription factors *OCT-4*, *SOX-2*, *NANOG* and *MITF*, as compared to the global population growing in 2D conditions. Moreover, this stemness-like phenotype could be switched back after 5-6 passages under attached conditions.

Furthermore, treatment of 2D cultures with TGF- $\beta$  triggered an up-regulation of the stemness-related genes and transcription factors *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1* and *ZEB1* among other EMT-related genes, reaching similar expression levels to those from melanospheres. Remarkably, only cells from melanospheres were able to migrate towards a conditioned-media from fibroblast containing IGF-1. This transwell-migration ability was impaired by IMC-A12 antibody against IGFR-1 $\beta$ . In accordance with these results, cells from

## SUMMARY

melanospheres overexpressed receptor IGFR-1 $\beta$ . In addition, these cells also produced MMP-2.

The antiproliferative effects of protein kinase inhibitors were stated using the Screen-Well<sup>®</sup> Kinase Inhibitor Library (BML-2832-0100). In this regard, we favor the MEK and IGFR-1 $\beta$  inhibitors to fight aggressive uveal melanoma cells with a stemness and migratory phenotype.

Finally, preliminary results indicated that OMM-2.5 cell line, derived from metastasis, produced the largest number of extracellular vesicles. These vesicles were mostly exosomes, were uptaken by hepatocytes and carried exosomal biomarkers, integrins and RNAs as cargo.

# TAULA DE CONTINGUTS

**Bases Moleculares i Estratègies Terapèutiques contra les Metàstasis  
del Melanoma Uveal**



<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
<b>1 MELANOMA UVEAL</b>	<b>1</b>
<b>2 ALTERACIONS MOLECULARS ASSOCIADES AL RISC DE METÀSTASI</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Monosomia del cromosoma 3</b>	<b>3</b>
2.1.1 Mutacions de <i>BAP-1</i>	4
<b>2.2 Disomia del cromosoma 3</b>	<b>4</b>
2.2.1 Mutacions de <i>EIF1AX</i>	5
2.2.2 Mutacions de <i>SF3B1</i>	5
2.2.3 Sobreexpressió de <i>PRAME</i>	5
<b>3 EXPRESSIÓ GÈNICA ASSOCIADA AL RISC DE METÀSTASI</b>	<b>7</b>
<b>3.1 Perfils d'expressió gènica</b>	<b>7</b>
3.1.1 micro ARNs	7
3.1.2 Metilació de l'ADN	8
<b>4 HETEROGENEÏTAT TUMORAL</b>	<b>10</b>
<b>4.1 Cèl·lules mare tumorals (CSC)</b>	<b>12</b>
4.1.1 Plasticitat tumoral de les CSC	13
4.1.2 CSC en el melanoma uveal	15
<b>5 MECANISMES MOLECULARS I CEL·LULARS DE LA DISSEMINACIÓ METASTÀTICA</b>	<b>18</b>
<b>5.1 Transició epiteli-mesènquima (EMT)</b>	<b>21</b>
5.1.1 El factor de creixement transformant beta (TGF- $\beta$ )	23
<b>5.2 Organotropisme en el melanoma uveal</b>	<b>25</b>
5.2.1 Receptors de tirosina quinases	25
5.2.2 Exosomes	26
<b>6 VIES DE SENYALITZACIÓ ALTERADES EN EL MELANOMA UVEAL</b>	<b>31</b>
<b>6.1 Via de les GPCR</b>	<b>31</b>
6.1.1 Via de les MAPK	33
6.1.2 Via de Hippo/YAP	34
6.1.3 Via de PI3K	35

## TAULA DE CONTINGUTS

<b>6.2</b>	<b>Via dels receptors de factors de creixement tirosina quinases .....</b>	<b>35</b>
<b>6.3</b>	<b>Vies de senyalització de les CSC .....</b>	<b>37</b>
6.3.1	Via de NOTCH.....	38
6.3.2	Via de Wnt .....	39
6.3.3	Via de Hedgehog.....	40
<b>7</b>	<b>ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES CONTRA EL MELANOMA UVEAL .</b>	<b>42</b>
<b><u>HIPÒTESIS</u></b>		<b><u>47</u></b>
<b><u>OBJECTIUS</u></b>		<b><u>51</u></b>
<b><u>MATERIALS I MÈTODES</u></b>		<b><u>55</u></b>
<b>1</b>	<b>CITÒMICA .....</b>	<b>57</b>
1.1	Línies cel·lulars .....	57
1.2	Cultius cel·lulars.....	58
1.2.1	Descongelació i criopreservació de cèl·lules.....	58
1.2.2	Obtenció de medis condicionats.....	59
1.2.3	Test de micoplasma mitjançant PCR.....	59
1.3	Assaigs de viabilitat i proliferació cel·lular .....	60
1.3.1	Blau tripan .....	60
1.3.2	Violeta cristall .....	60
1.3.3	WST-1.....	61
1.3.4	BrdU .....	61
1.4	Anàlisi d'activitat de l'enzim ALDH .....	62
1.5	Tractaments cel·lulars <i>in vitro</i> .....	62
1.5.1	Resistència a l'anoikis .....	62
1.5.2	Cultiu 3D (esferoides i melanosferes).....	63
1.5.3	Assaig de la capacitat clonogènica.....	63
1.5.4	Cribatge d'inhibidors de proteïna quinases .....	63
1.5.5	Inducció de la transició epiteli-mesènquima .....	64
1.6	Anàlisi de migració .....	64
1.6.1	Assaig de migració per transwells.....	64

# TAULA DE CONTINGUTS

<b>1.7</b>	<b>Obtenció d'exosomes.....</b>	<b>65</b>
1.7.1	Aïllament d'exosomes .....	66
1.7.2	Marcatge d'exosomes .....	66
1.7.3	Criofixació d'exosomes .....	67
1.7.4	TEM (microscopi de transmissió electrònica).....	67
1.7.5	Captació d'exosomes de UM per hepatòcits.....	67
<b>1.8</b>	<b>Citometria de flux .....</b>	<b>68</b>
1.8.1	Anàlisi del cicle cel·lular .....	68
1.8.2	Detecció de receptors cel·lulars .....	69
<b>2</b>	<b>GENÒMICA.....</b>	<b>70</b>
<b>2.1</b>	<b>Silenciament estable del gen <i>GNAQ</i>.....</b>	<b>70</b>
2.1.1	Amplificació de plasmidis .....	70
2.1.2	Producció de les partícules lentivirals shGNAQ.....	71
2.1.3	Transducció i infecció lentiviral .....	72
<b>2.2</b>	<b>Anàlisi d'expressió gènica .....</b>	<b>73</b>
2.2.1	Extracció d'ARN .....	73
2.2.2	RT-qPCR .....	73
<b>3</b>	<b>PROTEÒMICA .....</b>	<b>76</b>
<b>3.1</b>	<b>Obtenció d'extracte proteic.....</b>	<b>76</b>
3.1.1	Lisi cel·lular .....	76
3.1.2	Quantificació proteica per BCA.....	76
3.1.3	Quantificació proteica per mètode bradford .....	77
<b>3.2</b>	<b>Immunodetecció per western blot.....</b>	<b>77</b>
3.2.1	Revelat western blot.....	79
3.2.2	Estudis de senyalització per western blot .....	80
<b>3.3</b>	<b>Immunofluorescència .....</b>	<b>80</b>
3.3.1	Cèl·lules 2D en cobreobjectes.....	80
<b>3.4</b>	<b>Immunodetecció per ELISA.....</b>	<b>82</b>
3.4.1	Array de citoquines.....	82
<b>3.5</b>	<b>Anàlisi de l'activitat gelatinolítica (Zimograma).....</b>	<b>82</b>
3.5.1	En medis condicionats .....	82
3.5.2	Associades a la membrana cel·lular.....	83



## TAULA DE CONTINGUTS

<b>4</b>	<b>ESTUDIS BIOESTADÍSTICS.....</b>	<b>84</b>
4.1	Anàlisi bioestadística .....	84
4.2	Validació clínica a través de l'anàlisi bioinformàtica de dades <i>in silico</i> (TCGA).....	84

## **RESULTATS** **85**

---

<b>1</b>	<b>LES MUTACIONS ALS GENS GNAQ i GNA11 INFLUENCIEN LA PROLIFERACIÓ IN VITRO DE LES LÍNIES CEL·LULARS DE MELANOMA UVEAL .....</b>	<b>87</b>
<b>2</b>	<b>LES LÍNIES CEL·LULARS DE MELANOMA UVEAL CONTENEN SUBPOBLACIONS AMB CARACTERÍSTIQUES DE "CANCER STEM CELLS"...</b>	<b>90</b>
2.1	Resistència a la mort cel·lular per anoikis, formació d'esferoides en suspensió i capacitat clonogènica <i>in vitro</i> .....	90
2.2	Les melanosferes de UM mostren una expressió diferencial de marcadors propis de CSCs .....	96
2.3	Plasticitat cel·lular i <i>stemness</i> en el UM .....	106
2.3.1	Canvis en factors de transcripció relacionats amb la EMT en les cèl·lules cultivades en 3D .....	106
2.3.2	Canvis en factors de transcripció relacionats amb la EMT induïts pels senyals del microambient .....	109
<b>3</b>	<b>ANÀLISI DE LES CAPACITATS MIGRATÒRIES DE LES MELANOSFERES DE UM.....</b>	<b>114</b>
3.1	Expressió dels receptors IGFR1- $\beta$ , c-MET i CXCR4 en les cèl·lules de UM .....	114
3.2	Capacitat migratòria <i>in vitro</i> de les cèl·lules de UM .....	116
3.3	La senyalització a través de IGFR-1 és important per a la migració de les melanosferes de UM.....	120

<b>4</b>	<b>AVALUACIÓ DE LA RESPOSTA ANTIPROLIFERATIVA CAUSADA PER INHIBIDORS DE TKR IN VITRO.....</b>	<b>125</b>
4.1	Les cèl·lules amb característiques CSC-like són més resistents als inhibidors de proteïna quinases .....	125
4.2	El bloqueig de les vies de MAPK i TKR comprometen la supervivència de les cèl·lules de UM amb fenotip de CSC .....	131
<b>5</b>	<b>QUANTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DELS EXOSOMES PRODUÏTS IN VITRO PER LES CÈL·LULES DE UM.....</b>	<b>134</b>
5.1	Les línies cel·lulars de UM provinents de metàstasis o melanosferes produeixen una major quantitat d'exosomes <i>in vitro</i> .....	134
5.2	Els exosomes secretats per les cèl·lules de UM contenen marcadors proteics i ARNs específics .....	136
<b><u>DISCUSSIÓ</u></b>		<b><u>141</u></b>
1	LES "CANCER STEM CELL-LIKE" DE MELANOMA UVEAL: NOVES DIANES CONTRA LES METÀSTASIS. ....	144
2	AVALUACIÓ DE TERÀPIES ESPECÍFIQUES CONTRA EL MELANOMA UVEAL.....	155
3	LES CÈL·LULES DE UM SECRETEN EXOSOMES QUE SÓN CAPTATS PELS HEPATÒCITS IN VITRO .....	159
<b><u>CONCLUSIONS</u></b>		<b><u>163</u></b>
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>		<b><u>167</u></b>
<b><u>ANNEXES</u></b>		<b><u>189</u></b>

## TAULA DE FIGURES

<b>FIGURA I1. ANATOMIA DEL MELANOMA UVEAL</b> .....	1
<b>FIGURA I2. ADQUISICIÓ D'ALTERACIONS GENÈTIQUES EN LA PROGRESSIÓ DEL MELANOMA UVEAL</b> .....	3
<b>FIGURA I3. EVOLUCIÓ DE L'HETEROGENEÏTAT TUMORAL DURANT LA PROGRESSIÓ DEL MELANOMA UVEAL I EL TRACTAMENT</b> .....	11
<b>FIGURA I4. EVOLUCIÓ TUMORAL CLONAL A PARTIR DE LES CSC</b> .....	14
<b>FIGURA I5. CASCADA DE SENYALITZACIÓ RESPONSABLE DE LA MORT CEL·LULAR PER ANOIKIS</b> .....	20
<b>FIGURA I6. MODEL DE DISSEMINACIÓ DEL MELANOMA UVEAL PER LA VIA HEMATÒGENA</b> ..	21
<b>FIGURA I7. MODEL DE TRANSICIÓ EPITELI-MESÈNQUIMA EN CARCINOMES</b> .....	23
<b>FIGURA I8. VIES DE SENYALITZACIÓ DEL TGF-<math>\beta</math> IMPLICADES EN LA EMT</b> .....	24
<b>FIGURA I9. ESTRUCTURA I CONTINGUT BIOLÒGIC DELS EXOSOMES</b> .....	27
<b>FIGURA I10. ORGANOTROPISME DEL MELANOMA SEGONS LES INTEGRINES EXPRESSADES EN ELS EXOSOMES DEL TUMOR PRIMARI</b> .....	30
<b>FIGURA I11. VIES DE SENYALITZACIÓ RELACIONADES AMB LA PROLIFERACIÓ I SUPERVIVÈNCIA CEL·LULAR EN EL MELANOMA UVEAL, SUBSIDIÀRIES A LES MUTACIONS GNA<sub>Q11</sub></b> .....	32
<b>FIGURA I12. VIES DE SENYALITZACIÓ CEL·LULAR DEL MELANOMA UVEAL RELACIONADES AMB LA PROLIFERACIÓ I SUPERVIVÈNCIA CEL·LULAR, INDEPENDENTS A LES GPCR</b> .....	36
<b>FIGURA I13. VIES DE SENYALITZACIÓ RELACIONADES AMB LES CARACTERÍSTIQUES DE STEMNESS DE LES CÈL·LULES MARE TUMORALS</b> .....	38
<b>FIGURA R1. EL SILENCIAMENT DE GNAQ NO COMPORTA UNA REDUCCIÓ DE LA FOSFORILACIÓ DE LA PROTEÏNA ERK</b> .....	89
<b>FIGURA R2. LES LÍNIES CEL·LULARS DE UM CONTENEN POBLACIONS RESISTENTS A LA MORT CEL·LULAR PER ANOIKIS</b> .....	91
<b>FIGURA R3. LES LÍNIES DE UM TENEN UNA SUBPOBLACIÓ CEL·LULAR CAPAÇ DE CRÉIXER EN ESFEROIDES</b> .....	92
<b>FIGURA R4. LES CÈL·LULES DERIVADES DE MELANOSFERES PRESENTEN UNA CAPACITAT CLONOGÈNICA MOLT SUPERIOR A LES CÈL·LULES PROVINENTS D'UN CULTIU EN MONOCAPA</b> .....	94
<b>FIGURA R5. LES MELANOSFERES EN ADHERÈNCIA PRESENTEN UN TEMPS GENERACIONAL SIMILAR PERÒ UN CICLE CEL·LULAR DIFERENT</b> .....	95
<b>FIGURA R6. LA PRESENCIA DE CÈL·LULES CD133<sup>+</sup> ÉS SIGNIFICATIVAMENT MÉS ELEVADA EN LES MELANOSFERES QUE EN LES CÈL·LULES PROCEDENTS DE MONOCAPA</b> .....	97

## TAULA DE CONTINGUTS

<b>FIGURA R7.</b> LES MELANOSFERES DE <b>UM</b> EXPRESSEN ELEVATS NIVELLS DELS MARCADORS DE <b>CSC</b> , <b>CD15</b> I ESPECIALMENT <b>CD44</b> , QUE ES TROBA LOCALITZAT EN LA SEVA MEMBRANA CEL·LULAR .....	99
<b>FIGURA R8.</b> LA SUBPOBLACIÓ CEL·LULAR DE <b>UM</b> FORMADORA DE MELANOSFERES PRESENTA UNA SOBREEXPRESSIÓ DELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ PROPIS DE LES <b>CSC</b> EN COMPARACIÓ AMB LES CÈL·LULES CULTIVADES EN MONOCAPA .....	101
<b>FIGURA R9.</b> LES CÈL·LULES DE <b>UM</b> PROVINENTS DE MELANOSFERES PRESENTEN UNA ALTA ACTIVITAT <b>ALDH</b> I SOBREEXPRESEN GENS DE LA FAMÍLIA DE TRANSPORTADORS <b>ATP-BINDING CASSETTE (ABC)</b> .....	102
<b>FIGURA R10.</b> LES MELANOSFERES DE <b>UM</b> ESTAN FORMADES PER UNA POBLACIÓ MIXTA AMB CARACTERÍSTIQUES MELANOCÍTIQUES I D'ESFEROIDES .....	104
<b>FIGURA R11.</b> LES CÈL·LULES DE <b>UM</b> CAPACES DE CRÉIXER EN ESFERES EXPRESSEN ALTS NIVELLS DE <b>FN-EDA</b> .....	105
<b>FIGURA R12.</b> LES POBLACIONS DE MELANOSFERES DE <b>UM</b> SOBREEXPRESEN ALGUNS <b>FT</b> RELACIONATS AMB LA <b>EMT</b> DETERMINANTS EN EL RISC DE RECAIGUDA .....	107
<b>FIGURA R13.</b> LES CÈL·LULES DE <b>UM</b> PROVINENTS DE CULTIUS <b>3D</b> TENEN UNA ALTA EXPRESSIÓ DELS GENS <b>FN1</b> I <b>SPARC</b> RELACIONATS AMB UN FENOTIP MIGRATORI I RISC DE RECAIGUDA EN CLÍNICA .....	108
<b>FIGURA R14.</b> EL TRACTAMENT AMB <b>TGF-β</b> INDUEIX LA FOSFORILACIÓ DE <b>SMAD3</b> .....	109
<b>FIGURA R15.</b> INDUCCIÓ DE L'EXPRESSIÓ DELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ IMPLICATS EN LA <b>EMT</b> EN LES CÈL·LULES DE <b>UM</b> PER <b>TGF-β</b> I <b>IGF-1</b> .....	110
<b>FIGURA R16.</b> EL <b>TGF-β</b> INDUEIX LA SOBREEXPRESSIÓ DE <b>FN</b> I <b>TWIST-1</b> EN EL <b>UM</b> .....	111
<b>FIGURA R17.</b> EL <b>TGF-β</b> INDUEIX L'EXPRESSIÓ DE GENS RELACIONATS AMB CARACTERÍSTIQUES PLURIPOTENCIALS ( <b>OCT-4</b> , <b>NANOG</b> , I <b>SOX2</b> ).....	112
<b>FIGURA R18.</b> EL TRACTAMENT AMB <b>TGF-β</b> INDUEIX LA SOBREEXPRESSIÓ DE <b>CXCR4</b> EN LES CÈL·LULES DE <b>UM</b> .....	113
<b>FIGURA R19.</b> LES CÈL·LULES PROCEDENTS DE MELANOSFERES DE <b>UM</b> EXPRESSEN <b>c-MET</b> , <b>CXCR4</b> I <b>IGFR-1β</b> .....	115
<b>FIGURA R20.</b> ELS PACIENTS DE <b>UM</b> AMB UNA ALTA EXPRESSIÓ DE <b>CXCR4</b> , <b>c-MET</b> I <b>IGFR1</b> PRESENTEN UN ELEVAT RISC DE RECAIGUDA.....	116
<b>FIGURA R21.</b> LES MELANOSFERES DE <b>UM</b> TENEN UNA CAPACITAT MIGRATÒRIA ESPECÍFICA VERS EL <b>MCF</b> .....	117
<b>FIGURA R22.</b> L' <b>HGF</b> I EL <b>SDF-1</b> NO INDUEIXEN LA MIGRACIÓ ESPECÍFICA DE LES MELANOSFERES DE <b>UM</b> .....	118

## TAULA DE CONTINGUTS

<b>FIGURA R23.</b> LES CÈL·LULES DE LES MELANOSFERES DE <b>UM</b> MIGREN ÚNICAMENT SOTA L'EFECTE DE COMPONENTS ESPECÍFICS DEL <b>MCF</b> .....	119
<b>FIGURA R24.</b> EL FACTOR DE CREIXEMENT <b>IGF-1</b> ES TROBA DIFERENCIALMENT PRESENT EN EL <b>MCF</b> EN COMPARACIÓ AMB EL <b>MCH</b> .....	120
<b>FIGURA R25.</b> EL TRACTAMENT AMB <b>IGF-1</b> CAUSA UNA RÀPIDA FOSFORILACIÓ DEL RECEPTOR <b>IGFR-1<math>\beta</math></b> DE LES CÈL·LULES DE <b>UM</b> .....	122
<b>FIGURA R26.</b> EL BLOQUEIG DEL RECEPTOR <b>IGFR-1<math>\beta</math></b> RESULTA EN UNA REDUCCIÓ SIGNIFICATIVA EN LA MIGRACIÓ DE LES MELANOSFERES .....	123
<b>FIGURA R27.</b> LES POBLACIONS DE MELANOSFERES ALLIBEREN GRAN QUANTITAT DE <b>MMP-2</b> A L'ESPAI EXTRACEL·LULAR.....	124
<b>FIGURA R28.</b> EL TRACTAMENT AMB INHIBIDORS DE PROTEÏNA QUINASES COMPROMET LA VIABILITAT CEL·LULAR IN VITRO DE LES CÈL·LULES DE <b>UM</b> .....	126
<b>FIGURA R29.</b> LES MELANOSFERES DE <b>UM</b> PRESENTEN MENOR SENSIBILITAT PELS INHIBIDORS DE <b>PKC</b> , <b>MEK</b> I <b>SRC</b> .....	129
<b>FIGURA R30.</b> L'INHIBIDOR DE <b>IGFR-1</b> <b>GSK705A</b> COMPROMET LA SUPERVIVÈNCIA DE LES CÈL·LULES DE <b>MEL270</b> I <b>OMM-2.5</b> .....	131
<b>FIGURA R31.</b> LA INHIBICIÓ DE <b>ERK</b> I DE <b>IGFR-1<math>\beta</math></b> COMPROMET LA SUPERVIVÈNCIA CEL·LULAR SENSE SOBREACTIVAR VIES DE SENYALITZACIÓ ALTERNATIVES .....	133
<b>FIGURA R32.</b> LES CÈL·LULES PROVINENTS DE METÀSTASIS HEPÀTIQUES I MELANOSFERES PRODUÏXEN UNA MAJOR QUANTITAT D'EXOSOMES IN VITRO .....	135
<b>FIGURA R33.</b> MÉS DEL 70% DE LES VESÍCULES OBTINGUDES PER ULTRACENTRIFUGACIÓ SÓN EXOSOMES .....	136
<b>FIGURA R34.</b> ELS EXOSOMES PROVINENTS DE LES MELANOSFERES CONTENEN ALTS NIVELLS D'ARNM DE <b>CD63</b> , <b>RAB27</b> I <b>CD44</b> .....	137
<b>FIGURA R35.</b> L'EXTRACTE PROTEIC OBTINGUT DE LES MICROVESÍCULES SECRETADES PER LES CÈL·LULES DE <b>UM</b> ESTÀ ENRIQUIT EN EXOSOMES.....	138
<b>FIGURA R36.</b> ELS EXOSOMES ALLIBERATS PER LES CÈL·LULES DE <b>UM</b> EXPRESSEN UN ALT CONTINGUT D'INTEGRINES .....	138
<b>FIGURA R37.</b> ELS EXOSOMES DE <b>UM</b> SÓN CAPTATS I INTERNALITZATS PER HEPATÒCITS IN VITRO .....	139
<b>FIGURA D1.</b> MODEL DE <b>CSC</b> DE <b>UM</b> SEGONS EL SEU TROPISME PEL FETGE .....	151
<b>FIGURA D2.</b> MODEL HIPOTÈTIC DE METÀSTASI EN EL <b>UM</b> DEPENDENT DE LA INTERACCIÓ DE <b>IGF-1</b> AMB LES <b>CSC</b> .....	153

# TAULA DE TAULES

<b><u>TAULA I1.</u></b> ESTUDIS EN CURS EN EL DESENVOLUPAMENT DE NOUS FÀRMACS CONTRA EL <b>UM</b> .....	44
<b><u>TAULA M1.</u></b> LÍNIES CEL·LULARS DE MELANOMA UVEAL .....	57
<b><u>TAULA M2.</u></b> PLASMIDIS UTILITZATS PER A LES TRANSFECCIONS .....	70
<b><u>TAULA M3.</u></b> ENCEBADORS (EN ANGLÈS, PRIMERS) UTILITZATS EN LA QPCR .....	74
<b><u>TAULA M4.</u></b> COMPOSICIÓ DEL TAMPÓ DE LISI RIPA .....	76
<b><u>TAULA M5.</u></b> ANTICOSSOS UTILITZATS PER A LA TÈCNICA WESTERN BLOT .....	79
<b><u>TAULA M6.</u></b> ANTICOSSOS UTILITZATS PER IMMUNOFLUORESCÈNCIA .....	81
<b><u>TAULA R1.</u></b> TEMPS DE GENERACIÓ DE LES LÍNIES DE <b>UM</b> .....	88
<b><u>TAULA R2.</u></b> INCREMENT EN LES MELANOSFERES DE L'EXPRESSION DE MARCADORS ASSOCIATS A PLURIPOTÈNCIA .....	98
<b><u>TAULA R3.</u></b> INCREMENT DE L'EXPRESSION DE FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ RELACIONATS AMB LA PLURIPOTÈNCIA CEL·LULAR EN LES MELANOSFERES .....	101
<b><u>TAULA R4.</u></b> IC50 DELS INHIBIDORS EN LES CÈL·LULES DE <b>UM</b> .....	130



# INTRODUCCIÓ

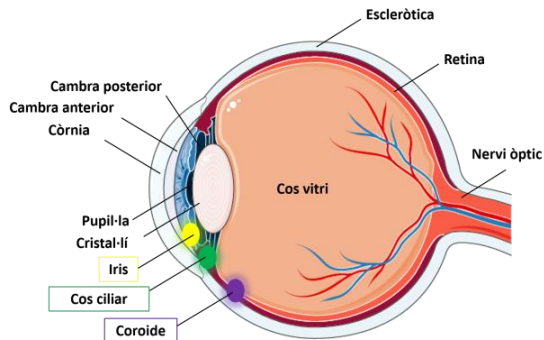
**Bases Moleculares i Estratègies Terapèutiques contra les Metàstasis  
del Melanoma Uveal**





## 1 MELANOMA UVEAL

El melanoma uveal (UM) és un tumor maligne derivat dels melanòcits del tracte uveal, l'origen embrionari dels quals és la cresta neural. La incidència del UM és de 0,6 per 100.000 individus i representa un 80% de tots els tumors oculars en adults <sup>1</sup>. El UM és el resultat d'una proliferació clonal i descontrolada dels melanòcits no epitelials que resideixen en el tracte uveal, majoritàriament els de coroides i en menor proporció de l'iris o del cos ciliar (**Figura I1**), que després de patir una transformació oncogènica adquireixen la capacitat d'envair els teixits circumdants i fins i tot disseminar a distància <sup>2-4</sup>. Es tracta d'una malaltia amb un alt potencial metastàtic, ja que almenys el 40% dels pacients desenvolupen metàstasis, majoritàriament hepàtiques, que acaben amb la seva mort, situació que no ha canviat en els últims anys. Aquestes metàstasis a més, són resistents als tractaments convencionals com la quimioteràpia <sup>5,6</sup>. És per això que la detecció precoç i el ràpid tractament local són crucials <sup>7</sup>. Estudis recents que integren la biopatologia d'aquests tumors amb les alteracions genètiques i cromosòmiques, els perfils d'expressió gènica o les vies de senyalització i la clínica dels malalts permeten l'estratificació dels UM en grups amb diferent risc de desenvolupar metàstasi. Així, permeten establir un pronòstic individualitzat per a cada pacient, per tal d'aplicar les teràpies adients segons el risc de metàstasi.



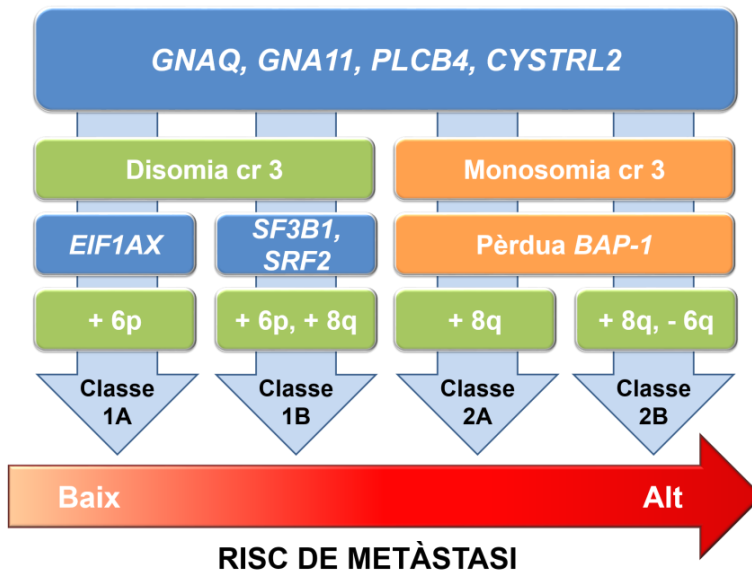
**Figura I1. Anatomia del melanoma uveal.** Tall transversal on s'observa l'anatomia ocular amb tres possibles focus de creixement tumoral. En groc, l'iris, en verd, el cos ciliar i en lila, la coroides.

## **2 ALTERACIONS MOLECULARS** **ASSOCIADES AL RISC DE METÀSTASI**

En el UM la freqüència de mutacions en oncogens i gens supressors de tumors, la densitat mitjana de mutacions somàtiques (1.1 per Mb), el grau d'aneuploïdia, i la inestabilitat genòmica, són molt inferiors en comparació amb altres tumors <sup>8,9</sup>. Les alteracions genètiques i cromosòmiques dels UM són singulars respecte a altres tumors i actualment es coneixen tant aquelles que juguen un paper rellevant en estadis primerencs de la transformació oncogènica com les que tenen lloc durant la progressió cap a l'adquisició de la capacitat metastàtica <sup>3,4</sup>. Els pronòstics prèviament establerts en base a la patobiologia dels UM <sup>10</sup> han estat superats pels estudis de Robertson i col·laboradors <sup>11</sup> que permeten l'estratificació dels UM en quatre subtipus amb diferent risc metastàtic segons el conjunt d'alteracions moleculars que presentin.

En el procés de transformació dels melanòcits uveals les mutacions en els receptors transmembrana lligats a proteïnes G (GPCR: en anglès, *G protein-coupled receptors*) com GNAQ, GNA11 o CYSLTR2 (en anglès, *Cysteinyl Leukotriene Receptor 2*) i PLC-β4 (*Phospholipasa C-beta-4*) són esdeveniments primerencs i estan considerades com "driver Mutations" de la tumorogènesi. Les mutacions més freqüents ocorren en els gens *GNAQ* i *GNA11*, que codifiquen les subunitats Gα de les proteïnes G i estan presents en lesions premalignes, com els nevus coroidals, i en el 83-92% dels UM primaris i metastàtics <sup>12,13</sup>. Les dues mutacions són mútuament excloents i consisteixen en la substitució de l'aminoàcid Gln209 o, en menor freqüència, del Arg183 que són imprescindibles per a la GTPasa, la qual en condicions normals s'encarrega d'inactivar la subunitat Gα. Com a resultat, hi ha una activació constitutiva de les subunitats Gα<sub>q/11</sub> amb propietats pro-oncogèniques. Tot i això, aquesta activació és encara insuficient per a l'adquisició de la capacitat metastàtica, indicant que per això són necessàries determinades mutacions en altres gens i diverses

aberracions cromosòmiques <sup>8</sup>. Aquestes mutacions ocorren en els gens *SF3B1*, *EIF1AX*, *BAP1*, *SRSF2* i *MAPKAPK5* i són també mútuament excloents. D'altra banda, les aberracions cromosòmiques recurrents en aquests tumors són les pèrdues dels cromosomes 3, 1p, 6q, 8p i 16q i l'amplificació dels braços cromosòmics 6p i 8q, que contribueixen amb major o menor grau a la seva progressió <sup>4,11,14</sup>. Així, s'han pogut estratificar els pacients segons les alteracions genètiques dels tumors, en base al risc de desenvolupar metàstasi <sup>11</sup> (**Figura I2**).



**Figura I2. Adquisició d'alteracions genètiques en la progressió del melanoma uveal.** L'adquisició seqüencial de canvis genètics resulta en diferents perfil genètics (fletxes verticals blaves) que es corresponen a un risc de desenvolupar metàstasi diferent en el melanoma uveal (fletxa horitzontal vermella). (Adaptat de Robertson i cols. Cancer Cell, 2017; Park i cols. Pigment Cell Melanoma Research, 2018)

## 2.1 MONOSOMIA DEL CROMOSOMA 3

La pèrdua d'una còpia del cromosoma 3 ocorre en aproximadament la meitat dels UM i és el factor de mal pronòstic per excel·lència en aquest càncer (Classe 2A).

## INTRODUCCIÓ

### 2.1.1 MUTACIONS DE BAP-1

Quan a aquesta monosomia del cromosoma 3 s'hi afegeix l'adquisició de mutacions en el gen supressor de tumors *BAP-1* (*BRCA1 associated protein-1*), que precisament es troba a la regió 3p21.1, es compleixen els requisits del model "two-hit" (inactivació d'un dels dos al·lels seguit d'una mutació en l'altre) establert per a gens recessius. Aquesta concurrència de les dues alteracions té lloc gairebé exclusivament en els tumors metastàtics<sup>8</sup>. *BAP-1* codifica una ubiquitina hidrolasa nuclear amb múltiples substrats nuclears i citoplasmàtics (com *BRCA1-associated RING domain protein-1* (*BARD1*), histona H2A i factors de transcripció com Yin-Yang1 i IP3R3) implicats en la reparació de l'ADN, la transcripció, l'estructura de la cromatina, la diferenciació i la mort cel·lular. Precisament com a conseqüència del seu paper en la reparació de l'ADN, la pèrdua d'expressió/funció de *BAP-1* afavoreix l'adquisició de noves aberracions citogenètiques com els guanys de 8q23-24→qter ( presents en el 40% dels tumors) o la formació d'un isocromosoma<sup>8</sup>. Així mateix, s'associa amb amplificacions dels oncogens *MYC* i *ASAP1* (aquest últim codifica un factor d'activació de la GTPasa) que es troben a la regió 8q24<sup>8</sup>. En conjunt, els UM amb monosomia del cromosoma 3, alteracions en *BAP-1* i guanys de 8q mostren un patró específic de metilació i s'associen robustament al desenvolupament de metastasi, conferint per tant, el pitjor dels pronòstics per als pacients (Classe 2B)<sup>11</sup>.

## 2.2 DISOMIA DEL CROMOSOMA 3

Els pacients amb tumors primaris de melanoma uveal que no presenten pèrdua del cromosoma 3 tenen una menor probabilitat de desenvolupar metastasi, en comparació amb els anteriors. Són freqüents els guanys a la regió 6pter→6p21 que conté el gen *CNKSR3* (en anglès, *Membrane-associated guanylate kinase-interacting protein-like 1*, relacionat amb els canals de sodi) la qual cosa es correlaciona amb una evolució clínica favorable lliure de malaltia metastàtica. Aquests tumors es denominen de "Classe 1" i al seu torn

inclouen dos subgrups amb diferents perfils de metilació però que comparteixen les mutacions en *GNAQ/11* i l'absència d'alteracions en *BAP-1*<sup>11</sup>.

### 2.2.1 MUTACIONS DE *EIF1AX*

Els tumors que presenten mutacions en els exons 1 i 2 del gen *EIF1AX* (en anglès, *Eucaryotic Intitiation Factor 1A*) representen un 18% dels UM. *EIF1AX*, lligat al cromosoma X, està involucrat en la iniciació de la traducció de proteïnes i com a conseqüència d'aquestes mutacions poden aparèixer canvis en la regulació de la traducció proteica i en determinats ARNm<sup>15</sup>. En els UM, les mutacions en *EIF1AX* mai ocorren amb pèrdues del cromosoma 3 i guanys en el 8q, de manera que els pacients d'aquest subgrup tenen bona supervivència lliure de malaltia metastàtica (Classe 1A)<sup>11</sup>.

### 2.2.2 MUTACIONS DE *SF3B1*

Els tumors de classe 1B tenen mutacions en gens d'*splicing* encarregats del processament dels ARNm precursors a transcrits madurs, com són *SF3B1* i *SRSF2* (en anglès, *Splicing factor 3b Subunit 1* i *serine Arginina-Rich Splicing Factor 2*, respectivament). Aquestes mutacions són mútuament excloents respecte a les del gen *EIF1AX*. A diferència dels tumors de Classe 1A, alguns dels pacients amb mutacions en *SF3B1* poden desenvolupar metàstasis tardanes per una via alternativa a la que ho fan els de classe 2 amb alteracions en *BAP-1*. Les mutacions en *SF3B1* es detecten en el 15% dels UM i són mutacions sense sentit que afecten els residus K666/R625 provocant la inclusió o exclusió d'exons alternatius o la retenció d'introns de gens codificants com *ABCC5* (implicat en la resistència a fàrmacs), la metal·loproteïnasa ADAM12, el Factor VIII de coagulació o el GAS8 (en anglès, *Growth Arrest-specific 8*)<sup>11,16</sup>.

### 2.2.3 SOBREEXPRESSIÓ DE *PRAME*

*PRAME* (en anglès, *Preferentially Expressed Antigen in Melanoma*) va ser descobert inicialment com un antigen tumoral associat a la

## INTRODUCCIÓ

progressió del melanoma cutani. En UM de classe 1, la sobreexpressió de *PRAME* és un factor pronòstic independent de metàstasi <sup>17</sup>. Aquest antigen no s'expressa en la majoria de cèl·lules i teixits a excepció dels testicles. No obstant això, s'expressa en alguns tipus de tumors a conseqüència de l'hipometilació de les regions del seu promotor, i en el cas del UM, la seva expressió s'associa directament a mutacions en *SF3B1* i inversament a les d'*EIF1AX*. La majoria de melanomes de Classe 2 també sobreexpressen *PRAME* la qual cosa es correlaciona amb el diàmetre del tumor i prediu el desenvolupament de metàstasis a curt termini i la mortalitat per aquesta causa <sup>18</sup>. Els treballs recents de Field i col·laboradors indiquen que l'expressió de *PRAME* indueix una via de progressió alternativa per a l'adquisició de la capacitat metastàtica en els tumors de Classe 1 gràcies a la seva interacció directa o indirecta, amb promotors de gens implicats en la inestabilitat cromosòmica (a través dels elements NFY o el receptor de l'àcid retinoic). D'aquesta manera, *PRAME* induiria un mecanisme "feed-forward" (reforç mutu) amb un increment progressiu de la seva expressió i de guanys cromosòmics, afavorint la progressió metastàtica.

### **3 EXPRESSIÓ GÈNICA ASSOCIADA AL RISC DE METÀSTASI**

#### **3.1 PERFILS D'EXPRESSIÓ GÈNICA**

En els últims anys, diversos estudis d'expressió gènica (GEP: en anglès, *Gene Expression Profiling*) en melanomes uveals i línies cel·lulars han permès identificar dos perfils ben definits i més robustos en quant a pronòstic que no pas la detecció de la monosomia 3, l'anàlisi de mutacions o el diàmetre tumoral. Els tumors amb un GEP-classe 1 presenten un baix risc de metàstasi i expressen normalment els gens específics de diferenciació melanocítica (*MITF*, *TYR*, *DCT* i *TRPM1*). Els tumors GEP-classe 2, en canvi, estan relacionats amb mal pronòstic i presenten una baixa expressió dels gens melanocítics i un transcriptoma semblant al de les cèl·lules primitives de la cresta neural, amb un fenotip desdiferenciat del tipus *stem cell-like* <sup>19,20</sup>. Addicionalment, un estudi integratiu actual de la base de dades del TCGA confirma el perfil transcripcional específic establert per als 2 grups i els divideix cadascun en 2 subgrups, segons el nivell d'expressió de diferents gens relacionats amb EMT, diferenciació i proliferació. Aquest i altres estudis destaquen el paper dels ARN de gens no codificants com a indicadors de pronòstic en el UM <sup>11,21</sup>.

##### **3.1.1 MICRO ARNS**

A diferència dels esdeveniments genètics que tenen lloc en el UM, els quals estan molt ben definits actualment, els canvis epigenètics produïts durant la seva progressió segueixen sent poc coneguts <sup>21</sup>. Un dels mecanismes epigenètics més importants el duen a terme els microARNs, que són ARNs no codificants d'entre 17 i 22 nucleòtids que s'uneixen a la regió 3'UTR (3' *untranslated region*) de determinats ARNs degradant-los, inhibint la seva traducció i funcionalitat. És per això, que són considerats importants reguladors negatius de l'expressió gènica i en el UM, la seva expressió diferencial s'associa al



## INTRODUCCIÓ

pronòstic i risc metastàtic <sup>21,22</sup>. En aquest sentit, els UM de la Classe 2, amb un alt risc de desenvolupar metàstasi, mostren una expressió reduïda de miR-34a/b/c, miR-137 i miR-199, els quals interaccionen de manera directa amb AKT, c-MET i MITF, tots ells gens relacionats amb proliferació cel·lular i migració <sup>21,23</sup>. Alhora, aquests tumors mostren una elevada expressió de miR-134 i -149, micro ARNs amb dianes involucrades en la invasió i la progressió cel·lular, com són GSK-3 $\alpha$  i VEGFA, respectivament <sup>21</sup>. Dins dels tumors de classe 2, els de tipus 2A mostren nivells més alts de miR-199a/b i let7b, mentre que els de tipus 2B sobreexpressen els oncomiRs -142, -150, -21, -92b, -146b i -155 <sup>11</sup>. Donat que aquests micro ARNs es troben a l'espai extracel·lular, la seva quantificació -no només en el tumor sinó també en el plasma- s'ha postulat com un indicador fiable de pronòstic en el UM <sup>24</sup>.

### 3.1.2 METILACIÓ DE L'ADN

La metilació de l'ADN és un altre mecanisme epigenètic important en la tumorigènesi. Malgrat haver-hi pocs estudis sobre els canvis epigenètics en el UM, es creu que la metilació anòmala dels promotors de gens involucrats en la supressió tumoral podria induir el mecanisme de "two hit" necessari per causar la progressió tumoral <sup>25</sup>. El perfil de metilació de varis gens divergeix en els UM amb progressió metastàtica en comparació amb els tumors primaris. El gen supressor tumoral p16<sup>INK4a</sup>, que actua com a inhibidor del complex Ciclina D/CDK-4 o 6 causant una aturada del cicle cel·lular en l'estadi G<sub>1</sub>, es troba freqüentment hipermetilat en el UM. D'aquesta manera, malgrat no presentar mutacions com en el cas del melanoma cutani, aquest gen es manté inactiu <sup>21</sup>. Un altre supressor tumoral com és *RASSF1A*, amb un mecanisme d'acció similar a l'anterior, es troba també hipermetilat en els UM que desenvolupen metàstasi <sup>26</sup>. L'hipermetilació del gen *RASEF* que codifica per un motiu de la proteïna RasGTPasa, involucrada en el creixement del UM, també s'ha relacionat amb una baixa supervivència i amb els tumors de classe 2

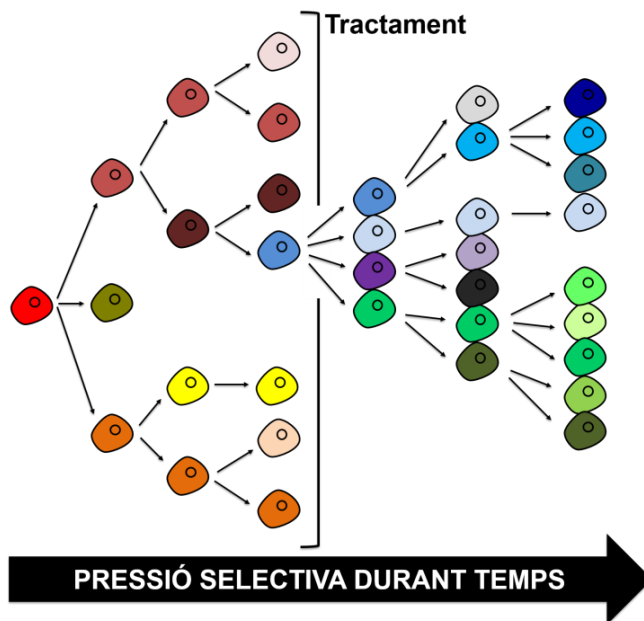
<sup>26</sup>. Per contra, tot i la menor freqüència d'hipometilació de l'ADN en el UM, un estudi de Field i col·laboradors ha correlacionat la baixa expressió del gen relacionat amb metàstasis tardanes dels UM de classe 1B *PRAME* amb la no-metilació del seu promotor <sup>18</sup>. Finalment, la baixa metilació del gen *RAB31*, també relacionat amb la família de l'oncogen *Ras*, ha esdevingut un clar indicador de supervivència final en el UM, ja que correlaciona els baixos nivells de metilació del seu promotor amb un mal pronòstic <sup>27</sup>.

Tot plegat suggereix que els canvis d'expressió gènica de gens relacionats amb la diferenciació cel·lular i el cicle cel·lular, faciliten al UM progressar fins a estadis metastàtics sense la necessitat d'adquirir nous canvis citogenètics.

### **4 HETEROGENEÏTAT TUMORAL**

La coexistència de cèl·lules canceroses amb característiques moleculars diferents en un mateix tumor es coneix com a heterogeneïtat intratumoral (o heterogeneïtat intercel·lular). A més a més, existeix l'heterogeneïtat intertumoral, que és la variabilitat observada entre tumors del mateix origen en un pacient. Finalment, la heterogeneïtat interpacient és aquella que hi ha entre els tumors de diferents pacients <sup>28</sup>. Existeix abundant evidència científica que demostra que aquesta heterogeneïtat genètica és un efecte directe de l'elevada inestabilitat genètica observada en els tumors, i és necessària per a la seva progressió <sup>29</sup>. El primer estudi que suggeria que les diferents capes de l'epidermis les comprenien cèl·lules amb un mateix origen però capacitat proliferativa diferent va ser el realitzat per Barrandon i els seus col·legues al 1987 <sup>30</sup>. El concepte demostrat per aquest estudi, juntament amb d'altres, va servir per crear posteriorment un model de desenvolupament tumoral en el qual podem incloure-hi el UM. Segons el model de l'expansió clonal, el qual comprèn la gran majoria de càncers <sup>31</sup>, un tumor està format per un conjunt de cèl·lules diferents. Aquestes, malgrat provenir d'una mateixa cèl·lula, presenten una alta inestabilitat genòmica i diferent grau de diferenciació, fet que resulta en una elevada heterogeneïtat tumoral. Així, quan aquest tumor arriba a ser suficientment gran per a ser detectat conté una gran diversitat cel·lular. Algunes de les cèl·lules tumorals tenen la capacitat d'autorenovar-se per un temps prolongat i mantenir un fenotip totalment indiferenciat. D'altres en canvi, tenen un potencial proliferatiu més limitat i només poden dividir-se donant lloc a uns subtipus cel·lulars determinats. Finalment, altres cèl·lules poden presentar fenotips cel·lulars totalment diferenciats amb un potencial replicatiu encara més limitat <sup>31,32</sup>. Aquesta variabilitat intratumoral es tradueix en una contínua selecció dels clons amb més avantatges per adaptar-se i sobreviure als canvis constants produïts en el microambient tumoral <sup>33</sup> (Figura I3).

Concretament, el melanoma cutani conté diferents poblacions cel·lulars perfectament descrites que coexisteixen en el nevus tumoral. Alguns dels melanòcits tumorals expressen un perfil transcripcional similar al de les cèl·lules de la cresta neural i sobreexpressen gens relacionats amb proliferació cel·lular i melanòcits (*SOX10<sup>high</sup>*, *PAX3<sup>high</sup>* i *MITF<sup>high</sup>*). D'altra banda, altres cèl·lules mostren un fenotip invasiu que respon a TGF- $\beta$  i amb expressen alts nivells d'AXL <sup>28</sup>. Tot i que el melanoma uveal no és un tipus de càncer amb alta presència de mutacions cel·lulars, com ho ocorre en el cutani, l'heterogeneïtat tumoral ha estat igualment observada en els tumors i les línies cel·lulars de UM <sup>26,34</sup>.



**Figura 13. Evolució de l'heterogeneïtat tumoral durant la progressió tumoral i el tractament.** Les mutacions adquirides en les cèl·lules tumorals capaces d'autorenovar-se resulten en la formació de diversos clons en el tumor (cada color diferent representa un clon diferent). Al cap d'un temps, els clons amb gran capacitat proliferativa s'expressen de forma majoritària en el tumor (taronja i vermell). Després del tractament però, es produeix una pressió selectiva pels clons capaços de sobreviure a la teràpia (blau) i quan aquests proliferen i adquireixen noves alteracions genètiques desenvolupen una nova massa tumoral heterogènia. (Adaptat de Gerlinger i Swanton. British Journal of Cancer, 2010).

## INTRODUCCIÓ

Actualment, diferents estudis realitzats en UM afirmen que tot i que l'anàlisi citogenètica ha estat útil en els últims anys per classificar els tumors segons el seu pronòstic, s'ha de tenir en compte que aquests marcadors es troben distribuïts de manera heterogènia en el tumor, i que, per tant, poden donar falsos resultats degut a l'alta variabilitat intratumoral <sup>28</sup>. El perfil d'expressió gènica, per contra, és una representació global de totes les poblacions cel·lulars convivint en el tumor. Entre els tumors de UM de pitjor pronòstic (classe 2) per exemple, s'observa una diferència significativa en el percentatge de cèl·lules tumorals portadores d'alguna alteració gènica. Així, mentre els tumors de classe 2A presenten una població tumoral més homogènia, fins a un 70% de les cèl·lules dels tumors tipus 2B presenten algun tipus de mutació <sup>35</sup>. És per això que en els últims anys, l'anàlisi d'un perfil gènic determinat ha emergit com una millor eina per avaluar el pronòstic en el UM .

### **4.1 CÈL·LULES MARE TUMORALS (CSC)**

La similitud entre el procés d'homeòstasi i el càncer suggereix que és necessària l'existència d'una població tumoral amb característiques de cèl·lules mare (CSC, en anglès, *Cancer Stem Cells*) que s'encarregui de mantenir el creixement prolongat del tumor <sup>34</sup>. Malgrat la manca d'experiments concloents que demostrin que aquestes cèl·lules són les úniques responsables de la iniciació i desenvolupament del tumor, les seves característiques fenotípiques suggereixen que juguen un paper molt important en la progressió tumoral <sup>33</sup>. Les CSC són pluripotents, pateixen divisions cel·lulars asimètriques i per tant, són capaces de renovar-se elles mateixes <sup>34,36</sup>. A més, tenen la capacitat de transitar entre un estat de cèl·lules mare i "no-mare" segons les senyals rebudes del microambient <sup>37</sup>. Així, contribueixen a mantenir l'heterogeneïtat tumoral i la resistència contra les teràpies convencionals, i es creuen les responsables de la recurrència tumoral <sup>38,39</sup>. Tot i que la importància de les CSC en el desenvolupament dels tumors sòlids està constatada des de fa temps, en els tumors amb un patró de regulació diferent al dels carcinomes més habituals, com és

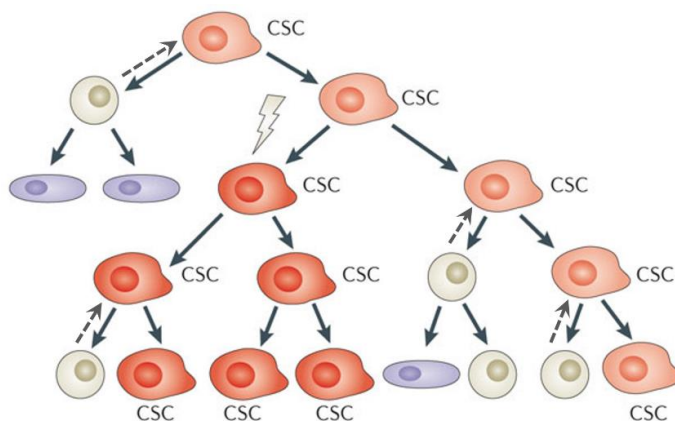
el cas dels melanomes, glioblastomes i leucèmies, la seva funcionalitat ha estat objecte de debat en els últims anys <sup>39</sup>. Recentment però, la determinació d'un fenotip cel·lular propi de les CSC en el melanoma i la seva correlació amb la progressió i el desenvolupament de metàstasis han permès incloure també aquest tipus de càncer en aquesta teoria, malgrat presentar una elevada heterogeneïtat <sup>40,41</sup>.

#### 4.1.1 PLASTICITAT TUMORAL DE LES CSC

Anys enrere s'havien postulat dos models de tumorigènesi que explicaven l'heterogeneïtat i desenvolupament dels tumors a partir de la presència de CSC en el seu nínxol primari. Segons el model jeràrquic, les CSC són un tipus cel·lular diferent que les cèl·lules tumorals, i el desenvolupament de la malaltia comença quan una de les cèl·lules mare del nostre organisme escapa la regulació gènica i es transforma en CSC. Gràcies a les seves capacitats d'autorenovació ella sola és capaç de desenvolupar un tumor. En aquest model la heterogeneïtat tumoral s'explicaria a partir de diferents mutacions en les cèl·lules mare que donen lloc a diferents cèl·lules tumorals que engloben el tumor <sup>42</sup>. El model estocàstic, en canvi, postula que qualsevol de les cèl·lules d'un tumor és capaç de transformar-se en una cèl·lula iniciadora i causar la progressió tumoral. En aquest model hi juga un paper molt important el microambient i els factors que s'hi alliberen, ja que serien els responsables de transformar una cel·lular tumoral adulta en una CSC <sup>43</sup>. Aquests conceptes van permetre el desenvolupament d'un model alternatiu on hi juga un paper clau el concepte de plasticitat cel·lular i la possibilitat d'adquirir un fenotip invasiu i un de proliferatiu de manera reversible <sup>39</sup>. La plasticitat cel·lular és l'habilitat de les cèl·lules d'un teixit adult de diferenciar-se o desdiferenciar-se fins a adquirir un nou fenotip i característiques funcionals diferents. Aquest procés és comú en el teixit normal quan les cèl·lules es diferencien gradualment perdent el seu potencial pluripotent fins a arribar a un fenotip totalment diferenciat amb una funció determinada. En el càncer però, aquest procés es pot donar en ambdues direccions depenent de les senyals rebudes del

## INTRODUCCIÓ

microambient, i és el que manté l'equilibri necessari entre les CSC i les no-CSC per al desenvolupament tumoral <sup>37,44</sup> (Figura I4).



**Figura I4. Evolució tumoral clonal a partir de les CSC.** Les CSC (vermell) són les úniques cèl·lules del tumor amb capacitat de dividir-se i mantenir un fenotip indiferenciat. Quan una no-CSC (blanc) es divideix, es diferencia completament (blau) i perd l'habilitat d'autorenovar-se. Quan una CSC pateix una mutació s'adquireix un nou origen clonal que permet la proliferació variada del tumor. Algunes cèl·lules no-CSC (blanc) en determinades condicions poden retornar al seu fenotip CSC gràcies a la seva plasticitat cel·lular i contribuir al desenvolupament tumoral (Modificada de Beck & Blanpain. *Nature Reviews of Cancer*, 2013). CSC: Cancer Stem Cell.

Les característiques de CSC es poden adoptar a través de mutacions en proteïnes reguladores de la progressió del cycle cel·lular, com p53 i hTERT. Alhora, les senyals intercanviades amb el micrambient poden participar també en aquesta plasticitat cel·lular alterant l'epigenoma i modificant la seva capacitat de *stemness* a través de les vies moleculars de NOTCH i Wnt, les principals responsables del manteniment de l'autorenovació i indiferenciació de les cèl·lules mare <sup>39</sup>. Els fibroblasts associats al tumor (CAFs) alliberen grans quantitats de CXCL12, VEGF, PDGF i HGF que faciliten la invasió i estimulen la senyalització canònica de les vies de Wnt i NOTCH <sup>39</sup>. Paral·lelament, les cèl·lules mesenquimals localitzades en l'estroma tumoral alliberen les citoquines CXCL12, IL-6 i IL-8 que activen la via de NFκβ potenciant la presència del fenotip CSC <sup>39</sup>. La inflamació crònica,

característica essencial de l'ambient tumoral <sup>29</sup>, també regula la plasticitat cel·lular a través dels factors alliberats pels TAMs, TANs i les MDSCs reclutats a l'ambient tumoral. Tots ells alliberen grans quantitats de TGF- $\beta$ , IL-6 i TNF, que participen activament en l'expressió de gens de pluripotència i EMT <sup>39</sup>. Finalment, les pròpies CSC i no-CSC secreten factors en el microambient que participen en la regulació d'ambdós fenotips i controlen la plasticitat. Els més comuns són HIF-1, VEGF i MMPs, que a més de facilitar la vascularització, migració i disseminació cel·lular, també regulen les vies de senyalització de Wnt i NOTCH <sup>39</sup>.

En conclusió, el microambient tumoral és essencial per a mantenir l'equilibri entre les CSC i les no-CSC necessari per a la progressió tumoral, ja que a partir de la secreció de diferents factors a aquests microambient i gràcies a la plasticitat cel·lular observada en el tumor, es pot modificar la quantitat de cèl·lules responsables del creixement, migració i supervivència tumoral.

#### 4.1.2 CSC EN EL MELANOMA UVEAL

Els marcadors de CSC dels diferents tumors no es determinen a partir d'un extens coneixement de la seva biologia molecular sinó que es descriuen a partir de la seva expressió en les cèl·lules mare embrionàries. És per això, que no existeix un sol marcador que determini l'existència d'una població CSC en el melanoma sinó que és l'expressió conjunta de diferents marcadors d'*stemness* el que diferencia aquesta població cel·lular de la resta <sup>45</sup>. Alguns dels marcadors característics de les CSC, com CD133, CD15, CD44, SOX-2, OCT-3/4, Nanog, Nestin, ABCG5 i ABCB2 han estat trobats en els tumors i les línies cel·lulars derivades de UM <sup>34,46,47</sup>. El CD133 codificat pel gen *Prominina-1* és una glicoproteïna transmembrana expressada en les cèl·lules mare hematopoiètiques, els progenitors endotelials i les cèl·lules mare de la dermis. S'utilitza com a marcador d'una població cel·lular capaç d'iniciar el desenvolupament tumoral des d'un nombre molt reduït de cèl·lules <sup>48</sup>. En l'ull, la presència d'aquest



## INTRODUCCIÓ

marcador està relacionat amb tumors oculars, el procés de neovascularització i la malaltia de Von Hippel-Lindau <sup>47</sup>. A més, la seva expressió en altres càncers ha estat relacionada amb un major risc de metastasi pel seu paper en l'auto-regeneració, migració i angiogènesis <sup>49</sup>. El CD15 o SSEA1 (en anglès, *Stage-specific embryonic antigen 1*) és un marcador de superfície amb un grup carbohidrat característic de les cèl·lules mare neuronals involucrat en la proliferació cel·lular i el manteniment d'un fenotip indiferenciat, que s'utilitza com a marcador de CSC en tumors cerebrals. De fet, la capacitat d'aquestes cèl·lules de créixer en cultius formant neuroesferes és significativament major respecte al potencial observat en la resta de cèl·lules tumorals <sup>50</sup>. El CD44 és una altra glicoproteïna extracel·lular, codificada per un gen format per 19 exons, que pot presentar diverses isoformes i que és activada per l'àcid hialurònic, un lligand altament expressat en la ECM tumoral. Quan aquest receptor s'activa, indueix la proliferació cel·lular, una major supervivència i canvis en el citoesquelet que faciliten la motilitat cel·lular <sup>51</sup>. Així, els alts nivells d'expressió d'aquest receptor combinats amb l'alta expressió d'ALDH1 són propis de la població CSC del melanoma cutani <sup>52</sup>. Els factors de transcripció nuclears SOX2, OCT-3, OCT-4 i Nanog s'expressen en una gran varietat de cèl·lules mare i es troben genèticament amplificats en diversos càncers entre els quals hi ha el melanoma. A més, un estudi de Yu i col·laboradors va demostrar que l'expressió d'aquests factors en cèl·lules somàtiques que no els expressaven originalment induïa una pluripotència cel·lular pròpia de les cèl·lules mare. És per això que la seva expressió diferencial en tumors és indicativa de mal pronòstic <sup>53-55</sup>. Nestin és una proteïna citoplasmàtica pròpia de les cèl·lules mare neuronals que reorganitza la vimentina i altres proteïnes de la família de proteïnes IF tipus IV durant la mitosis per facilitar la divisió cel·lular. Per aquest motiu la seva expressió està relacionada amb un mal pronòstic en alguns tipus de càncer com en el cas del melanoma cutani <sup>46</sup>. Finalment, els transportadors de membrana de la família ABC com *ABCG2* i *ABCB5* es troben altament expressats en la

membrana de les CSC, facilitant l'eliminació d'elements tòxics de l'interior cel·lular i el canvi metabòlic glicolític típic de les cèl·lules tumorals <sup>56</sup>.

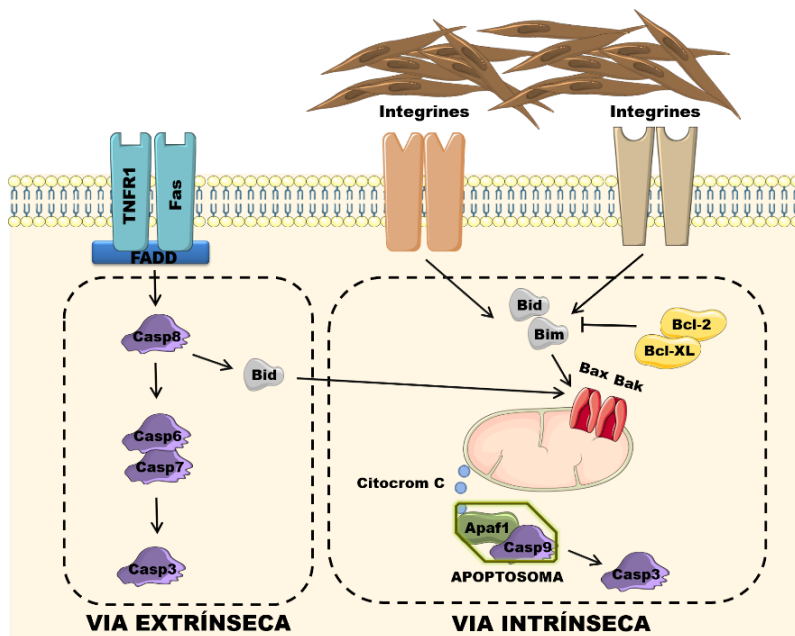
Les característiques úniques de les CSC els permeten no només adoptar una capacitat regenerativa i de diferenciació absoluta sinó també sobreviure en circulació i els confereix una elevada resistència intrínseca a les teràpies convencionals utilitzades contra el UM com la radioteràpia i quimioteràpia <sup>38</sup>. D'aquesta manera, tot i que no existeixen estudis que demostrin l'eficàcia terapèutica de tractar aquesta població cel·lular en el UM, la seva presència i correlació amb la supervivència final suggereix que la seva inhibició podria ser una bona estratègia terapèutica.

# **5 MECANISMES MOLECULARS I CEL·LULARS DE LA DISSEMINACIÓ METASTÀTICA**

El control del tumor primari en el UM és excel·lent, ja que en gairebé tots els casos el pacient es recupera satisfactòriament. D'altra banda, quan el tumor desenvolupa metàstasi (gairebé un 50% dels casos) la supervivència final disminueix dràsticament, amb unes teràpies que no han millorat la seva eficiència en els últims anys <sup>57</sup>. El procés metastàtic consisteix en la disseminació de les cèl·lules des d'un tumor primari localitzat fins a òrgans distants <sup>58</sup>. Els melanòcits originaris del UM són similars als del melanoma cutani (CM) en quan a l'expressió de certs marcadors de la cresta neural i l'alta resistència a fàrmacs, però la seva disseminació és totalment diferent a la observada en el CM. Mentre que la disseminació metastàtica en el CM es dona principalment a través dels vasos limfàtics, en el UM la localització anatòmica del tumor primari fa impossible aquest esdeveniment. La falta de vasos limfàtics a l'ull i l'alta irrigació d'aquest òrgan obliga a aquestes cèl·lules a migrar a través del torrent sanguini en el que es coneix com a disseminació hematògena <sup>8</sup>. Per tal de sobreviure en circulació les cèl·lules han de presentar resistència a la mort cel·lular causada per la manca d'ancoratge, coneguda com a anoikis <sup>59</sup>. Aquest tipus de programa cel·lular és un mecanisme intrínsec que s'activa quan les cèl·lules es desenganxen de la matriu extracel·lular del teixit on creixen per tal d'evitar que les cèl·lules migrin i colonitzin òrgans distants on proliferin de forma anòmala. En condicions d'homeòstasi, quan aquestes cèl·lules desenganxen les seves integrines de la ECM s'activa una cascada de senyalització a través de les proteïnes Bid i Bim (de la família de les BH3-only) que indueixen la translocació de Bax i Bak des de l'interior del citosol fins a la membrana mitocondrial externa. D'aquesta manera, es permeabilitza la membrana i en conseqüència s'allibera el citocrom c. Quan el citocrom c interacciona amb Apaf1 i la caspasa 9, forma un

complex anomenat apoptosoma que activa la caspasa 3, responsable de l'execució de la mort cel·lular <sup>60</sup>. Paral·lelament, el programa de mort cel·lular per anoikis es pot activar també per la via de la família de receptors de la mort cel·lular TNRF (Fas i TNFR1). Quan aquests receptors reben els seus lligands (TNF o TRAIL) formen un complex anomenat DISC que interacciona amb FAD (en anglès, *Fas Death Domain Protein*) activant la caspasa 8. Llavors, aquesta activa les caspases efectores 3, 6 i 7 i alhora indueix l'activitat de Bid que permet l'alliberament del citocrom c (**Figura I5**). Així, l'activació dels TNFR resulta en un increment de la mort cel·lular tant per la via extrínseca com la intrínseca <sup>59</sup>. En el cas del melanoma cutani, la resistència a l'anoikis és significativament elevada, i això facilita a les cèl·lules tumorals migrar, envair i metastatitzar a òrgans llunyans <sup>61</sup>. Igualment, en el UM l'alta freqüència de cèl·lules resistents a l'anoikis ha estat demostrada en un estudi d'Onken i els seus col·laboradors <sup>62</sup> on van detectar cèl·lules de UM circulants no només en el 100% dels pacients amb metàstasi sinó també en el torrent sanguini de molts pacients que no presentaven metàstasi. Així, es pot afirmar que malgrat les cèl·lules circulants no són indicadores de pronòstic, sí que són les responsables del creixement tumoral en el lloc metastàtic <sup>62</sup>.

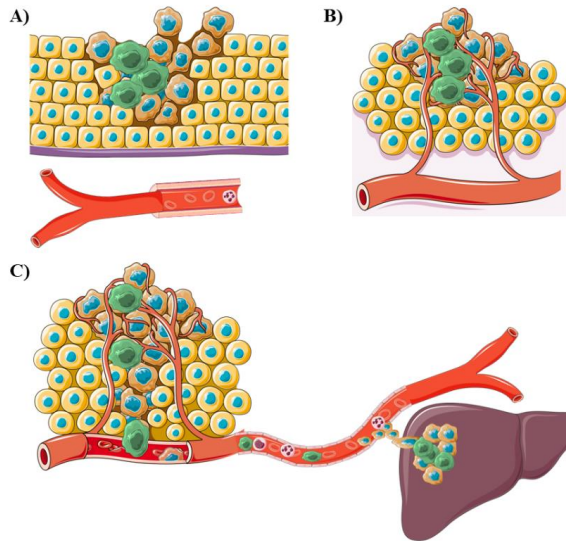
## INTRODUCCIÓ



**Figura I5. Cascada de senyalització responsable de la mort cel·lular per anoikis.** La falta de contacte de les integrines cel·lulars amb la ECM activa la via de senyalització intrínseca de l'anoikis. A través de Bid i Bim s'indueix una translocació de les proteïnes citoplasmàtiques Bax i Bak al mitocondri, permeabilitzant la seva membrana i facilitant la sortida de citocrom c. Quan el citocrom c és reconegut per Apaf1 i la caspasa 9, formen un complex anomenat apoptosoma que activa les caspases 9 i 3 i induïx la proteòlisi cel·lular. Alternativament, si els receptors de la mort TNFR1 o Fas interaccionen amb els seus lligands, malgrat mantenir la unió cel·lular amb el microentorn, s'activa la via extrínseca de l'anoikis. Així, la subseqüent senyalització per FADD i la caspasa 8 induïx o bé l'activació de les caspases 6, 7 i 3, o bé la interconnexió amb la via mitocondrial mitjançant l'activació de Bid. (Modificada de Paoli i col. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013). ECM: Matriu extracel·lular. TNFR1: Tumor Necrosis Factor Receptor 1. FADD: Fas Associated protein with Dead Domain.

Com s'indica a la **Figura I6**, el procés metastàtic inclou una sèrie d'etapes seqüencials directament relacionades que comencen pel creixement del tumor, la invasió local de l'estroma i els capil·lars, i l'entrada de melanòcits tumorals en el torrent sanguini<sup>58</sup>. No obstant això, no totes les cèl·lules tumorals capaces de sobreviure en el torrent sanguini, són capaces d'extravasarse en un punt determinat i

colonitzar un òrgan distant per a desenvolupar una metàstasi. Per a que això ocorri és necessari que les interaccions amb el microentorn de l'òrgan siguin favorables per al creixement tumoral. A més, la inhibició de qualsevol de les etapes consecutives que tenen lloc durant aquesta migració resulta en una aturada total del procés. És per això que la metàstasi és un esdeveniment extremadament ineficient <sup>58</sup>.



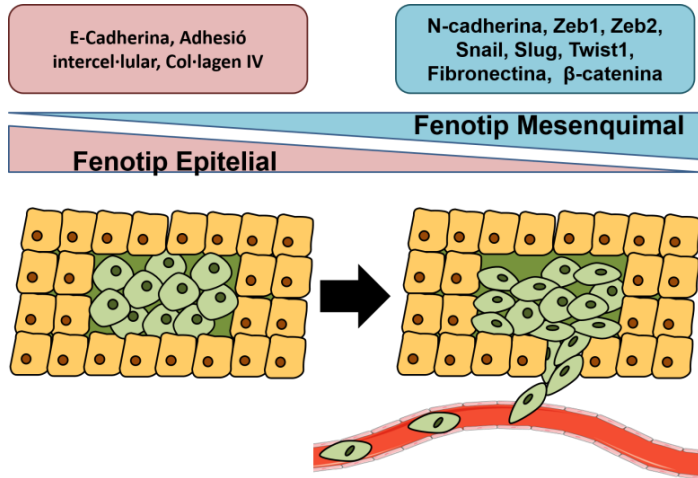
**Figura 16. Model de disseminació del melanoma uveal per la via hematògena.** **A)** La presència de CSC (verd) en el locus ocular permet mantenir un creixement cel·lular tumoral. **B)** A través de l'intercanvi de senyals entre la massa tumoral i el seu microentorn s'indueix la vascularització del tumor a la úvea. Les cèl·lules tumorals trenquen la ECM i envaeixen el teixit proximal. **C)** Finalment, algunes CSC entren en el torrent sanguini i migren fins a un òrgan distant on s'ancoren i desenvolupen un nou tumor, majoritàriament al fetge. CSC: Cèl·lula mare tumoral. ECM: Matriu extracel·lular.

## 5.1 TRANSICIÓ EPITELI-MESÈNQUIMA (EMT)

Per tal de superar tots els estadis de la metàstasi, les cèl·lules tumorals pateixen una sèrie de canvis genètics i epigenètics transitoris durant la seva progressió <sup>58</sup>. El principal mecanisme efector d'aquesta migració és el conegut com a transició epiteli-mesènquima (EMT). La EMT és un programa embrionari reversible que transforma les

## INTRODUCCIÓ

cèl·lules epitelials en cèl·lules amb capacitat mòbil gràcies a la seva polarització. Mitjançant aquest procés les cèl·lules són capaces d'incorporar-se a la matriu extracel·lular (ECM) i travessar-la. Durant el desenvolupament embrionari aquesta EMT permet a les cèl·lules migrar de la cresta neural i diferenciar-se en les cèl·lules adultes de les diferents capes de la dermis. Quan, en canvi, són les cèl·lules adultes les que reactiven aquest procés, com en el cas dels melanòcits del UM, les seves conseqüències són perjudicials perquè permeten la invasió de la ECM i la intravasació cel·lular en el torrent sanguini amb la subseqüent disseminació metastàtica <sup>63</sup>. Tot i que el melanoma no és un càncer de tipus epitelial, diversos estudis afirmen que el programa de la EMT és igualment aplicable i que hi juga un paper important en la seva progressió <sup>64</sup>. Aquesta EMT, en la majoria dels casos, va acompanyada d'un canvi morfològic cap a un fenotip més mesenquimal. El procés de la EMT està regulat per diversos factors de transcripció com *SNAIL1*, *SLUG*, *ZEB1*, *ZEB2* i *TWIST1* (**Figura I7**). En el cas del UM, així com en d'altres tumors, la sobreexpressió de *ZEB1* i *TWIST1* és indicador de mal pronòstic pel seu rol en la polarització cel·lular, migració, regulació del cicle cel·lular i diferenciació <sup>63,65</sup>. Addicionalment, un estudi recent de Chen i col·laboradors argumenta també que aquest fenotip regulat per *ZEB1* està relacionat amb l'oncogènesi i és essencial per a la progressió tumoral. Actualment no hi ha molts estudis realitzats sobre la EMT en el UM però en el cas del CM la diferent expressió dels factors de transcripció implicats en la EMT (*SLUG*, *SNAIL* i *ZEB*) es correlaciona també amb el fenotip propi de les CSC. Així, el fet de que les CSC siguin les cèl·lules que pateixen la EMT i envaeixen els teixits llunyans explicaria perquè el silenciament de la expressió de *Zeb1* inhibeix la migració cel·lular i remarcaria la importància de la EMT en la metàstasi del UM <sup>45,65</sup>.



**Figura 17. Model de transició epitelial-mesenquimal en carcinomes.** Canvis d'expressió determinats en les cèl·lules que pateixen la EMT. En el tumor *in situ* les cèl·lules presenten un fenotip epitelial amb alta expressió d'E-cadherina i col·lagen IV que els permet una elevada adhesió cel·lular. En canvi, per a disseminar i desenvolupar una metàstasi, les cèl·lules adquireixen un fenotip mesenquimal que inclou una alta expressió de N-cadherina, Zeb1/2, Snail, Slug, Twist-1, Fibronectina i  $\beta$ -catenina. (Modificada de Fabregat i cols. Journal of Clinical Medicine, 2016; Kalluri i Weinberg. Journal of Clinical Investigation, 2009). EMT: Transició Epitelial-Mesenquimal.

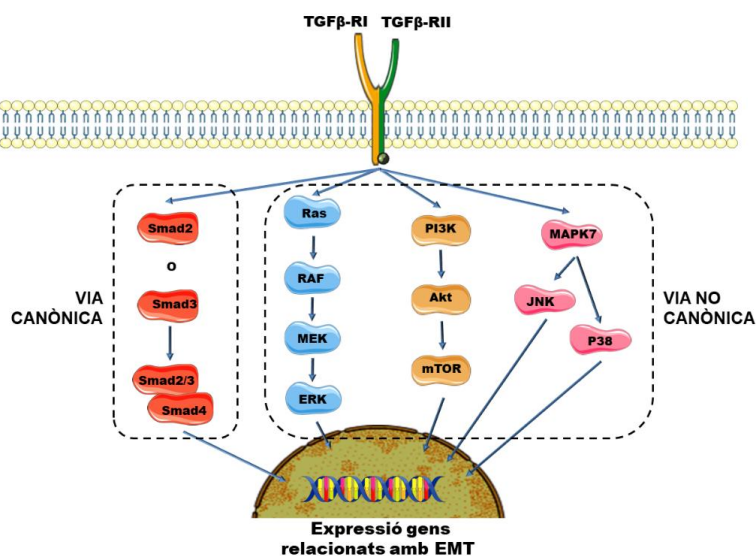
### 5.1.1 EL FACTOR DE CREIXEMENT TRANSFORMANT BETA (TGF- $\beta$ )

El programa de la EMT en els tumors s'indueix a través d'un ample ventall de factors de creixement, incloent el TGF- $\beta$ , el factor de creixement d'hepatòcits (HGF), el factor de creixement de fibroblasts (FGF), el factor de creixement epidèrmic (EGF) i el factor de creixement insulínic (IGF) <sup>64</sup>. En el cas del TGF- $\beta$ , l'activador més potent de la EMT <sup>66</sup>, quan s'uneix als seus receptors TGF $\beta$ R-I i TGF $\beta$ R-II, activa la senyalització cel·lular a través de la fosforilació d'SMAD2 i SMAD3, que s'associen amb SMAD4 formant un complex que s'acumula al nucli <sup>67</sup>. Aquest fet resulta en la inducció de l'expressió dels factors de transcripció responsables d'induir la EMT (*TWIST-1*, *SNAIL1*, *SNAIL2*, *ZEB1* i *ZEB2*) <sup>68</sup>. Alternativament, el TGF- $\beta$  també pot activar indirectament la via de MAPK, PI3K, JNK i RhoA a partir de



## INTRODUCCIÓ

l'estimulació d'altres factors de creixement reconeguts per receptors de TK. Llavors, s'indueix una cascada de senyalització a través de Ras, PI3K, JNK i p38 que, al seu torn, també participa en l'activació dels factors de transcripció directament responsables de la EMT <sup>64,66,69</sup> (**Figura I8**). D'aquesta manera, la senyalització mantinguda de TGF- $\beta$  en el tumor primari indueix als melanòcits tumorals l'adquisició de EMT i facilita la seva disseminació <sup>67</sup>. Finalment, quan les cèl·lules tumorals arriben al nínxol metastàtic, la manca de senyals inductores de la EMT facilita la reversió de les cèl·lules tumorals al fenotip pseudo-epitelial original. D'aquesta manera, el tumor adquireix un elevat nivell proliferatiu i progressa en el lloc secundari <sup>64</sup>.



**Figura I8. Vies de senyalització del TGF- $\beta$  implicades en la EMT.** La unió del receptor de TGF $\beta$ -RI amb el seu lligand causa la seva dimerització amb el receptor TGF $\beta$ -RII. Així, es fosforila un residu terminal del receptor que resulta amb la fosforilació subsidiària de Smad2 o Smad3 que interacciona amb Smad4 per induir l'expressió nuclear de gens relacionats amb la EMT (via canònica). Paral·lelament, la mateixa interacció pot induir una senyalització alternativa a través de la via de MAPK mitjançant Ras, de mTOR a través de PI3K i de JNK i p38 a través de MAPK7. Quan els seus efectors s'activen al nucli, poden interaccionar amb Smads nuclears i induir directament l'expressió dels gens responsables de la EMT (via no canònica). (Modificat de Costanza i cols. Journal of Clinical Medicine, 2017). TGF- $\beta$ : Factor de Creixement Transformant  $\beta$ . EMT: Transició Epiteli-Mesènquima.

Paral·lelament, el TGF- $\beta$  també participa en la migració i invasió tumoral del melanoma a través d'una via independent de EMT. Una de les particularitats del melanoma és que les seves cèl·lules són capaces d'utilitzar diferents mètodes de migració gràcies a la desdiferenciació cap a un fenotip semblant a l'original, de la cresta neural. El més interessant però, és que la utilització d'un dels mecanismes migratoris no és exclouent d'un altre. Aquest mecanisme migratori és de tipus ameboide i depèn de l'activació d'SMAD2 que mitjançant la seva interacció amb el cofactor activador CITED1 dirigeix la reorganització del citoesquelet d'actina, fet que permet a les cèl·lules adoptar un fenotip arrodonit que facilita la migració en petits grups <sup>67</sup>.

## 5.2 ORGANOTROPISME EN EL MELANOMA UVEAL

Gairebé la meitat dels tumors de UM metastatitzen i d'aquests, un alt percentatge ho fan específicament en el fetge. Fins a un 90% dels tumors de UM amb metàstasi presenten melanòcits tumorals al fetge, un 26% ho fa també als pulmons i un 16% als ossos. En termes de supervivència, l'especificitat observada és encara major, ja que les metàstasis hepàtiques són presents en el 95% de pacients que moren pel UM <sup>57</sup>. Aquesta prevalença per desenvolupar metàstasi al fetge per sobre d'altres òrgans no pot ser explicada per la disseminació hematògena ja que el primer òrgan que trobarien els melanòcits malignes serien els pulmons. Així doncs, hi ha d'haver un mecanisme mitjançant el qual aquestes cèl·lules són dirigides específicament cap al fetge <sup>58,70</sup>.

### 5.2.1 RECEPTORS DE TIROSINA QUINASES

L'òrgan-especificitat de les metàstasis s'explica amb la teoria del "seed and soil" d'Steven Paget's (1989). Segons aquest principi, les metàstasis es donen freqüentment en òrgans específics perquè proporcionen un ambient favorable per a l'establiment de les cèl·lules tumorals i el desenvolupament del nou tumor <sup>71</sup>. Allò que dirigeix aquestes metàstasis és específic de cada càncer i avui en dia segueix sent objecte d'estudi. En el cas del UM diversos candidats es postulen

## INTRODUCCIÓ

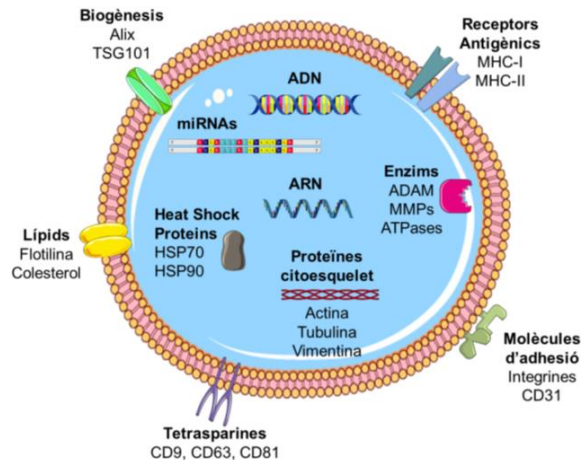
com a possibles responsables de la especificitat a causa de la seva alta producció al fetge.

Una de les molècules candidates és el HGF, un factor de creixement produït al fetge que interacciona directament amb el receptor de tirosina quinasa c-Met, altament expressat en les cèl·lules de UM <sup>72</sup>. Alhora, diversos grups han demostrat la importància de la unió del IGF amb el seu receptor (IGF-R1) en el UM <sup>73-75</sup>. De la mateixa manera que HGF, el IGF-1 es produeix majoritàriament en el fetge i l'alta expressió de IGF-R1 en el tumor primari del UM es correlaciona amb un pitjor pronòstic <sup>73</sup>. En els últims anys, la molècula de la família de quimiocines CXCL12 (o SDF1, en anglès, *Stromal Derived Factor 1*) ha emergit com a possible responsable de la especificitat del UM pel fetge. CXCL12 s'uneix única i específicament a CXCR4, un receptor altament expressat en cèl·lules de UM i càncer de còlon, tots dos amb una alta predilecció per metastatitzar a fetge <sup>71</sup>. A més, la seva alta expressió en tumors de UM en la clínica es correlaciona amb mal pronòstic <sup>76</sup>. Així, l'especificitat d'aquestes molècules per interaccionar amb lligands concrets que s'expressen altament en el fetge explicaria l'òrgan-especificitat característica del UM.

### 5.2.2 EXOSOMES

Les bases moleculars i cel·lulars de l'òrgan-especificitat de les metàstasis han estat objecte d'estudi en els darrers anys. Diversos estudis postulen que mitjançant l'intercanvi de senyals cel·lulars "s'educa" específicament el nínxol pre-metastàtic abans de l'arribada de les cèl·lules tumorals facilitant així la seva adaptació i afavorint la seva supervivència i proliferació. Aquest intercanvi d'informació entre el tumor primari i l'òrgan diana es realitza mitjançant factors solubles com citoquines, proteïnes, metabòlits i vesícules extracel·lulars <sup>77</sup>. Entre aquestes vesícules secretades a l'espai extracel·lular els exosomes han emergit com uns mediadors cel·lulars especialment importants en les metàstasis tumorals. Els exosomes són vesícules d'entre 30-100 nm de diàmetre derivats de les

membranes luminals, que s'invaginen formant endosomes multivesiculars. Durant aquest procés incorporen càrrega cel·lular en el seu interior i finalment són alliberats a l'exterior en fusionar-se amb els lisosomes. Els exosomes secretats contenen ADN, lípids, ARN missatgers, micro ARNs i proteïnes diverses depenent del seu origen cel·lular <sup>78</sup>. Quan aquests exosomes són captats i internalitzats per les cèl·lules receptores es produeix un intercanvi d'informació horitzontal que afecta la seva funcionalitat. D'aquesta manera, els exosomes són capaços de regular processos a distància <sup>79</sup>. La càrrega molecular dels exosomes depèn de la seva cèl·lula d'origen però tots contenen elements característics que els defineixen, com són les proteïnes de transport Annexina i Flotilina, les tetrasparines CD63, CD9, CD81 i CD82, les proteïnes estructurals ALIX i TSG10 i les proteïnes HSP70 i HSP90 (en anglès, *Heat Shock Protein 70 - 90*) <sup>78</sup> (Figura 19).



**Figura 19. Estructura i contingut biològic dels exosomes.** Els exosomes són microvesícules embolcades per una bicapa lipídica amb molècules transmembrana pròpies de la seva biogènesi i un ampli ventall de receptors antigènics, d'adhesió i tetrasparines. En el seu interior, contenen cadenes senzilles d'ADN i ARNm juntament amb microARNs, enzims i proteïnes tant estructurals com reguladores (heat shock proteins). (Modificada de Kourembanas. Annual Revision of Physiology, 2015 <sup>80</sup>). MHC: Complex major de histocompatibilitat. HSP: Proteïnes de xoc tèrmic. ADAM: Desintegrina i metal·loproteasa. MMP: metal·loproteases de matriu.

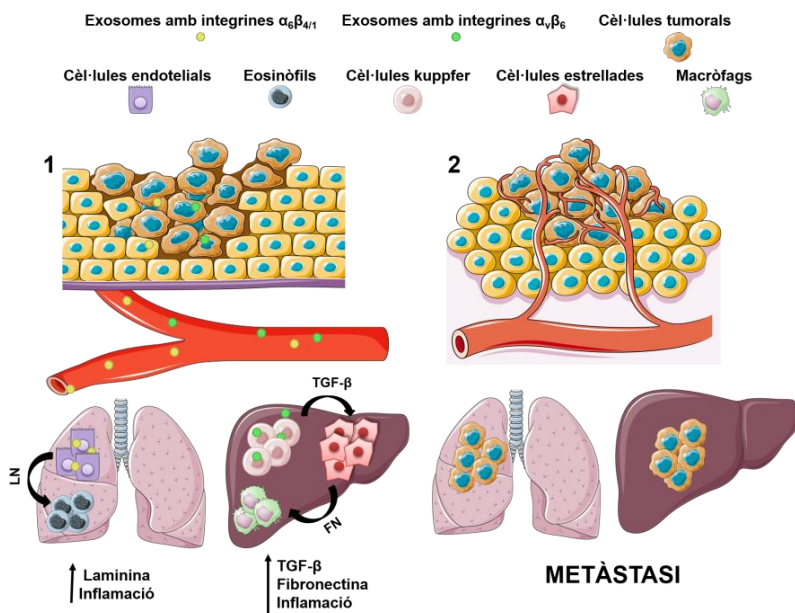
## INTRODUCCIÓ

Els exosomes, mostren un cert nivell d'especificitat i presenten una prolongada estabilitat en circulació. Aquest fet, sumat a la versatilitat del seu contingut genètic i proteic els fa importants en l'educació del nínxol metastàtic de l'òrgan diana. A més, els hi permet interactuar amb diferents cèl·lules presents en el microambient tumoral. Així, promouen el procés metastàtic a través de la modulació de la ECM, la inducció de la EMT, la inducció de l'angiogènesis, el canvi metabòlic, la variació de la resposta immunitària i l'òrganotropisme <sup>77</sup>. La modificació de la ECM és essencial per a la migració de les cèl·lules tumorals. En el cas del melanoma, els exosomes secretats pels melanòcits malignes contenen proteases (ADAMs, uPAR i HADase) que degraden el col·lagen I i IV, la laminina i la fibronectina per tal de facilitar la invasió per invadopòdia de les cèl·lules tumorals. Així, aquestes se separen dels components de la ECM i poden sotmetre's a la EMT <sup>78</sup>. A més, aquests exosomes faciliten la EMT a través de l'alliberament dels micro ARNs continguts en el seu interior. L'expressió de Let7i, Let7a i miR-191 redueix l'expressió de E-cadherina, *ZEB2*, *SNAIL2* i *VIMENTINA* <sup>81</sup>. La interacció dels exosomes de melanoma amb el microentorn també indueix la secreció de factors responsables de la inducció de l'angiogènesi com són VEGF i TNF- $\alpha$  <sup>82</sup>. El metabolisme característic de les cèl·lules tumorals, que basa l'obtenció d'ATP en la glicòlisi en comptes d'en l'oxidació aeròbica, resulta en una elevada producció de lactat que acidifica l'ambient tumoral. Aquest fet, provoca una hiperactivació de les seves bombes intercanviadores de protons, que al seu torn incrementen la secreció d'exosomes al microentorn tumoral <sup>77</sup>. Tant els exosomes com les cèl·lules tumorals estan enriquits amb inhibidors específics per evadir la resposta immunitària de les cèl·lules T. Així, quan interaccionen amb elles, indueixen un canvi d'expressió gènica i en determinats casos la internalització de CD69 de la seva superfície. D'aquesta manera, modulen la capacitat de resposta de les cèl·lules T i faciliten l'evasió de la resposta immune per part de les cèl·lules tumorals <sup>83</sup>.

Adicionalment, els exosomes contenen en la seva membrana extracel·lular un repertori d'integrines responsables de la fusió d'aquests amb les cèl·lules receptores de l'òrgan concret on es formaran els nous focus metastàtics. En aquest cas, les integrines varien segons la cèl·lula d'origen i podrien dirigir la seva òrgan-especificitat <sup>78,79,84,85</sup>. Un estudi realitzat amb exosomes marcats ha permès seguir la disseminació d'aquestes vesícules i la seva captació per determinats òrgans específics. Així, s'ha determinat un patró d'expressió d'integrines específic per les metàstasis pulmonars i un altre de diferent per a les hepàtiques <sup>85</sup>. Les integrines  $\alpha_6\beta_4$  i  $\alpha_6\beta_1$  es troben altament expressades en els exosomes de CM i interaccionen específicament amb els fibroblasts i les cèl·lules epitelials presents en els pulmons. L'activació subseqüent de SRC i la sobreexpressió de S100 resultant afavoreix llavors la progressió de la metàstasi <sup>85</sup>. En canvi, els exosomes provinents d'un tumor pancreàtic, amb una alta predilecció per metastatitzar a fetge, expressen alts nivells d'integrina  $\alpha_v\beta_5$ . Aquesta integrina és reconeguda per les cèl·lules de Kupffer i indueix una sobreexpressió de fibronectina creant un entorn fibrós favorable pel nou tumor <sup>85</sup>. Tot i no tractar-se de UM, un altre estudi realitzat amb exosomes d'adenocarcinoma pancreàtic defineix el procés concret mitjançant el qual aquests exosomes són captats per les cèl·lules hepàtiques i eduquen el fetge per a l'arribada de les cèl·lules tumorals. En aquest procés els exosomes secretats pel tumor són captats per les cèl·lules de Kupffer del fetge. L'alta expressió de *MIF* que contenen en el seu interior causa la secreció de TGF- $\beta$  per part de les cèl·lules estrellades. El TGF- $\beta$ , al seu torn, indueix l'expressió de Fibronectina facilitant el reclutament de macròfags procedents de la medul·la òssia. Així, es crea un ambient proinflamatori que afavoreix la posterior colonització metastàtica al fetge <sup>86</sup> (**Figura I10**). L'especificitat del UM per a metastatitzar al fetge suggereix que aquest, o probablement un altre escenari semblant, és el que succeeix en la colonització del fetge per part dels melanòcits dels tumors uveals. Malgrat la manca d'estudis amb exosomes de UM,

## INTRODUCCIÓ

un treball de Eldh i col·laboradors del 2014 <sup>84</sup> va confirmar la importància que tenen també en aquest tipus de càncer, ja que van determinar la presència d'una major quantitat significativa d'exosomes en el plasma perifèric de pacients amb UM respecte els controls.



**Figura I10. Organotropisme del melanoma segons les integrines expressades en els exosomes del tumor primari. 1) El tumor primari allibera exosomes a la circulació que presenten integrines expressades en la seva superfície. Les diferents integrines permeten als exosomes ser captats per determinats tipus cel·lulars i alliberar el seu contingut en el nínxol pre-metastàtic.**

Els exosomes que expressen les integrines  $\alpha_6\beta_{4/1}$  són captats per les cèl·lules endotelials dels pulmons i indueixen la secreció de laminina, que provoca el reclutament d'eosinòfils creant un ambient inflamatori que afavoreix la posterior adaptació de les cèl·lules tumorals i el desenvolupament de la metastasi. En el cas dels exosomes que expressen les integrines  $\alpha_v\beta_6$ , aquests són captats per les cèl·lules Kupffer del fetge causant la secreció de grans quantitats de TGF- $\beta$ . El TGF- $\beta$  actua sobre les cèl·lules estrellades induint la secreció de fibronectina creant un entorn fibrós que facilita la captació de macròfags. 2) D'aquesta manera, s'indueix un ambient inflamatori que permet l'ancoratge i el creixement de les cèl·lules tumorals que hi arriben, responsables de la metastasi. (Modificada de Liu i Cao, Cell Research, 2016; Zhang & Wang, Nature Cell Biology, 2015). LN: Laminina. FN: Fibronectina.

## **6 VIES DE SENYALITZACIÓ ALTERADES EN EL MELANOMA UVEAL**

Tot i la baixa freqüència d'alteracions moleculars en el UM diversos estudis afirmen que les mutacions en els gens *GNAQ* i *GNA11* són presents en més del 80% de tumors de UM i causen una senyalització sostinguda de la via de GPCR <sup>4,87,88</sup>. En el cas d'un l'estudi liderat per la Dra. Amaro i col·laboradors la seva investigació va detectar que gairebé el 20% dels tumors restants presentaven una mutació activadora del gen *CYSLTR2*, el qual codifica per GPCR <sup>4</sup>. Aquesta mutació resulta en una activació constant de la via de les GPCR. És per això que actualment es creu que és una via de senyalització essencial per a la iniciació de la malaltia neoplàsica i que la seva inactivació pot ser clau com a teràpia contra el UM.

### **6.1 VIA DE LES GPCR**

La primera de les vies de senyalització que s'activa en el melanoma uveal és conseqüència de les alteracions genètiques primàries al melanòcit uveal. A través de la via de les GPCR es transfereixen els senyals des de les proteïnes  $GNA_{q/11}$  actives als seus efectors <sup>88</sup>. La família de les GPCR consta de més de 800 elements i participa en una àmplia i variada cascada de senyalització cel·lular. Aquests receptors engloben tres regions de l'espai cel·lular: la regió extracel·lular, la regió transmembrana i la regió intracel·lular. Segons els lligands que s'uneixen a la regió extracel·lular dels receptors, els GPCR pateixen canvis conformacionals en les seves subunitats  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , que alteren la senyalització resultant. En el seu estat inactiu, la subunitat  $\alpha$  es troba unida a una molècula de GDP (en anglès, *Guanine Diphosphate*) amb les subunitats  $\beta$  i  $\gamma$  formant un complex a l'interior de la membrana cel·lular. Quan aquest GPCR rep un lligand, la subunitat  $\alpha$  recluta una molècula més de fosfat, transformant el GDP en GTP (en anglès, *Guanine Triphosphate*). Així, es desenganxa de les subunitats  $\beta$  i  $\gamma$  i queda lliure per interaccionar amb diferents factors intracel·lulars i activar vies de





**Figura I11. Vies de senyalització relacionades amb la proliferació i supervivència cel·lular en el melanoma uveal, subsidiàries a les mutacions GNAQ/11.** Les mutacions en les subunitats G $\alpha$  de les proteïnes GNAQ i GNA11 resulten en l'enviament mantingut de senyals de proliferació i supervivència cel·lular a través de la via de les MAPK (blau) mitjançant l'activació de PLC (rosa), la via de Hippo/YAP (verd), la via de JNK (vermell) i la via de PI3K (taronja). GPCR: Receptors acoblats a les proteïnes G.

### 6.1.1 VIA DE LES MAPK

En els tumors de UM és freqüent l'activació de la via de les MAPK (en anglès, *Mitogen Activated Protein Kinase*), ja que en un 45-86% dels casos s'observen nivells elevats de les proteïnes efectores ERK1/2 fosforilades <sup>88</sup>. Aquesta activació es pot donar per dues vies.

Per una banda, l'activació de MAPK a través de les mutacions G $\alpha$ <sub>q/11</sub> es dona de manera transitòria i ràpida, mitjançant l'activació directa de PLC- $\beta$  en els esdeveniments inicials. Aquesta, desencadena una hidròlisi de PIP2 (en anglès, *phospholipid phosphatidylinositol 4,5-triphosphate*) que produeix dos molècules, IP3 (en anglès, *inositol 1,4,5-triphosphate*) i DAG (en anglès, *diacylglycerol*). DAG s'uneix llavors a PKC que mitjançant la seva interacció amb RasGRP3, estimula la formació d'un GTP que desencadena la senyalització subsidiària de MAPK <sup>88</sup>. En paral·lel, la molècula formada de IP3 allibera partícules de calci que també poden activar certes isoformes de PKC. La família de les PKC està formada per 10 isoformes de quinases serina/threonina que es divideixen en 3 grups, clàssiques, noves o atípiques. Mentre que les clàssiques ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 i  $\gamma$ ) poden ser activades tant per DAG com IP3 a través dels ions de calci, les noves ( $\delta$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\eta$ ) són exclusivament dependents de DAG. Finalment, les isoformes atípiques ( $\zeta$  i  $\iota$ ) no s'activen per aquestes vies <sup>89</sup>. Malgrat aquesta classificació, les isoformes específiques encarregades de l'activació de la via de les MAPK en el UM segueixen sent incertes.

Paral·lelament, un estudi recent de Robertson i col·laboradors suggereix que l'activació sostinguda de MAPK en la progressió del UM

## INTRODUCCIÓ

no és dependent d'aquest esdeveniment sinó que és conseqüència d'alteracions secundàries freqüents com la mososomia del cromosoma 3 i la pèrdua de funció de BAP-1, els quals indueixen també la seva activació a través de PKC <sup>11</sup>. Un cop activada la PKC, aquesta interactua amb membres de la família RasGRP i indueix la fosforilació de MEK, que al seu torn activa ERK causant la seva translocació al nucli. Així, s'estableix una senyalització constant de factors proliferatius, de supervivència, diferenciació i apoptosi <sup>90</sup>. Aquest fet es troba recolzat en un estudi de Mouti i col·laboradors en el qual van comprovar que el silenciament de GNAQ mutant en línies de UM no redueix els nivells de ERK fosforilats <sup>91</sup>.

### 6.1.2 VIA DE HIPPO/YAP

Les proteïnes  $G\alpha_{q/11}$  mutades indueixen, a més, l'activació d'una via paral·lela a MAPK independent de PLC: la via de Hippo/YAP, que actua a través de les Rho GTPases. La subunitat  $G\alpha$  pot unir-se directament a TRIO, una proteïna de la família de les RhoGTPases. L'activació de TRIO deriva en la translocació al nucli dels seus co-activadors transcripcionals TAZ (en anglès, *transcriptional coactivator PDZ-binding motif*) i YAP (en anglès, *Yes-associated protein*), que intervenen en la senyalització de RhoA i Rac1 a través de TGF- $\beta$  i SMAD. Per contra, si no existeix aquesta interacció amb TRIO, la proteïna YAP resta fosforilada i és segrestada per LATS o AMOT, que indueixen la seva degradació a través del proteosoma. Així, la constant acumulació de YAP al nucli causada per la senyalització de  $G\alpha$ , estimula canvis en l'expressió gènica que provoquen una remodelació del citoesquelet d'actina i una major proliferació cel·lular <sup>92</sup>.

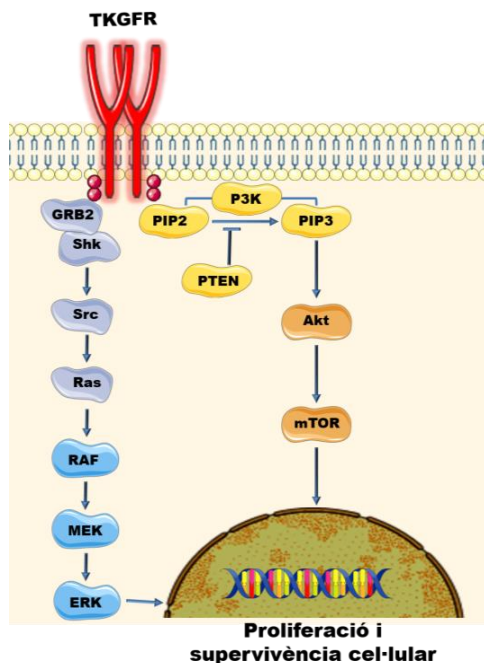
Alhora, la mateixa via de senyalització mediada per TRIO indueix l'activació de JNK i p38 a través de la seva interacció amb AP-1. Durant aquest procés, la fosforilació de JNK i p38, activa els factors de transcripció c-Jun i c-Fos que s'uneixen a les regions promotores de diversos gens implicats en proliferació cel·lular induint un creixement aberrant pro-tumorogènic <sup>93</sup>.

### 6.1.3 VIA DE PI3K

La via de PI3K/AKT, que està implicada principalment en supervivència cel·lular, es troba activada en almenys el 50% dels UM. S'activa no només per la senyalització mantinguda de la subunitat  $G\alpha$  sinó també, per la sobreexpressió d'altres receptors de tirosina quinases (RTK) o per la pèrdua de funció de *PTEN* (en anglès, *Phosphatase and Tensin Homolog Protein*). Aquesta pèrdua està causada per la sobreexpressió dels micro ARNs miR-367 i miR-454<sup>88,94</sup>. Així, l'activitat dels receptors i la inactivació de PTEN, i permeten la fosforilació de PIP2 a PIP3, induint la consegüent fosforilació de AKT a la membrana plasmàtica. Un cop actiu, AKT interacciona amb mTOR activant senyals proliferatius en el nucli cel·lular<sup>88</sup>.

## 6.2 VIA DELS RECEPTORS DE FACTORS DE CREIXEMENT TIROSINA QUINASES

Juntament amb la senyalització subsidiària de  $GNA_{Q/11}$ , els UM sobreexpressen determinats receptors de tirosina quinases (RTK) durant la progressió tumoral que col·laboren en la proliferació i la metastàsis. Quan aquests receptors reben la unió dels seus respectius lligands, fosforilen els seus residus intracel·lulars i recluten proteïnes i factors de transcripció relacionats amb la proliferació, supervivència, migració i invasió cel·lular<sup>88</sup> (**Figura I12**).



**Figura I12. Vies de senyalització cel·lular del melanoma uveal relacionades amb la proliferació i supervivència cel·lular, independents de les GPCR.**

Diversos receptors de tirosina quinases poden activar les vies de MAPK i PI3K quan reben la unió del seu lligand a la membrana cel·lular. Aquesta unió indueix la fosforilació del seu residu intracel·lular i recluta molècules diverses que transmeten la senyal proliferativa al nucli cel·lular. En cas que s'activi la proteïna GRB2, la senyal es transmet a través de Ras per la via de les MAPK (blau). Per contra, si s'activa el fosfolípida PIP2, la senyalització es dona a través de AKT per la via de PI3K. GPCR: Receptors acoblats a les proteïnes G. TKGFR: Receptors tirosina quinases de factors de creixement.

El c-KIT es troba altament expressat en el 63-75% dels tumors <sup>95</sup> i quan rep la unió del seu lligand, SCF (en anglès, *Stem Cell Factor*), pateix una dimerització del receptor que autofosforila un residu de tirosina i activa el seu domini intracel·lular. Aquest, interactua llavors amb SHC i SRC, que mitjançant Ras, senyalitzen a través de la via de les MAPK. Paral·lelament, pot induir l'activació de la via de PI3K a través de la proteïna PIP3 <sup>96</sup>.

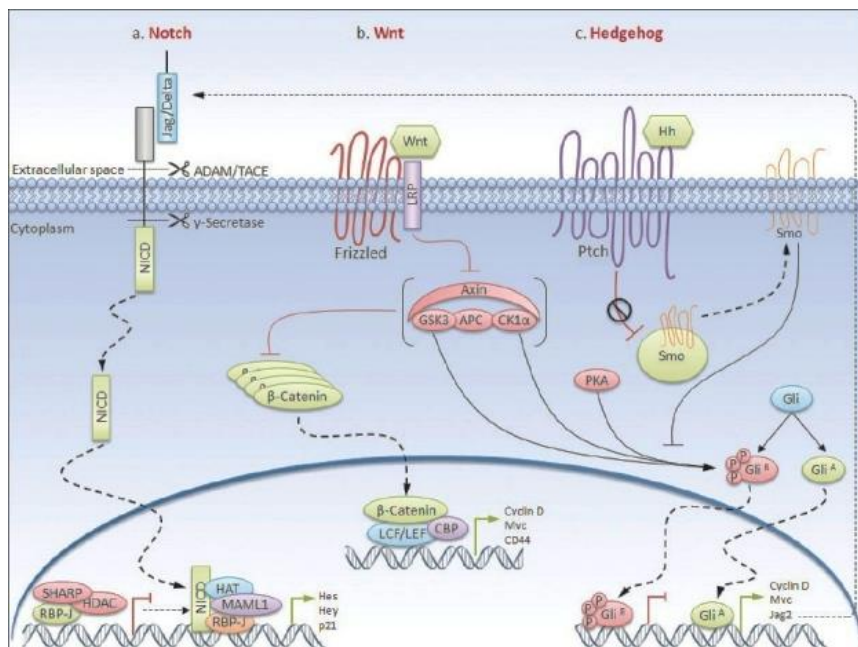
L'expressió de c-MET es troba augmentada en el 90-98% dels casos de UM <sup>95</sup> i la seva activació està relacionada amb la progressió tumoral. El seu mecanisme d'acció és similar al de c-KIT, ja que quan interacciona amb el seu lligand, HGF, s'autofosforilen un o dos residus de tirosina que recluten el factor de creixement GRB2 (en anglès, *Growth Factor Receptor Bound Protein 2*). La subseqüent fosforilació de SRC desencadena una cascada de senyalització a través de la via de Ras/MAPK i PI3K que resulta en l'activació de senyals nuclears proliferatius, de resistència a la mort per apoptosi i de motilitat i invasió <sup>72,97</sup>.

Un altre dels receptors comunament sobreexpressats en el UM és el IGFR-1 (90% dels tumors) <sup>95</sup>. Quan el receptor heterotetramèric IGFR-1, rep la unió de IGF-1 es fosforilen tres residus de tirosines del seu domini intracel·lular i s'activa la subunitat  $\beta$  del receptor. Si aquest interacciona amb SHC i SRC s'activa la via de les MAPK, però si interacciona amb IRS1 o 2 (en anglès, *Insulin Receptor Substrate 1/2*) pot induir una senyalització paral·lela per la via de PI3K i mTOR <sup>97,98</sup>. Actualment es coneixen almenys 9 substrats IRS diferents i depenent de quin sigui activat, la resposta final serà diferent. El més comunament expressat en el fetge és l'IRS2 i la seva estimulació resulta en l'activació de les vies de proliferació cel·lular PI3K i Ras/MAPK <sup>97</sup>. Aquesta via de senyalització a través de IGF-1 es troba altament conservada i en el cas del melanoma s'ha postulat com a responsable de la resistència terapèutica enfront els inhibidors de mTOR. És per aquest motiu que actualment hi ha diversos estudis en fase preclínica centrats en la inhibició de IGFR-1 <sup>99</sup>.

### 6.3 VIES DE SENYALITZACIÓ DE LES CSC

Les CSC presenten un fenotip similar al de les cèl·lules mare embrionàries i per tant, tenen una activació mantinguda de les vies de senyalització involucrades en el desenvolupament, la diferenciació i l'homeòstasi cel·lular, entre les quals hi ha la via de Wnt, Notch i Hedgehog <sup>100</sup> (**Figura I13**).

## INTRODUCCIÓ



**Figura I13. Vies de senyalització relacionades amb les característiques d'*stemness* de les cèl·lules mare tumorals. A)** Via de senyalització canònica de Notch. Quan s'uneixen els lligands de Notch (Jag/Delta) a algun dels receptors de Notch, el domini intracel·lular escindit (NICD) es transloca al nucli on s'uneix amb els co-activadors per induir la transcripció dels seus gens diana. **B)** Via de senyalització de Wnt. La senyalització canònica de Wnt es produeix a través de l'estabilització i l'acumulació nuclear de β-catenina quan un dels lligands de Wnt s'uneix a aquest receptor i al co-receptor LRP. Aquesta activació segrasta el complex de degradació Axina-GSK3β-APC-CD1α deixant lliure la β-catenina, que s'acumula al citoplasma. Així, la β-catenina pot translocar-se al nucli i associar-se amb els factors de transcripció LCF/LEF per iniciar la transcripció de gens diana. **C)** Via de senyalització de Hedgehog. Hedgehog és un lligand secretat que s'uneix al receptor Patched induint l'alliberament d'aquest del seu altre receptor al qual es troba unit en falta de lligand, l'Smoothened. Així, s'indueix la fosforilació i translocació nuclear de Gli 1 i 2 actiu, que inicia la transcripció de gens diana amb un paper en la regulació de cèl·lules mare. (Modificada de Malhotra i cols. Journal of Carcinogenesis, 2011 <sup>101</sup>). Ptch: Patched. Smo: Smoothened.

### 6.3.1 VIA DE NOTCH

La via de senyalització de Notch és una via evolutivament molt conservada que actua a través de lligands transmembrana entre cèl·lules contigües i té una gran importància en la regeneració

cel·lular, l'angiogènesi i la immunitat. Per això, la seva activació en les CSC ha estat objecte d'estudi en els últims anys. La senyalització a través de Notch es duu a terme en dos passos. Quan un lligand expressat en una cèl·lula (DLL1, DLL3, DLL4, Jagged1 o Jagged2) interacciona amb un receptor Notch expressat en una altra cèl·lula (Notch1, Notch2, Notch3 o Notch4) es produeix el trencament de la part externa del receptor a través de dos enzims de la família ADAM (ADAM10 o ADAM17). A continuació, es produeix una segona escissió del receptor en l'espai intermembrana a través de la  $\gamma$ -secretasa. D'aquesta manera, s'allibera el fragment intracel·lular del receptor que pot interaccionar amb factors nuclears responsables de la diferenciació, proliferació i supervivència cel·lular (*MYC*, *HES*, *CDK*, *Ciclina D3*, *Her2*...). Depenent del lligand, el receptor i la dosis activadora la resposta final pot ser àmpliament diferent <sup>100</sup>. L'alta expressió dels receptors o lligands d'aquesta via ha estat relacionada amb cèl·lules CSC-Like en tumors de mama i pàncrees <sup>102,103</sup>. En melanoma uveal, a més, la inhibició d'aquesta via amb un inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa s'ha relacionat amb una reducció significativa de la capacitat clonogènica, la invasió i la proliferació cel·lular *in vivo* <sup>104</sup>.

### 6.3.2 VIA DE WNT

La senyalització a través de Wnt es pot dur a terme a través de la via canònica, que resulta en l'activació de LEF, un factor de transcripció implicat en la tumorigènesi, i la via no canònica, que indueix la reestructuració del citoesquelet i regula els nivells intracel·lulars de calci <sup>100</sup>. La via canònica s'activa quan un lligand de Wnt s'uneix a un receptor de la família de les GPCR anomenat Frizzled (Fz). A través de la intervenció d'un co-receptor, el LRP5/6 (en anglès, *Lipoprotein Receptor-related Protein*), s'activa la funció de la proteïna citoplasmàtica Dvl (en anglès, *Dishvelled homologue phosphoprotein*) que impedeix la fosforilació de la  $\beta$ -catenina a través del complex d'Axin impedint-ne la seva degradació. Així, en presència de Wnt s'acumulen gran quantitats de  $\beta$ -catenina lliure que es transloca al nucli activant els factors de transcripció TCF i LEF, responsables de l'expressió de gens relacionats amb la diferenciació, cicle cel·lular i



## INTRODUCCIÓ

migració, com *MYCN*, *Ciclina D1*, *MMP7*, *AXIN2*, *CD44*, *COX2*...<sup>100</sup>. Per contra, en absència de Wnt, Dvl no s'activa i la  $\beta$ -catenina citoplasmàtica és fosforilada i segrestada per un complex multiproteic format per Axin, APC i GSK3 $\beta$  que indueix la seva degradació mitjançant el proteosoma<sup>100</sup>. Aquesta senyalització de Wnt per la via canònica està àmpliament caracteritzada i és important per al manteniment de les CSC i la progressió tumoral. Per exemple, en un estudi comparatiu en càncer colorectal s'ha observat una major expressió de la via de Wnt en les cèl·lules CD44<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> (marcadors de CSC) en comparació amb la resta<sup>105</sup>. De la mateixa manera, s'ha detectat la proteïna APC com a responsable de l'homeòstasi i la diferenciació oncogènica en el càncer colorectal<sup>106</sup>. Addicionalment, la supressió del gen  $\beta$ -catenina en carcinomes escamosos disminueix la presència de cèl·lules CD34<sup>+</sup> i causa una regressió tumoral complerta en ratolins<sup>107</sup>. En el UM, un estudi recent de Kaochar i col·laboradors<sup>108</sup> també ha demostrat la importància d'aquesta via en la progressió tumoral a través de la inhibició del coactivador transcripcional induït per la  $\beta$ -catenina CBP (en anglès, *CREB-Binding Protein*), fet que es tradueix en una reducció en la senyalització de la via de MAPK i mTOR, una menor migració *in vitro*, i un canvi d'expressió gènica relacionat amb un millor pronòstic (Classe 1).

Actualment existeix suficient evidència científica que confirma el rol de la via canònica de Wnt en el càncer i en les CSC, tot i això, encara roman objecte de debat si la via no canònica participa també en la transformació oncogènica de les cèl·lules<sup>109</sup>.

### 6.3.3 VIA DE HEDGEHOG

La senyalització per Hedgehog (HH) està implicada en l'homeòstasi tissular i el desenvolupament embrionari i també es pot donar per la via canònica i no canònica. La via canònica implica la detecció dels lligands de HH (SHH, IHH i DHH) pels receptors Patched (PTCH) que s'alliberen de l'inhibidor Smoothed (SMO) i indueixen la translocació de Gli1/2 al nucli per activar l'expressió de gens reguladors del cicle cel·lular i l'angiogènesi com *Ciclina D1*, *Ciclina E1*,

*HES*, *MYC* i *HIP* <sup>100</sup>. Alternativament, l'activació d'aquests factors nuclears per GLI es pot dur a terme sense l'acció de SMO a través de la interconnexió amb les vies de senyalització mediatees per TGF- $\beta$ , MAPK, PI3K, IGF i TNF <sup>100</sup>. L'activació aberrant de la via de HH s'ha detectat en les CSC presents en el mieloma múltiple, el carcinoma escamós i en càncer pancreàtic. En el cas del mieloma múltiple la seva inhibició, a més, redueix la seva capacitat clonogènica <sup>110</sup>. Similarment, el bloqueig d'aquesta via en les CSC derivades d'esferoides de cèl·lules tumorals pancreàtiques inhibia la capacitat d'autorenovació, EMT, invasió i tumorogènesi <sup>111</sup>.

Així, la inhibició de les esmentades vies de senyalització obre noves perspectives i oportunitats terapèutiques per als pacients amb UM <sup>94,112</sup>.

# **7 ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES CONTRA EL MELANOMA UVEAL**

El melanoma uveal representa el tumor més freqüent entre els casos de tumors oculars (90%). Actualment la mitjana d'edat de detecció s'estableix en el 62 anys, excepte en els tumors amb mutacions germinals en el gen BAP-1, en els quals apareixen a edats molt més joves (30-59 anys) <sup>113</sup>. Malgrat els elevats percentatges de supervivència quan el UM es troba controlat en l'origen del nevus primari, la supervivència en els pacients amb metàstasi es redueix dràsticament, amb un 20-30% morint abans de 5 anys, i un 45% al cap de 15 anys <sup>7</sup>.

El tractament del tumor primari es divideix en dos tipus, segons la preservació del globus ocular o no. En el primer grup s'hi inclou la cirurgia, la radioteràpia i la teràpia mitjançant làser. En el segon, hi ha l'enucleació <sup>7</sup>. L'enucleació, històricament el primer tractament utilitzat contra el UM, avui en dia només és utilitzat en casos específics on hi ha una elevada massa tumoral i baixa probabilitat de mantenir la visió perquè altres alternatives menys agressives han mostrat eficàcies similars o superiors. Com a cirurgies alternatives existeixen l'endoressecció transretinal i la transescleral. Ambdues mostren una bona retenció de la visió i pocs efectes adversos. Tot i això, les ràtios de recurrència local són significativament majors als obtinguts amb tècniques de radioteràpia. Per a tumors petits la tècnica més utilitzada és la braquiteràpia, que consisteix en la col·locació d'una placa amb els radioisòtops iode-125 o ruteni-106 sobre la zona amb la massa tumoral. Per tumors més grans, s'utilitza la radioteràpia amb partícules dirigides contra el tumor local. En els dos mètodes les complicacions es basen en el dany del teixit circumdant i problemes vasculars, però mostren una bona eficàcia terapèutica especialment en els tumors allunyats del disc òptic. Finalment, mitjançant làser amb la tècnica de la fotocoagulació es poden destruir les cèl·lules canceroses acumulant grans quantitats d'energia en llocs específics.

Aquesta tècnica presenta una eficiència més variable entre pacients i, per tant, s'utilitza menys que les mencionades anteriorment <sup>113</sup>.

La quimioteràpia, habitualment utilitzada en altres tipus de càncers, és altament ineficient en el UM, ja que presenta rangs d'eficiència inferiors al 1%. Aquest fet és degut a l'alta resistència intrínseca dels melanòcits del tracte uveal als agents quimioterapèutics. Igualment, la immunoteràpia, altament eficient en el melanoma de tipus cutani, ha mostrat una baixa eficàcia en el melanoma uveal. S'han dut a terme estudis clínics amb molècules contra CTLA4 (Ipilimumab) i PD-1 (Pembrolizumab i Nivolumab) que ajuden a incrementar la resposta immune de les cèl·lules T contra el tumor, però els resultats obtinguts fins ara no han aconseguit millorar el temps lliure de malaltia o la supervivència final <sup>9</sup>. Donat que en els pacients amb metàstasi un 95% dels casos presenta tumors al fetge, s'ha avaluat l'eficàcia de teràpies dirigides específicament a fetge. A més de la resecció de les lesions hepàtiques, la IHP (en anglès, *Isolated Hepatic Perfusion*) –un tipus de quimioteràpia intra-arterial aplicada únicament al fetge– ha demostrat una eficàcia superior a les aconseguides per les teràpies sistèmiques, evitant la recurrència i allargant el temps lliure de malaltia. Tot i això, en cap dels estudis s'ha observat un increment en la supervivència final dels malalts de UM <sup>113</sup>.

La ineficàcia de les teràpies convencionals per combatre la metàstasi en el UM i el major coneixement biològic de la progressió de la malaltia ha desembocat en un augment substancial d'estudis amb teràpies dirigides i adjuvants <sup>113</sup>. Donat que més del 80% dels UM presenten mutacions a *GNAQ* o *GNA11* i conseqüentment, una activació sostinguda de les vies MAPK i PI3K a través de PKC, en els últims anys s'han desenvolupat diversos fàrmacs contra dianes presents en aquestes vies. En la **taula I1** es mostren els estudis més prometedors realitzats amb diferents inhibidors i els resultats preliminars obtinguts.

# INTRODUCCIÓ

**Taula I1. Estudis en curs en el desenvolupament de nous fàrmacs contra el UM.**

Diana	Fàrmac	Bases moleculars	Resultats previs	Conclusió	Fase	Cita
<b>c-MET</b>	Crizitonib	Sobreexpressió del receptor en les cèl·lules de UM	Inhibeix la migració <i>in vitro</i> però no redueix creixement tumoral ben establert <i>in vivo</i>	Candidat adjuvant amb altres TKi com IGFR-1	II	95,113
<b>c-KIT + VEGFR + PDGFR</b>	Sunitinib	Sobreexpressió d'aquests receptors en les cèl·lules de UM	Millor supervivència final en el grup pacients < 60 anys	Candidat a adjuvant amb altres teràpies com radioteràpia	II	114
<b>IGFR1</b>	Cixutumumab	Sobreexpressió de IGF1 al fetge indueix migració metastàtica	Capaç de reduir proliferació i migració <i>in vitro</i>	Important per a bloquejar la disseminació metastàtica	II	115
<b>GPCRs *</b>	FR900359	Activació aberrant de G <sub>q</sub> resulta en hiperactivació de les vies de senyalització subsidiàries	Inhibeix senyalització GPCR i dilata els bronquïols recuperant estat normal <i>in vivo</i>	Igual que en asma podria ser útil pel UM	Pre clínic	116
<b>ARF6 (GNAQ / 11)</b>	NAV-2729	Bloqueig complex senyalització GNAQ/11 evita proliferació cel·lular	Segrestant aquesta molècula no es senyalitza per la via de GPCR i s'aconsegueix inhibició proliferació	Teràpia prometedora per la clínica	Pre clínic	117
<b>PKC</b>	LXS195	La senyalització per GPCR resulta directament en la fosforilació constant de PKC subsidiària	S'aconsegueix resposta parcial en alguns pacients endarrerint la malaltia però presenta toxicitat	Cal recalculer la dosi de resposta i provar teràpia combinatòria	I	113

MEK	Selumetinib	Les mutacions de les GPRCs resulten en una senyalització constant per la via de les MAPK	S'aconsegueix endarrerir la progressió de la malaltia però no millorar la supervivència final	L'exposició continuada causa la reactivació de vies alternatives per a la proliferació	III	118
PI3K + MEK	GSK795 + Trametinib	Combinat amb un inhibidor de MEK hauria de bloquejar les principals vies de proliferació cel·lular	Resultats sinèrgics a nivell <i>in vivo</i> que avalen la combinació	Cap efecte beneficiós en humans	II	119

\* Testat en altres malalties, no en UM.

Els avanços en la comprensió de la biologia molecular del melanoma uveal han permès postular nous candidats per desenvolupar teràpies efectives contra el UM. Malgrat això, la manca d'estudis específics sobre aquesta malaltia i les diferències significatives amb el CM ha impedit millorar la supervivència final dels pacients que desenvolupen metàstasi. Així, mentre s'obtenen els resultats dels assajos clínics en curs, és necessari seguir investigant per entendre més a fons el mecanisme de la metàstasi del UM i proposar noves dianes terapèutiques alternatives.



# HIPÒTESIS

**Bases Moleculares i Estratègies Terapèutiques contra les Metàstasis  
del Melanoma Uveal**





- En els tumors primaris de melanoma uveal (UM) la presència de poblacions cel·lulars amb característiques de cèl·lules mare tumorals (CSC-Like), una alta capacitat migratòria, expressió de receptors específics (RTKs) de factors de creixement produïts en el fetge i una menor sensibilitat terapèutica, determinen la progressió tumoral i la seva capacitat metastàtica en aquest òrgan.

En conseqüència, la detecció i caracterització d'aquestes poblacions permetrà el cribatge d'inhibidors de RTKs que podrien ser efectius per combatre la malaltia.

- La secreció d'exosomes per part de les cèl·lules del tumor primari afavoreix la posterior colonització del fetge per part de les cèl·lules circulants alliberades del primari.

En conseqüència, la detecció i caracterització d'aquests exosomes permetrà esbrinar les bases moleculars i cel·lulars del tropisme de les cèl·lules de UM al fetge.



# OBJECTIUS

**Bases Moleculares i Estratègies Terapèutiques contra les Metàstasis  
del Melanoma Uveal**



- I. Analitzar els **avantatges proliferatius** que proporcionen les **mutacions** a *GNAQ* i *GNA11* en les diferents línies cel·lulars de UM.
- II. Analitzar la presència de cèl·lules **resistents a l'anoikis** d'**origen melanocític** i amb característiques de **CSC-like** i "**pseudo-EMT**", en diverses línies cel·lulars de UM *in vitro*.
- III. Analitzar la **capacitat migratòria** i l'expressió de **receptors de tirosina quinases** (RTKs) relacionats amb el tropisme al **fetge** de la població cel·lular global i de les subpoblacions de **CSC-like** *in vitro*.
- IV. Analitzar la resposta causada pels **inhibidors de proteïna quinases** en la **població global** i les subpoblacions de **CSC-like** *in vitro*, per tal d'esbrinar si podrien ser emprats com a noves estratègies terapèutiques contra el UM.
- V. Analitzar i **caracteritzar** els **exosomes produïts** *in vitro* per les diferents línies cel·lulars de UM.



# MATERIALS I MÈTODES

**Bases Moleculars i Estratègies Terapèutiques contra les Metàstasis  
del Melanoma Uveal**





# 1 CITÒMICA

## 1.1 LÍNIES CEL·LULARS

Les línies cel·lulars de melanoma uveal amb les quals es va treballar es descriuen a la **Taula M1**. Les línies de UM Mel270, OMM-2.3, OMM-2.5, OMM-1, 92.1, Mel285 i Mel290 van ser gentilment proporcionades per la Dra. Martine J. Jager del departament d'Oftalmologia de la University of Leiden, The Netherlands. La línia SP6.5 va ser cedida per la Dra. Maria Pardo de l'Hospital Clínic Universitari de la Universitat de Santiago de Compostela. Les mutacions presents van ser validades mitjançant piroseqüenciació.

**Taula M1. Línies cel·lulars de melanoma uveal.** S'indica el tipus de tumor d'on deriva la línia, l'origen tumoral, i les mutacions presents en gens *GNAQ*, *GNA11* o *BRAF*, de les línies Mel270<sup>120</sup>, OMM-2.3<sup>120</sup>, OMM-2.5<sup>120</sup>, OMM-1<sup>121</sup>, 92.1<sup>120</sup>, Mel285<sup>120</sup>, Mel290<sup>120</sup> i SP6.5<sup>121</sup>.

Línia cel·lular	Origen cel·lular		Mutació		Procedència línia cel·lular
Mel270	Primari	Ull dret	GNAQ <sup>m</sup> (Q209P)	626 A > C	Griewank
OMM2.3	Metàstasi	Fetge	GNAQ <sup>m</sup> (Q209P)	626 A > C	Jager, Leiden
OMM2.5	Metàstasi	Fetge	GNAQ <sup>m</sup> (Q209P)	626 A > C	Jager, Leiden
OMM1	Metàstasi	Hipo- dermis	GNA11 <sup>m</sup> (Q209L)	626 A > T	Luyten
92.1	Primari	Ull dret	GNAQ <sup>m</sup> (Q209L)	626 A > T	Jager, Leiden
Mel285	Primari	Ull esquerre	WT*	-	Griewank
Mel290	Primari	Ull	WT	-	Rotterdam, Liverpool
SP6.5	Primari	Ull	BRAF <sup>m</sup> (V600E)		Pelletier

\* Tumor original tenia mutació GNA11 (Q209) però la línia cel·lular és WT.

Els hepatòcits neonatals murins immortalitzats van ser proporcionats amablement per J. De Caprio, del Dana Farber Cancer Institute, Boston. Aquestes hepatòcits van ser obtinguts a partir de la inserció de la proteïna SV40 Large T antigen i permetia mantenir hepatòcits en cultius estables <sup>122,123</sup>.

## MATERIALS I MÈTODES

La línia L-M(TK) de fibroblasts murins (L-Fibroblasts) procedents del teixit connectiu subcutani va ser cedida per la Dra Mireia Duñach del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la UAB, Bellaterra, Barcelona.

### 1.2 CULTIUS CEL·LULARS

Les línies cel·lulars de melanoma uveal van ser cultivades en adhesió al substrat plàstic (*Falcon*) amb medi complet DMEM:F12 (HAM) (*Life*) complementat amb un 5% (v/v) de sèrum boví fetal SBF (*Life*), prèviament inactivat a 56°C durant 30 min. Els hepatòcits immortalitzats i els L-Fibroblasts van ser crescuts en condicions d'adhesió al plàstic amb DMEM complementat amb un 10% de SBF prèviament inactivat a 56°C durant 30 min. Tots els cultius es van incubar a 37°C en una atmosfera saturada d'humitat i un 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> en aire.

Els stocks de les línies cel·lulars es van créixer adherides al plàstic tractat (*Falcon*). Abans d'arribar a la confluència màxima, el medi de cultiu fou aspirat i les monocapes rentades amb PBS (2 vegades) i es van desenganxar les cèl·lules amb Tripsina-EDTA (0,05%) (*Biowest*). El temps d'exposició a la tripsina per desenganxar les cèl·lules va ser variable per a cadascuna de les línies, generalment entre 2 a 5 min a 37°C. La suspensió cel·lular es va transferir a un tub afegint-hi 2 volums de medi complet i es va centrifugar durant 5 min a 300 x g. A continuació el pèl·let es va resuspendre en medi complet i es va sembrar la dilució adequada en les plaques corresponents als experiments.

Es van realitzar controls freqüents de micoplasma mitjançant PCR per descartar contaminacions amb aquests bacteris.

#### 1.2.1 DESCONGELACIÓ I CRIOPRESERVACIÓ DE CÈL·LULES

Per a la descongelació ràpida de cèl·lules, els criotubs es van transferir a un bany a 37 °C. Un cop descongelades es van resuspendre amb

10 mL de medi complet i es van centrifugar durant 5 min a 300 x g. Finalment es van sembrar en una placa d'acord amb la densitat cel·lular desitjada.

Per la preservació a llarg termini (criopreservació), es van utilitzar passis baixos de les cèl·lules en cultiu. Les suspensions cel·lulars es van centrifugar en un tub falcon a 300 x g 5 minuts i es va resuspendre el pèl·let en medi de criopreservació amb 90 % de SBF i 10 % (v/v) de DMSO com a crioprotector. Aproximadament, es van dispensar 1.8 mL de la suspensió cel·lular amb  $1\text{-}2\cdot 10^6$  cèl·lules en cada criotub. Pel procés de congelació, els criotubs es mantien a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en caixes de Cryobox de Nalgene® (*Sigma*) durant almenys 4 h en un contenidor que conté isopropanol per tal d'anar baixant la temperatura gradualment. Posteriorment, es traspassaven els tubs a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  en tancs de nitrogen líquid.

### 1.2.2 OBTENCIÓ DE MEDIS CONDICIONATS

Per a l'obtenció de medi condicionat, les monocapes subconfluentes (aproximadament al 80%) en plaques de 100mm es van rentar amb PBS 2 vegades i es van afegir 5mL de medi sense SBF i es van incubar 60h. Llavors, el medi fou recollit, centrifugat a 500 x g durant 5 min per eliminar els detritus cel·lulars i després de recollir el sobrenedant se'n van fer alíquotes i es va guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 1.2.3 TEST DE MICOPLASMA MITJANÇANT PCR

Per als tests de micoplasma realitzats periòdicament cada 3 mesos es van mantenir condicions d'esterilitat i es va irradiar el material emprat a un Stratalinker 1800 (*Stratagene*) a 9000 joules abans d'utilitzar-lo. Vam utilitzar el sistema d'amplificació per PCR <sup>124</sup> a través d'una mescla de reacció amb 2  $\mu\text{L}$  de medi obtingut del cultiu cel·lular a analitzar amb un volum final de 25  $\mu\text{L}$  [2.5  $\mu\text{L}$  de T10x (*Roche*), 0.75  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM (*Roche*), 2.5  $\mu\text{L}$  de dNTPs 1mM (*Invitrogene*), 1  $\mu\text{L}$  d'encebadors 5  $\mu\text{M}$  contra la seqüència de Mycoplasma i 0.15  $\mu\text{L}$  de Taqman (*Roche*)]. Es va amplificar la seqüència d'ADN en un termociclador (*Applied Biosystems*) amb un

## MATERIALS I MÈTODES

programa de 35 cicles amb la següent seqüència: 1 minuts a 95°C, 1 minut a 55°C i 1 minut 30 segons a 72 °C, iniciat per un pas de 5 minuts a 95 °C i acabat amb 5 minuts a 72°C. Després, es van córrer 9 µL de la reacció resultant amb 1 µL de tampó de càrrega 10x (*Takara*) en un gel d'acrilamida al 6% amb tampó TAE (Tris 40 mM, àcid acètic 20 mM i EDTA 1mM). Finalment, es va tenyir el gel amb una solució de bromur d'etidi i es va avaluar la presència de la banda corresponent a micoplasma a 500 parells de bases en el GelDoc EZ System (*BioRad*).

### 1.3 ASSAIGS DE VIABILITAT I PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

La viabilitat cel·lular va ser mesurada per diferents mètodes depenent de cada situació.

#### 1.3.1 BLAU TRIPAN

Per determinar les concentracions de cèl·lules viables es va fer servir la tinció amb el colorant d'exclusió vital blau de tripan (*Sigma*), diluint una alíquota de la suspensió cel·lular amb aquest colorant. Amb aquesta tinció, les cèl·lules mortes quedaven tenyides de blau a causa de la penetració del colorant per la membrana cel·lular. Per contra, les cèl·lules vives presentaven una membrana cel·lular intacta que els permetia excloure el colorant. El recompte cel·lular es va realitzar utilitzant una cambra de Neubauer de Blaubrand® (*Sigma*). El número de cèl·lules per mL es va calcular fent servir la fórmula següent: Concentració (cèl·lules / mL) = nombre de cèl·lules viables contades, multiplicat pel factor de dilució utilitzat, multiplicat pel volum de la cambra (10<sup>4</sup>), dividit entre el nombre de quadrants contats.

#### 1.3.2 VIOLETA CRISTALL

Per calcular el nombre de cèl·lules adherides al plàstic que sobreviuen a un tractament o cultivades en determinades condicions, es va fer servir el mètode de tinció per violeta cristall <sup>125</sup>. Aquest mètode es basa en que les cèl·lules mortes es desenganxen del substrat i només es tenyeixen les vives amb el colorant catiònic que s'uneix a proteïnes

i DNA. Així, al temps indicat, es retirava el medi de cultiu i es rentaven les cèl·lules adherides amb PBS dues vegades. A continuació, es tenyien amb una solució de violeta cristall 0.1% (p/v) (*Sigma*) en Metanol 20% (v/v) durant 10 min. Després de la tinció vam rentar l'excés de violeta cristall amb H<sub>2</sub>O i vam deixar assecar a l'aire. Per quantificar les cèl·lules tenyides, vam solubilitzar els cristalls de les plaques amb SDS 10% (p/v) (*National Diagnostics*) mantenint les plaques en agitació. Vam mesurar l'absorbància en un espectrofotòmetre de placa (*Biotek*) a una longitud d'ona de 570 nm.

### 1.3.3 WST-1

A través de l'assaig colorimètric WST-1 <sup>126</sup> vam analitzar el nombre de cèl·lules viables adherides al substrat després dels tractaments indicats o en determinades condicions de cultiu *in vitro*. Aquest assaig es basa en la reducció metabòlica de les salts de tretazoli per l'enzim mitocondrial succinat dehidrogenasa de les cèl·lules vives, generant formazan, que es de color. Així, al temps indicat s'afegeix directament als cultius el reactiu WST-1 (1:10 v/v) i s'incuba durant 2-4h hores. La quantitat de formazà resultant és proporcional al nombre de cèl·lules viables <sup>127</sup>. Finalment es va quantificar el resultat de l'assaig llegint l'absorbància a 440 nm amb un espectrofotòmetre de placa.

### 1.3.4 BRDU

A través de l'assaig de cicle cel·lular per BrdU (*Roche*) es va analitzar el nombre de cèl·lules viables que seguien adherides al substrat després dels tractaments farmacològics o les diferents condicions de cultiu emprades <sup>128</sup>. Aquest mètode es basa en la incorporació de l'anàleg de la timidina 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) en l'ADN cel·lular durant la seva divisió en fase S. La posterior detecció amb un immunoassaig del seu residu etinil per part d'anticossos específics conjugats amb un substrat o fluorocroms permet la quantificació i extrapolació de la viabilitat cel·lular. En el nostre assaig es va incubar la mostra durant 6 hores amb la solució de BrdU i es va utilitzar la tècnica ELISA per quantificar la viabilitat cel·lular. A través d'una

incubació secundària amb un anticòs anti-BrdU-POD durant 90 minuts i la reacció amb un substrat es va obtenir un valor d'absorbància resultant en un espectrofotòmetre de placa a 370 nm.

### **1.4 ANÀLISI D'ACTIVITAT DE L'ENZIM ALDH**

L'activitat dels canals d'exclusió en les melanosferes i la població global va ser calculada mitjançant l'assaig de l'activitat ALDH (aldehid deshidrogenasa). La família d'enzims ALDH metabolitza els aldehids exògens i endògens prevenint la seva tòxica acumulació a l'interior cel·lular <sup>129</sup>. A través del kit colorimètric ALDH de *Sigma-Aldrich* vam mesurar la quantitat de NADH generat a partir de l'oxidació de NAD pels enzims ALDH en les nostres cèl·lules. Seguint les indicacions del kit vam expressar l'activitat colorimètrica a 450 nm del NADH resultant, i vam expressar l'activitat ALDH dividint-la entre el temps i volum utilitzats.

### **1.5 TRACTAMENTS CEL·LULARS *IN VITRO***

#### **1.5.1 RESISTÈNCIA A L'ANOIKIS**

Per determinar la supervivència cel·lular a la mort causada per l'anoikis vam condicionar plaques de cultius amb poly-2-hydroxyethyl methacrylate (polyHema) (*Sigma*) que impedia la adhesió cel·lular al substrat. Per això, es van tractar amb una solució 1.2% de PolyHema diluït amb EtOH 95% i es van incubar a 32°C en un incubador sec durant 48 hores. Quan el polímer estava sec vam rentar la placa amb PBS i vam sembrar les cèl·lules a la concentració desitjada amb medi DMEM + 5% SBF. 24 hores després, vam recollir les cèl·lules del sobrenedant, les vam centrifugar a 300 x g i vam calcular el percentatge de cèl·lules viables amb blau tripan. Aquest procés es va repetir a partir de les cèl·lules dels sobrenedants incubant-les en aquestes condicions durant 96h.

### 1.5.2 CULTIU 3D (ESFEROIDES I MELANOSFERES)

El creixement de cèl·lules en suspensió es va realitzar amb plaques de plàstic de 6 pous prèviament tractades amb polyHema<sup>130</sup>. Es van sembrar  $5 \cdot 10^3$  cèl·lules per pou amb 2 mL de medi DMEM:F12 (HAM) sense SBF complementat amb hEGF (2 ng/mL), bFGF (2 ng/mL), B27 (1x), Heparina (4 µg/mL) i Insulina (4 µg/mL); d'ara endavant anomenat medi de melanosferes. Tots els suplementes van ser adquirits a *Sigma* excepte el B27 que era d'*Invitrogen*. A les 8h es van descartar els pous que contenien agregats de 4-8 cèl·lules. Després de 10 dies, les esferes formades van ser recollides i mecànicament disgregades abans de ser centrifugades a 300 g durant 5 minuts. El pèl·let fou resuspès i contat abans de tornar a sembrar les cèl·lules en les mateixes condicions d'origen. Aquest procés es va repetir fins a obtenir 8-9 generacions d'esferoides.

### 1.5.3 ASSAIG DE LA CAPACITAT CLONOGÈNICA

L'assaig de la capacitat clonogènica es va utilitzar per valorar la capacitat de les cèl·lules de créixer a baixa densitat. Per això, es van sembrar  $1 \cdot 10^3$  cèl·lules per pou en plaques de 6 pous amb medi complet amb 5% SBF. Quan les colònies van ser visibles a ull nu (aproximadament uns 14 dies després de la sembra) es van fixar i tenyir amb una solució de violeta cristall 0.1% en Metanol 20% durant 10 min. Posteriorment es va rentar l'excés de violeta cristall amb H<sub>2</sub>O i es van deixar assecar les plaques. Després d'escanejar les plaques vam comptar les colònies de forma manual amb el software Image J i vam solubilitzar el violeta cristall com s'explica en l'apartat del violeta cristall (Mètodes 1.3.2).

### 1.5.4 CRIBRATGE D'INHIBIDORS DE PROTEÏNA QUINASES

Per estudiar l'efecte en la viabilitat cel·lular causat pels inhibidors de proteïna quinases de la llibreria *Screen-Well® Kinase Inhibitor Library; Enzo, Catalog #BML-2832-0100* vam sembrar  $8 \cdot 10^3$  cèl·lules en plaques de 96 pous amb medi DMEM amb 5% SBF. L'endemà, vam retirar el medi i vam afegir els 80 fàrmacs per triplicat a una



## MATERIALS I MÈTODES

concentració de 10  $\mu\text{M}$  (en DMSO) diluïts en DMEM amb 1% SBF. Pel control negatiu vam substituir el medi DMEM amb 5% SBF per 100  $\mu\text{L}$  de medi DMEM amb 1% SBF i DMSO (1:1000). Vam incubar les cèl·lules durant 48 hores i vam calcular la seva supervivència amb l'assaig metabòlic WST-1.

Per tal de calcular i posteriorment validar les concentracions IC50 dels fàrmacs seleccionats vam sembrar  $8 \cdot 10^3$  cèl·lules en els mateixes condicions i vam afegir les concentracions de fàrmac adients per a cada situació. Després de 48 hores d'incubació vam determinar la supervivència cel·lular per WST-1 o BrdU.

### 1.5.5 INDUCCIÓ DE LA TRANSICIÓ EPITELI-MESÈNQUIMA

Pels experiments on es va estudiar la transició EMT es van afegir 2 ng/mL de TGF- $\beta$ 1 (*Calbiochem*) en el cultiu cel·lular durant 60 hores. Pel western blot de validació de l'efecte del TGF- $\beta$  en canvi, es va utilitzar la mateixa concentració però un temps d'incubació menor, de 30, 60 o 90 minuts.

Alternativament també es va mirar la inducció de la EMT causada pel tractament amb IGF-1/2 (*ProSpec*). En aquest cas es van utilitzar tractaments curts d'entre 5 i 20 minuts i una concentració de 100 nM en ambdós casos.

## 1.6 ANÀLISIS DE MIGRACIÓ

### 1.6.1 ASSAIG DE MIGRACIÓ PER TRANSWELLS

Aquests experiments es van realitzar seguint el principi de la càmera de Boyden, que es basa en l'ús de dos compartiments separats per una membrana porosa que les cèl·lules poden travessar <sup>131</sup>. Les cèl·lules sembrades en el compartiment superior travessen la membrana de policarbonat quan són estimulades per un quimioatracient present al compartiment inferior. Vam utilitzar transwells (Costar Transwell Permeable Supports, *Corning*) amb una membrana de policarbonat amb porus de 8  $\mu\text{m}$  de diàmetre, prèviament condicionats amb un 1%

de gelatina (*Sigma*) per evitar que les cèl·lules travessessin la membrana inespecíficament.

Es van sembrar a la part superior del transwell, en placa de 24 pous,  $2 \cdot 10^5$  cèl·lules en 500  $\mu\text{L}$  de medi DMEM sense SBF. En els casos on es va tractar les cèl·lules amb els inhibidors contra receptors específics [Crizitonib (*Adooq*), AMD 3100 (*Millipore*), GSK 705A (*Selleckchem*) i MC-A12 (*ImClone*)], aquests es van afegir 1 hora abans de sembrar les cèl·lules. A la part inferior del transwell, i per tant en contacte amb el fons de la placa hi vam posar 600  $\mu\text{L}$  de medi amb el quimioatracient considerat en cada cas. Com a atracció inespecífica vam utilitzar DMEM amb un 10 % de SBF. En els casos on es van utilitzar molècules d'atracció específiques com HGF (*R&D Systems*) i SDF-1 (*R&D Systems*) es van diluir amb DMEM sense SBF. Alternativament, els medis condicionats de fibroblasts, hepatòcits o cèl·lules de UM es van utilitzar directament sense concentrar afegint-ne 600  $\mu\text{L}$  a la part inferior de les plaques amb transwells.

Passades 16 hores d'incubació vam retirar les cèl·lules de la part superior dels transwells amb un cotonet i els vam rentar amb PBS per eliminar les cèl·lules que no havien migrat. Tot seguit, vam fixar i tenyir les cèl·lules migrades de la part exterior amb violeta cristall, com s'ha explicat abans. Finalment, vam rentar els transwells amb  $\text{H}_2\text{O}$ , vam tallar les membranes i vam muntar-les en un portaobjectes. Aquestes preparacions es van observar en un microscopi òptic Eclipse 80i (*Nikon*) i es van fotografiar 4 camps representatius de cada membrana a 20 augments. Per quantificar la migració llavors, vam desmuntar les preparacions, destenyir els transwells i mesurar l'absorbància tal com s'ha explicat per al violeta cristall.

## 1.7 OBTENCIÓ D'EXOSOMES

Per obtenir els exosomes alliberats per les cèl·lules de UM era necessari sembrar les cèl·lules en plaques de 150 mm de diàmetre en condicions normals. Quan aquestes adquirien una confluència

## MATERIALS I MÈTODES

aproximada del 75% es retirava el medi amb SBF i es rentaven les plaques dues vegades amb DMEM:F12 (HAM) sense SBF. A continuació es retornaven les cèl·lules a l'incubador amb 20 mL de medi sense SBF durant 6 hores i es feia un últim canvi de medi, deixant-les nou amb 20 mL de DMEM sense SBF. Després de 60 hores es recollia el medi de les plaques en incubació, que contenia els exosomes secretats per les cèl·lules, i es procedia a una sèrie de centrifugacions per tal d'aïllar-ne les microvesícules contingudes.

### 1.7.1 AÏLLAMENT D'EXOSOMES

Després de recollir el medi condicionat pel cultiu *in vitro* de les cèl·lules de UM incubades a 37°C durant 60 hores, es centrifugava el medi a 300 x g durant 10 minuts a 4°C per descartar el pèl·let cel·lular. Seguidament, es traslladava el sobrenedant a tubs de 13 mL i es centrifugava en una centrífuga d'alta velocitat (*Sorvall*) a 15000 x g durant 20 minuts a 4°C per eliminar restes de cèl·lules i detritus cel·lulars. Després de recuperar de nou el sobrenedant es filtrava el medi a través d'un filtre de 0.22 µm (*Millex*) per eliminar les partícules superiors a 200 nm. A continuació, es transferia el sobrenedant a tubs d'ultracentrifugació i es centrifugava la mostra a una ultracentrífuga Optimal 100XP (*Beckman Coulter*) en un rotor basculant a 120000 x g durant 70 minuts a 4°C. Aquest procés es repetia fins a ultracentrifugar tot el medi. Finalment, es resuspensia el pèl·let amb PBS i es realitzaven dos rentats en les mateixes condicions per obtenir els exosomes nets en el pèl·let <sup>79</sup>.

### 1.7.2 MARCATGE D'EXOSOMES

Els exosomes aïllats es van marcar utilitzant el colorant fluorescent verd PKH67 del kit *Green Fluorescent Cell Linker* (*Sigma*) d'acord amb el protocol del fabricant. Es van resuspendre els pèl·lets d'exosomes amb 1 mL del diluent C del kit i es van afegir 6 µL de marcador fluorescent. Després del marcatge, les mostres es van diluir amb 10% de BSA en PBS per aturar la incorporació de PKH67. Finalment, per eliminar el PKH67 no incorporat es van transferir les mostres a tubs

d'ultracentrifugació i es van rentar 3 vegades amb PBS utilitzant el mateix procediment que en l'aïllament d'exosomes.

### 1.7.3 CRIOFIXACIÓ D'EXOSOMES

Per preparar els exosomes prèvia observació per TEM vam realitzar un rentat extra amb tampó fosfat 100 mM (pH = 7.4) i vam fixar les mostres amb tampó PFA 2%. Vam conservar les mostres a 4°C fins al moment de la seva utilització. Llavors, vam aplicar una gota de la suspensió amb exosomes a la superfície de carboni d'una xarxa de coure Lacey Carbon 300 (*Ted Pella*). Posteriorment, es va dur a terme la crioimmobilització dels exosomes amb la congelació de plom en età líquid mitjançant el Vitrobot Mark III (*FEI Company*). La mostra es va mantenir al 100% d'humitat i l'excés de líquid es va eliminar automàticament amb paper de filtre. Finalment, la mostra vitrificada es va emmagatzemar en nitrogen líquid fins a la seva observació en el microscopi crio-electrònic.

### 1.7.4 TEM (MICROSCOPI DE TRANSMISSIÓ ELECTRÒNICA)

Per a la observació dels exosomes de la malla de Lacey Carbon 300 es va transferir la mostra congelada a un microscopi electrònic Tecnai F20 (*FEI Company*) a través d'un cryo-holder (Gatan, Pleasanton, EUA). Es va aplicar un voltatge de 200 kV i una temperatura entre -179 i -170°C per obtenir les imatges finals. Aquestes, es van enregistrar amb una càmera Eagle CCD de 4096 × 4096 píxels (*FEI Company*).

### 1.7.5 CAPTACIÓ D'EXOSOMES DE UM PER HEPATÒCITS

Els hepatòcits del ratolí es van sembrar en condicions de subconfluència en cobreobjectes en una placa de 24 pous per tractar-los amb exosomes de la subpoblació de melanosferes de la línia cel·lular de UM Mel270 a diferents temps. L'endemà, es van afegir els exosomes prèviament marcats amb PKH67 (0,08 µg/µL) en 325 µl de DMEM sense SBF i es van retornar les cèl·lules a l'incubador durant tota la nit. Després de la incubació durant els temps indicats es va

## MATERIALS I MÈTODES

retirar el medi i les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS complementat amb  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . Es van fixar les preparacions amb PFA al 4% durant 15 minuts i es van tornar a rentar les mostres dues vegades durant 5 minuts amb PBS. Tot seguit, es va fer una incubació amb Falloïdina (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en PBS-BSA 1% durant 30 minuts a temperatura ambient per tal de marcar el citoesquelet de F-actina. A continuació, es van realitzar dos rentats de 10 minuts amb PBS i un últim amb PBS – DAPI (300 ng/mL) (*Sigma*) per poder visualitzar els nuclis cel·lulars. Finalment, les mostres es van muntar en un portaobjectes amb una gota de Mowiol (*Calbiochem*) i es van fotografiar al microscopi de fluorescència Eclipse 80i (*Nikon*) o al confocal TCS SP5 model DMI6000 (*Leica*).

### 1.8 CITOMETRIA DE FLUX

Les anàlisis de citometria de flux es van dur a terme en un citòmetre Gallios Analyzer de *Beckman Coulter* equipat amb 3 làsers i 10 detectors de fluorescència.

#### 1.8.1 ANÀLISI DEL CICLE CEL·LULAR

Per l'anàlisi de cicle cel·lular es va utilitzar el iodur de propidi (IP), un agent fluorescent que s'intercala en l'ADN amb una excitació a 535 nm i amb un espectre d'emissió a 617 nm <sup>132</sup>. Sense permeabilitzar la membrana cel·lular el IP només penetra en aquelles cèl·lules mortes i és indicador de viabilitat. En canvi, quan permeabilitzes la membrana, totes les cèl·lules incorporen IP i emeten un espectre diferent segons la quantitat de ADN que contenen, que depèn del cicle cel·lular on es troben. Així, es van sembrar les cèl·lules en cultiu i abans d'assolir una confluència màxima es van tripsinitzar i centrifugar 5 minuts a 400 g a 4°C. Es va fixar el pèl·let amb 0.5 mL d'EtOH en fred durant 15 minuts per facilitar la incorporació de IP. Després de centrifugar les cèl·lules de nou en les mateixes condicions es van resuspendre en 0,5 mL de PBS 1x i es van afegir 1.3  $\mu\text{g}$  de RNasa (*Invitrogene*) incubant la mostra en el bany a 37°C durant 30 minuts. Finalment, es van afegir 13  $\mu\text{L}$  de Iodur de propidi 1mg/mL (*Sigma*) durant 5 minuts i es va

avaluar la fase del cicle cel·lular en la que es trobaven les cèl·lules en el citòmetre Gallios (*Beckman Coulter*).

### 1.8.2 DETECCIÓ DE RECEPTORS CEL·LULARS

Per l'anàlisi dels receptors per citometria de flux vam sembrar  $5 \cdot 10^5$  cèl·lules en una placa de 6 pous en medi amb 5% SBF i les vam incubar fins a assolir una confluència del 75%. Vàrem desenganxar les cèl·lules amb PBS-EDTA per no afectar als epítops de la membrana i vam centrifugar les cèl·lules 5 minuts a 400 g a 4°C. Després vam resuspendre el pèl·let amb la concentració adient de l'anticòs CD133-FITC (*Miltenyi #REA753*) diluït amb PBS i vam incubar les cèl·lules 15 minuts a temperatura ambient en la foscor. Per últim, vam tornar a centrifugar les cèl·lules en les mateixes condicions i vam resuspendre el pèl·let amb 0.5 mL de PBS abans de determinar la presència de CD133 en les cèl·lules de UM per citometria de flux.

## 2 GENÒMICA

### 2.1 SILENCIAMENT ESTABLE DEL GEN *GNAQ*

Per transfectar les línies cel·lulars de manera estable sembràvem  $3 \cdot 10^5$  cèl·lules en una placa de 6 pous i quan s'arribava a una confluència superior al 70% afegíem els vectors lentivirals amb el gen d'interès. L'endemà, afegíem el medi amb l'antibiòtic de selecció per obtenir únicament les cèl·lules transfectades i analitzàvem l'eficiència de la transfecció. Els vectors utilitzats per a la transfecció de les cèl·lules de UM es detallen en la **Taula M2**.

**Taula M2. Plasmidis utilitzats per a les transfeccions.** S'indica el vector, la utilització, la casa comercial i la resistència incorporada.

shGNAQ	Vector	Adquisició	Seqüència	Resistència
#1	pLKO.1	Dharmacon	TTAAGAACAGA ATAACCGAGG	Puromicina ( <i>Invitrogene</i> )
	GNAQ	Lentiviral		
	ARNsh	TRCN0000036759		
#2	pLKO.1	Dharmacon	ATAGCATTCCT GATTCCAGG	Puromicina ( <i>Invitrogene</i> )
	GNAQ	Lentiviral		
	ARNsh	TRCN0000036760		
#3	pLKO.1	Dharmacon	ATTGTGCTCAT ACTTGTATGC	Puromicina ( <i>Invitrogene</i> )
	GNAQ	Lentiviral		
	ARNsh	TRCN0000036761		

#### 2.1.1 AMPLIFICACIÓ DE PLASMIDIS

Els vectors lentivirals shGNAQ van ser comprats en forma de glicerolat a la casa *Dharmacon*. Per tal de multiplicar la quantitat de material genètic i caracteritzar-los, primerament, es varen plaquejar en plaques de LB (Luria Broth)-agar amb l'antibiòtic ampil·lina 100 mg/mL. Vam incubar les plaques a 37°C tota la nit perquè es formessin colònies i, tot seguit, vam repicar 3 colònies de cadascun dels shGNAQ en 3 mL de LB líquid amb ampil·lina i els vam incubar tota la nit a 37°C i en agitació. A l'endemà vam fer l'aïllament de l'ADN plasmídic amb el kit E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I (*Omega*) seguint les instruccions del fabricant. Per comprovar la identitat del plasmidi vam digerir-lo amb enzims de restricció (NdeI i BamHI) i vam

comprovar que tenia la mida que corresponia. Les digestions les vam realitzar a partir de 5 µL d'ADN durant 1 h a 37 °C i els fragments els vam analitzar mitjançant una electroforesi d'àcids nucleics. Per l'electroforesi vam utilitzar gels d'agarosa a l'1% en tampó Tris-Acetata-EDTA (TAE) i vam emprar bromur d'etidi com a agent intercalant de l'ADN per visualitzar la mostra.

Abans de procedir amb una major producció vam enviar-ho a seqüenciar per evidenciar la presència de la seqüència diana contra el gen GNAQ. Un cop confirmada la seqüència, es va procedir a obtenir més quantitat dels plasmidis mitjançant una maxiprep (preparació a partir de 200 ml de medi LB-Ampicil·lina) amb el kit de *Qiagen* Plasmid Maxi Kit.

### 2.1.2 PRODUCCIÓ DE LES PARTÍCULES LENTIVIRALS SHGNAQ

Per obtenir les partícules lentivirals es va realitzar una triple transfecció sobre la línia HEK293T (línia empaquetadora) amb: un plasmidi d'empaquetament de segona generació psPAX2 (*Addgene*), un plasmidi d'embolcall pMD2.G (*Addgene*), tots dos amb resistència a l'ampicil·lina, i el plasmidi viral que codifica per el ARNsh (*Dharmacon*). Breument, la transfecció es va dur a terme amb Polietilenimina (PEI) (25 KDa, lineal de *Polysciences Inc*) (1mg/mL). Cada plasmidi viral (shGNAQ) es va transfectar sobre cultius semiconfluent de cèl·lules HEK 293T sembrades en plaques petri de 10 cm. Primer de tot, es va diluir el PEI (3 µL/µg ADN) en 500 µL de medi OPTIMEM i es va incubar 5 min a temperatura ambient. Tot seguit, es va afegir la barreja dels ADNs. Per cada placa es van utilitzar 2.5 µg de pMD2.G, 7.5 µg de psPAX2 i 10 µg del plasmidi viral que conté el shGNAQ. Es van barrejar amb l'ajut d'un vòrtex i es van afegir gota a gota sobre el cultiu de HEK293T que contenia 4.5 mL de medi nou. Es van incubar les cèl·lules unes 16 hores a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> i l'endemà, es va canviar aquest medi de transfecció per medi fresc. Després de 48 hores es va recollir aquest medi i es va torna a posar



## MATERIALS I MÈTODES

medi nou a les plaques per recollir-les el següent dia. Es van barrejar tots dos medis i es van centrifugar a  $500 \times g$  5 min a  $4^{\circ}\text{C}$  per descartar les cèl·lules que provenien del cultiu. Tot seguit, el sobrenedant, que contenia les partícules virals, es va filtrar amb un filtre de baixa absorció de  $0.45 \mu\text{m}$  i es va concentrar unes 100 vegades afegint el reactiu PEG-it (*System Biosciences*). Un cop concentrat, es van fer alíquotes i es van guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$  fins al moment de la transducció de les cèl·lules.

### 2.1.3 TRANSDUCCIÓ I INFECCIÓ LENTIVIRAL

Per a la transducció cel·lular es van sembrar  $2 \cdot 10^5$  cèl·lules en una placa de 6 pous i l'endemà es va retirar el medi DMEM:F12 amb 5% SBF per afegir-hi 1 mL de medi OPTIMEM amb  $8 \mu\text{g/mL}$  de polibré (*Sigma*) 4 hores abans de la transducció. Transcorregut el temps es van afegir  $10 \mu\text{L}$  dels lentivirus concentrats. Després de la incubació amb les partícules virals durant la nit, vam retirar el medi i vam canviar-lo per medi amb 5% SBF. Finalment, després de 24 hores vam canviar el medi per DMEM:F12 amb 5% SBF amb l'antibiòtic de selecció puromicina (ja que els vector shGNAQ expressava el gen de resistència a la puromicina) per evitar el creixement de les cèl·lules no transfectades. Paral·lelament, es van realitzar transduccions amb el vector buit i es van deixar sempre 2 pous sense transduir, per tal de verificar que les cèl·lules sense el gen de resistència a la puromicina morien. La selecció clonal va tenir lloc durant 30 dies aproximadament, depenent de la línia cel·lular. El medi de selecció amb l'antibiòtic de resistència es va canviar dos cops per setmana. Després d'aquest període, es van aïllar o bé el conjunt de cèl·lules supervivents o bé els clons individuals. Posteriorment, es van amplificar les cèl·lules resistents i es va comprovar l'eficàcia de la transfecció analitzant els nivells de la proteïna d'interès per western blot.

## 2.2 ANÀLISIS D'EXPRESSION GÈNICA

### 2.2.1 EXTRACCIÓ D'ARN

L'ARN total el vam obtenir utilitzant el mètode de TRIzol (*Molecular Research Center, Inc*)<sup>133</sup>. El TRIzol és una solució monofàsica de fenol i isotiocinat de guanidina que solubilitza el material biològic cel·lular i desnaturalitza les proteïnes. La posterior addició del cloroform separa les fases orgànica (proteïnes) i aquosa (ARN) de manera eficaç deixant en la part intermèdia l'ADN (molt similar a l'extracció amb fenol: cloroform: alcohol isoamil). Així, es pot aïllar l'ARN total de les cèl·lules per al seu anàlisi. A partir de cèl·lules adherides, nosaltres vam tripsinitzar i resuspendre el pèl·let en TRIzol per separar-ne les seves fases. Alternativament, en les melanosferes vam recollir el pèl·let cel·lular per centrifugació sense tripsina i vam afegir-hi la solució de TRIzol al pèl·let cel·lular. La quantitat de TRIzol va variar entre 500 i 1000 µL depenent del nombre de cèl·lules i després hi vam afegir mig volum de cloroform (*Merck*). Vam barrejar la mostra i la vam centrifugar-la a 13000 rpm 15 minuts a 4°C. Vam recuperar la fase aquosa i vam precipitar l'ARN afegint isopropanol (v/v) i centrifugant-la de nou en les mateixes condicions. A continuació vam rentar el pèl·let amb EtOH (*Merck*) 70% 3 vegades i el vam assecar escalfant-lo a 65°C en el termoblock. Finalment, vam resuspendre el pèl·let sec amb H<sub>2</sub>O i vam quantificar la quantitat d'ARN total en el Nanodrop® ND-1000 (*Thermo Fisher*). Les mostres es van congelar a -80°C fins a utilitzar-les.

### 2.2.2 RT-qPCR

A partir de l'ARN total obtingut vam sintetitzar una cadena d'ADN complementari (ADNc) mitjançant una reacció de transcripció inversa amb M-MLV (*Invitrogene*). Vam utilitzar el sistema de transcripció a través de l'addició de nucleòtids amb un encebador aleatori que facilita el seu aparellament de forma complementària amb la cadena d'ARN de les mostres. Vam utilitzar-ne 1 µg amb 5 µM d'encebador aleatori (*Invitrogene*) i inhibidor d'RNasa (*Invitrogene*) en un volum final 20 µl

## MATERIALS I MÈTODES

[4 µL de tampó 5x (*Invitrogene*), 2 µL de DTT 0.1M (*Invitrogene*), 2 µL de dNTPs 5mM (*Invitrogene*) i 0.5 µL de M-MLV 200 U/µL (*Invitrogene*)]. Després d'homogeneïtzar la mescla de reacció vam utilitzar un programa al termociclador (*ML Research*) de 60 min a 37°C i 5 min a 95°C per obtenir l'ADNc. Finalment vam refredar els tubs a 4°C i vam conservar la mostra a -20°C fins a la reacció de la PCR.

La qPCR realitzada per analitzar la quantitat d'ARNm de cadascun dels gens es va fer utilitzant la solució de LightCycler 480 SYBRGREEN Master (*Roche*) en un equip LightCycler 480 II (*Roche*) emprant els encebadors (en anglès, *primers*) específics per a cadascun dels gen indicats a continuació (**Taula M3**). Tots els encebadors es van comprar a *Life Technologies* i varen ser utilitzats a una concentració de 5µM. Els nivells d'expressió d'ARN relatius es van calcular mitjançant el mètode Ct comparatiu normalitzat a l'expressió del gen *L32* (*housekeeping*) o *GAPDH* amb la fórmula:  $2^{-(\Delta Ct)} \pm S.D$  <sup>134</sup>.

**Taula M3. Encebadors (en anglès, primers) utilitzats en la qPCR. S'indica la seqüència amplificada per cada gen.**

Gen	Direcció	Seqüència (humà)
<i>ABCB5</i>	Forward	ATG TAC AGT GGC TCC GTT CC
	Reverse	ACA CGG CTG TTG TCA CCA TA
<i>ABCG2</i>	Forward	AGC AGG GAC GAA CAA TCA TC
	Reverse	CCT GCT TGG AAG GCT CTA TG
<i>ANGPTL4</i>	Forward	GGC TCA GTG GAC TTC AAC CG
	Reverse	CCG TGA TGC TAT GCA CCT TCT
<i>CD133</i>	Forward	GCC ACC GCT CTA GAT ACT GC
	Reverse	TGT TGT GAT GGG CTT GTC AT
<i>CD15</i>	Forward	ACT CGC AGC ACC TGG ATT AT
	Reverse	CGA GGA AAA GCA GGT ACG AG
<i>CD44</i>	Forward	AAG GTG GAG CAA ACA CAA CC
	Reverse	ACT GCA ATG CAA ACT GCA AG
<i>CD63</i>	Forward	AGC AGA TGG AGA ATT ACC C
	Reverse	CTC CCA ATC TGT GTA GTT AG
<i>c-MET</i>	Forward	GCC CAT CCT TTT CTG AAC TG
	Reverse	GGA TAC GGA GCG ACA CAT TT
<i>CXCL1</i>	Forward	CTT GCC TCA ATC CTG CAT CC

<i>CXCR4</i>	Reverse	GAA CAG CCA CCA GTG AGC TT
	Forward	GCC CTC AAG ACC ACA GTC AT
<i>FN-EDA</i>	Reverse	TGG CTC CAA GGA AAG CAT AG
	Forward	GGA GAG AGT CAG CCT CTG GTT CAG
<i>GAPDH</i>	Reverse	TCT GCA GTG TCT TCT TCA CC
	Forward	CCA TGG AGA AGG CTG GGG
<i>IGF1R</i>	Reverse	CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC
	Forward	AGG ATA TTG GGC TTT ACA ACC TG
<i>L32</i>	Reverse	GAG GTA ACA GAG GTC AGC ATT TT
	Forward	GAT CTT GAT GCC CAA CAT TGG TTA TG
<i>MITF</i>	Reverse	GCA CTT CCA GCT CCT TGA CG
	Forward	AGC CAT GCA GTC CGA AT
<i>MLANA</i>	Reverse	ACT GCT GCT CTT CAG CG
	Forward	CTC TTA CAC CAC GGC TGA A
<i>Mycoplasma</i>	Reverse	AGA CTC CCA GGA TCA CT
	Forward	GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG
<i>NANOG</i>	Reverse	CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G
	Forward	GCA GAG AAG AGT GTC G
<i>OCT-4</i>	Reverse	AGC TGG GTG GAA GAG AAC ACA G
	Forward	GAC AAC AAT GAA AAT CTT CAG GAG A
<i>Rab27A</i>	Reverse	TTC TGG CGC CGG TTA CAG AAC CA
	Forward	GGC ATT GAT TTC AGG GAA AA
<i>SNAI1</i>	Reverse	CGC TGT CGT TAA GCT ACG AA
	Forward	GGT TCT TCT GCG CTA CTG CT
<i>SNAI2</i>	Reverse	TAG GGC TGC TGG AAG GTA AA
	Forward	CAT GCC TGT CAT ACC ACA AC
<i>SOX2</i>	Reverse	GGT GTC AGA TGG AGG AGG G
	Forward	TAC CTC TTC CTC CCA CTC CA
<i>TWIST1</i>	Reverse	GGT AGT GCT GGG ACA TGT GA
	Forward	CCG GAG ACC TAG ATG TCA TTG
<i>TYRP2</i>	Reverse	CAC GCC CTG TTT CTT TGA AT
	Forward	CCG ACT ACG TGA TCA CCA CA
<i>ZEB1</i>	Reverse	TAC TTC CCA CTG CCA TAC CC
	Forward	TTC AAA CCC ATA GTG GTT GCT
<i>ZEB2</i>	Reverse	TGG GAG ACA CCA AAC CAA CTG
	Forward	CAA GAG GCG CAA ACA AGC
	Reverse	GGT TGG CAA TAC CGT CAT CC

### 3 PROTEÒMICA

#### 3.1 **OBTENCIÓ D'EXTRACTE PROTEIC**

Els extractes proteics es van obtenir per lisi cel·lular partint de pèl·lets cel·lulars congelats a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  o acabats d'obtenir per centrifugació mitjançant un *scraper*.

##### 3.1.1 LISI CEL·LULAR

Per a la lisi cel·lular es va utilitzar el tampó RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay Buffer) en presència d'inhibidors de proteases (*Roche*) i fosfatases (*Roche*) (1 pastilla de cada en 10 mL de RIPA) (**Taula M4**). Els pèl·lets es van resuspendre en un volum d'entre 50-200  $\mu\text{L}$  del tampó amb els inhibidors i es van incubar 30 min en gel. Seguidament, es van sonicar (*Hielscher*) les mostres mitjançant 4 polsos de 10 segons a una amplitud del 100 %, amb un pas intermedi de 10 seg de refredament en gel. Per últim, es van centrifugar a 13.000 rpm durant 20 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  i es va recollir el sobrenedant que contenia l'extracte proteic total. Aquestes mostres es van conservar a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  o es va seguir amb el procés.

**Taula M4. Composició del tampó de lisi RIPA**

Component	Concentració
TRIS-HCl pH 7,5	30 mM
NaCl	150 mM
Tritó X-100	1 %
Deoxicolat de Sodi	0,5 %
SDS	0,1 %
PMSF	1 mM
Leupeptina	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	0,1 mM
DTT	0,5 mM
B-Glicerolfosfat	20 mM

##### 3.1.2 QUANTIFICACIÓ PROTEICA PER BCA

La concentració de proteïna dels extractes es va mesurar mitjançant el *kit* comercial Pierce BCA Protein Assay (*ThermoFisher*). En plaques de 96 pous es va barrejar 10  $\mu\text{L}$  de mostra proteica (diluída a la

concentració adient amb H<sub>2</sub>O en cada cas) amb 200 µL de la barreja dels reactius A:B (relació 1:50) del *kit*. Es va incubar 30 min a 37 °C i posteriorment es va llegir l'absorbància en un espectrofotòmetre a 562 nm. La concentració es va determinar emprant una recta patró feta amb dilucions seriades d'albúmina.

### 3.1.3 QUANTIFICACIÓ PROTEICA PER MÈTODE BRADFORD

La concentració proteica dels medis condicionats per les anàlisis de zimografia es va determinar mitjançant el mètode descrit per Bradford el 1976 <sup>135</sup>. Per cada assaig es va preparar una recta patró amb una concentració coneguda d'albúmina (BSA, *Sigma*) en un rang de 2 a 25 µg/mL. Per al càlcul de la concentració proteica es van afegir 200 µL de mostra amb 50 µL de reactiu Bradford (*BioRad*), el qual tenyeix la proteïna present en la mostra, i es va llegir l'absorbància resultant a 595 nm en un espectrofotòmetre.

## 3.2 IMMUNODETECCIÓ PER WESTERN BLOT

La separació de proteïnes pel seu pes molecular es va fer a través de gels desnaturalitzants de poliacrilamida. Les mostres de proteïnes es van preparar barrejant 30 µg de proteïna amb tampó de càrrega de Laemmli que conté DTT a una concentració final de 100 mM i es van desnaturalitzar escalfant-les a 95 °C durant 5 minuts. Una vegada que les mostres es bullien, es van centrifugar i guardar a 4 °C. Els gels d'acrilamida consten de dues parts diferents: l'apilador i el gel separador. La primera part sempre es va preparar a la mateixa concentració d'acrilamida (4%) ja que la seva funció era recollir proteïnes. En canvi, la part del separador es va preparar a diferents concentracions d'acrilamida (7.5 - 10%) depenent del pes molecular de les proteïnes a estudiar, ja que la seva funció és ordenar aquestes proteïnes pel seu pes molecular després de la desnaturalització. Una vegada que el gel estava preparat, es va muntar al suport de gel i es va immernir en la cubeta d'electroforesi (*BioRad*), que es va omplir amb un tampó d'electroforesi (Tris-HCl 25 mM; SDS al 0.1%; glicina 0.2 M; pH 8.3). Després, les mostres es van carregar en el gel juntament amb

## MATERIALS I MÈTODES

un marcador de pes molecular i es van sotmetre a electroforesi a un voltatge constant.

Un cop finalitzada l'electroforesi, les proteïnes van ser transferides a una membrana de PVDF (*Merck*) mitjançant el pas de corrent elèctrica amb una transferència humida. Anteriorment a la transferència de proteïnes, la membrana PVDF es va submergir per primera vegada en metanol durant 1 minut seguint les instruccions del fabricant. A continuació, la membrana PVDF i el paper Wattman es van mullar en tampó de transferència (Tris-HCl 48mM, Glycine 39mM; SDS 0.04%; Metanol 20%; pH 8.3) durant 5 minuts i es va muntar la transferència de la següent manera: 2 papers wattman - membrana PVDF - gel d'acrilamida - 2 papers wattman. La transferència es va dur a terme amb un corrent elèctric de 0.35 A durant 70 minuts. Després d'aquest temps, la membrana va ser tenyida amb una solució de Ponceau de color vermell al 0.5% en àcid acètic al 1% per confirmar que les proteïnes havien estat transferides uniformement a la membrana. Després, la membrana es va rentar diverses vegades en TBS-Tween del 0.05% (TBS-T).

Per a la detecció de la proteïna desitjada, la membrana es va incubar en un 5% de llet en TBS-T (TRIS 6 g/L, NaCl 8,7 g/L amb 0.05% Tween) durant 1 hora a RT per bloquejar les unions inespecífiques. Després, es va rentar la membrana amb TBS-Tween i es va incubar la membrana amb l'anticòs primari diluït a la concentració adient amb una solució de 2.5% albúmina amb TBS-Tween durant una nit a 4°C (**Taula M5**). L'endemà, es van fer tres rentats de 10 min amb TBS-Tween i es va incubar la membrana durant 1 h a temperatura ambient amb l'anticòs secundari, preparat també en solució de bloqueig (5% llet amb TBS-T) en una dilució 1:10000. Els anticossos secundaris emprats van ser un anti-ratolí produït en conill (*Dako #P0260*) i un anti-conill produït en cabra (*Dako #P0448*), ambdós conjugats amb peroxidasa. Finalment, la membrana es va tornar a rentar 3 vegades

en TBS-T i es va procedir a la visualització de l'anticòs hibridat a la proteïna d'estudi mitjançant una tècnica quimioluminiscent.

**Taula M5. Anticossos primaris utilitzats per a la tècnica western blot.** S'indica la casa comercial, referència, dilucions i anticòs secundari. Rb: Rabbit. Mo: Mouse.

Anticòs	comercial	Referència comercial	Dilució	Secundari
AKT	Cell Signal	#9272	1:1000	Rb
ALIX	Cell Signal	#2171	1:1000	Mo
CD63	Abcam	ab8219	1:1000	Mo
CD9	Abcam	ab92726	1:2000	Rb
ERK (P44/42 MAPK)	Cell Signal	#9102	1:1000	Rb
FN-EDA	Abcam	ab6328	1:400	Mo
GNAQ	Abcam	ab199533	1:1000	Rb
IGFR-1 $\beta$	Cell Signal	#3027	1:1000	Rb
Integrina $\alpha 4\beta 1$	Abcam	ab81280	1:1500	Rb
Integrina $\alpha 6$	Novusbio	NBP1-85747	1:50	Rb
Integrina $\alpha v$	Bioss	bs-1356R	1:1000	Rb
MARCKS	Santa Cruz	sc-100777	1:1000	Mo
p-AKT	Cell Signal	#4060	1:2000	Rb
p-ERK (p-P44/42 MAPK)	Cell Signal	#9101	1:1000	Rb
p-GSK3 $\beta$	Cell Signal	#9331	1:1000	Rb
p-IGFR-1 $\beta$	Cell Signal	#3024	1:1000	Rb
p-MARCKS	Cell Signal	#2741	1:1000	Rb
p-SMAD-3	Millipore	07-1389	1:1000	Rb
p-SRC	Cell Signal	#2101	1:1000	Rb
SMAD3	Millipore	04-1035	1:1000	Rb
SRC	Cell Signal	#2109	1:1000	Rb
Twist	Abcam	Ab50887	1:250	Mo
$\alpha$ -Tubulina	Sigma	T6074	1:10000	Mo
$\beta$ -Actina	Abcam	ab49900	1:25000	HRP-conjugat
$\beta$ -Catenina	BD	610154	1:1000	Mo

### 3.2.1 REVELAT WESTERN BLOT

Pel procés de revelat es van utilitzar els sistemes de quimioluminiscència *Immobilon Western* de *Millipore*, quan es



## MATERIALS I MÈTODES

requeria major sensibilitat, i una solució de Luminol (*Sigma*) diluït amb H<sub>2</sub>O i peroxidasa (*Sigma*) en els casos que no requerien gran sensibilitat. Es va incubar 1 mL de cada reactiu del *kit* al damunt de la membrana durant 5 o 1 minuts, respectivament, i es van realitzar exposicions a diferents temps emprant l'aparell de quimioluminiscència Chemidoc Touch (*BioRad*). Finalment, les imatges obtingudes amb l'aparell ChemiDoc Touch es van processar amb el software Image Lab de Bio-Rad i es va quantificar la intensitat de les bandes normalitzant sempre els valors amb el control de càrrega utilitzat ( $\beta$ -Actina o  $\alpha$ -Tubulina).

### 3.2.2 ESTUDIS DE SENYALITZACIÓ PER WESTERN BLOT

Pels estudis de senyalització per western blot dels diferents tractament es vam sembrar  $6 \cdot 10^5$  cèl·lules en plaques de 6 pous i se'ls hi va canviar el medi a DMEM:F12 sense SBF durant la nit abans del tractament. L'endemà, es van afegir els inhibidors amb DMEM:F12 sense SBF a les concentracions determinades com a DL50 durant 6 o 48 hores. Finalment, es va aspirar el medi i es van congelar les plaques a -80°C fins el moment de recollir-ne l'extracte cel·lular pel seu anàlisi.

## 3.3 IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Els estudis d'immunofluorescència es van dur a terme en cèl·lules sembrades sobre els cobreobjectes en 2D a concentracions no saturades i es van observar sota un microscopi de fluorescència o confocal amb els filtres apropiats per cada cas. Totes les imatges van ser editades amb el software Adobe Photoshop.

### 3.3.1 CÈL·LULES 2D EN COBREOBJECTES

La immunofluorescència de cultius 2D es va utilitzar per estudiar la localització de proteïnes presents tan en l'interior de la cèl·lula com en la seva superfície. Es van sembrar  $1 \cdot 10^5$  o  $2 \cdot 10^5$  cèl·lules en cobreobjectes de vidre rodons en plaques de 24 pous. En el moment que les cèl·lules varen assolir una confluència aproximada del 70% es van fet tres rentats amb PBS i es van fixar les cèl·lules amb

paraformaldehid fred al 4 % durant 20 min. Tot seguit, es van tornar a rentar les mostres 3 vegades amb TBS i en cas de les proteïnes intracel·lulars es va permeabilitzar la membrana cel·lular amb TBS1x - 0.5% Tritó x100 - 6% de sèrum de burro. Després vam tornar a rentar lleugerament i vam bloquejar les unions inespecífiques incubant les mostres durant 1 hora amb TBS1x - 10% SBF (pel CXCR4) o TBS1x 6% sèrum de burro (per SOX2 i CD44). Seguidament, vam incubar durant la nit cada mostra en una cambra humida a 4°C amb l'anticòs primari diluït en al solució de bloqueig corresponent. En la **Taula M6** es detalla la dilució emprada per a cada anticòs.

L'endemà vam temperar les mostres, vam fer tres rentats amb TBS i vam incubar l'anticòs secundari (**Taula M6**) en solució de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient en una cambra humida. Tot seguit, vam fer dos rentats de 10 minuts amb TBS i un últim amb PBS - DAPI 1:10000 per tenyir els nuclis. Finalment, les mostres es van muntar en un portaobjectes amb una gota de Mowiol i es van fotografiar al microscopi de fluorescència Eclipse 80i (*Nikon*) o al confocal TCS SP5 model DMI6000 (*Leica*).

**Taula M6. Anticossos utilitzats per immunofluorescència.** S'indica la casa comercial, la dilució utilitzada i la necessitat de permeabilitzar les cèl·lules.

	Anticòs	Casa comercial	Referència	Dilució	Permeabilització
Primaris	SOX2 (mouse IgG1)	Thermo Fisher	PA1-16968	1:100	Sí
	CD44 (mouse IgG1)	Abnova	MAB10538	1:50	Sí
	CXCR4 (rabbit IgG)	Abcam	ab124824	1:50	No
Secundaris	AlexaFluor568 Anti-rabbit	Jackson	711-165-152	1:200	No
	AlexaFluor647 Anti-mouse	Jackson	715-605-151	1:200	No
	AlexaFluor488 Anti-rabbit	Life Technologies	A11008	1:500	No

### 3.4 IMMUNODETECCIÓ PER ELISA

#### 3.4.1 ARRAY DE CITOQUINES

Per tal d'esbrinar les citoquines presents en els medis condicionats utilitzats en les anàlisis de migració, vam utilitzar l'array de citoquines *RayBio® C-Series Mouse Cytokine Antibody Array C1000* de *RayBiotech* seguint les instruccions indicades pel fabricant. Aquest array conté 96 proteïnes freqüentment expressades en el sèrum, plasma i medis de cultiu cel·lular i permet la seva semi-quantificació a través de la immunodetecció per ELISA. Per a l'anàlisi es va utilitzar un pool del medi condicionat de fibroblasts i el medi condicionat d'hepatòcits i es va incubar amb les membranes contenidores dels anticossos contra les citoquines estudiades. Es va repetir l'experiment dues vegades. La incubació de les membranes amb la mostra es va realitzar durant la nit mentre que la resta d'incubacions van fer-se de dues hores. La membrana blotada es va incubar amb la solució quimioluminiscent del kit durant 1 minut i es va visualitzar amb el Chemidoc Touch (*BioRad*), capturant imatges entre 10 i 60 segons. Finalment, es va calcular la densitometria amb el software de BioRad i es va representar l'expressió relativa al control positiu.

### 3.5 ANÀLISI DE L'ACTIVITAT GELATINOLÍTICA (ZIMOGRAMA)

#### 3.5.1 EN MEDIS CONDICIONATS

L'anàlisi d'activitat gelatinolítica dels medis condicionats de les cèl·lules d'interès es va fer mitjançant un zimograma <sup>136</sup>. Es tracta d'una tècnica electroforètica per a la detecció d'enzims hidrolítics, on es va utilitzar gelatina (col·lagen desnaturalitzat) (1mg/mL) incorporada al gel separador de SDS-PAGE (acrilamida: bis acrilamida al 7,5%) com a substrat. Després de l'electroforesi, en el zimograma s'intercanvia el SDS per Tritó X100 mitjançant diferents bescanvis de tampó i després s'incuba a 37°C en buffer d'incubació per tal que actuïn les proteases (NaCl 0.15M, Tris·HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM, NaN<sub>3</sub> 0.05% amb Brij 35e). Després de la incubació es revela el gel

mitjançant la tinció amb Comassie Blue (Comassie blue R250 0.05% - Etanol 10% - Àcid acètic 10%) durant 4 hores i es destenyeix el gel amb una solució decolorant (Etanol 10% - Àcid acètic 10%). Així, les àrees de la digestió apareixen com a bandes clares sobre un fons tenyit a causa que el substrat (gelatina) ha estat degradat per l'enzim d'interès. En el nostre cas, les espècies moleculars es van determinar mesurant la distància des de la part superior del gel i el pes molecular es va calcular en referència a la posició de les proteïnes del marcador. La concentració proteica dels medis condicionats es va determinar amb l'assaig Bradford i es van carregar 1.5 µg de mostra amb tampó Laemmli 5x sense β-mercapto-etanol en el gel de zimografia.

### 3.5.2 ASSOCIADAES A LA MEMBRANA CEL·LULAR

Per la detecció de les gelatinases associades a membrana cel·lular es van recollir i digerir les cèl·lules amb la tècnica de raspat amb TBS - 2,5% Tritó X-114 amb inhibidors (1 mM PMSF, leupeptina 1 µg/mL, pepstatina 1 µg/mL i aprotinina 1 µg/mL) i es van incubar a 4°C 20 minuts. Es va centrifugar la mostra 15 minuts a 13000 x g a 4°C per pel·letejar el material insoluble i es va transferir el sobrenedant a tubs eppendorfs a 4°C durant 2-4 hores per tal que es separessin les fases. Seguidament, es va centrifugar 2 min a 3000 x g a temperatura ambient i es va recollir la fase del detergent (inferior) per a la seva anàlisi, ja que és la que conté les MMPs. A continuació, es va procedir a carregar la mostra en un gel en les mateixes condicions que la zimografia del medi condicionat.

## **4 ESTUDIS BIOESTADÍSTICS**

### **4.1 ANÀLISI BIOESTADÍSTICA**

De manera general, tots els experiments es van realitzar per triplicat i es van analitzar les dades mitjançant la prova *t d'Student* a menys que s'indiqui el contrari. Els resultats es mostren com la mitjana dels experiments  $\pm$  la SD. Es van considerar diferències significatives aquelles en les que el *p-valor* del test era inferior a 0,05.

El càlcul de les IC 50 corresponent a cada fàrmac es va realitzar amb el software del Graphpad mitjançant un anàlisi de regressió no-lineal. Els resultats es van expressar com a logaritme de la concentració enfront la viabilitat cel·lular respecte el control.

### **4.2 VALIDACIÓ CLÍNICA A TRAVÉS DE L'ANÀLISI BIOINFORMÀTICA DE DADES *IN SILICO* (TCGA)**

Les dades clíniques dels pacients van ser obtingudes del Cancer Genome Atlas (TCGA) i les anàlisis bioinformàtiques es van fer en col·laboració amb el grup de la Dra. Rebeca Sanz de l'Institut Català d'Oncologia (ICO).

El TCGA és una base de dades que conté informació genòmica multidimensional de pacients generada a través del transcriptoma, seqüenciació d'exons, alteracions genòmiques i perfils de metilació d'ADN, entre altres tècniques. Compila dades de 33 tipus de càncer i 11 mil mostres tumorals de pacients (xarxa de recerca TCGA, 2018). En els tumors de melanoma uveal, que conté 80 casos, vam analitzar la correlació de l'expressió d'un determinat marcador amb la supervivència i el temps lliure de malaltia dels pacients (Corba Kaplan-Meier). Per les anàlisis estadístiques es va considerar la mediana de l'expressió com a llindar entre l'expressió alta o baixa i la significació es va calcular amb el test log-rank.

# RESULTATS

**Bases Moleculars i Estratègies Terapèutiques contra les Metàstasis  
del Melanoma Uveal**



# **1 LES MUTACIONS ALS GENS *GNAQ* I *GNA11* INFLUENCIEN LA PROLIFERACIÓ *IN VITRO* DE LES LÍNIES CEL·LULARS DE MELANOMA UVEAL**

Les línies cel·lulars de melanoma uveal (UM) emprades en aquest estudi van ser cedides per la Dra Martine J. Jagger (veure Materials i Mètodes). En elles, vàrem comprovar per piroseqüenciació la presència de mutacions “iniciadores” (en anglès, *driver mutations*) dels gens *GNAQ* i *GNA11*, presents en el 83-92% dels UM primaris i metastàtics <sup>12,13</sup>. Els resultats van confirmar les alteracions descrites en l'article de Jager i col·laboradors <sup>120</sup>. Les línies Mel270, OMM-2.3 i OMM-2.5, procedents del mateix pacient, presentaven una mutació a *GNAQ* que substituïa la glutamina del codó 209 per una prolina. La línia cel·lular UM-92.1 tenia també una mutació a *GNAQ* però, en aquest cas, substituïnt la glutamina del codó 209 per una leucina. De les línies cel·lulars avaluades només la OMM-1 presentava una mutació a *GNA11* amb una leucina en lloc de la glutamina del codó 209. La línia cel·lular SP6.5 en canvi, presentava una mutació a *BRAF* en el codó 600 amb una valina canviada per un àcid glutàmic. Finalment, les línies Mel285 i Mel290 no presentaven alteracions genètiques en cap d'aquests tres gens (**Taula M1**).

Seguidament, vam analitzar la capacitat proliferativa de les cèl·lules adherides al substrat en presència de 5% de SBF. La taxa de creixement es va determinar mitjançant l'assaig metabòlic WST-1. El temps de generació es va calcular a partir de les corbes de creixement i correspon al temps necessari per a que la població amb un nombre determinat de cèl·lules passi a tenir-ne el doble. Els resultats suggerien que la presència de mutacions a les proteïnes  $G_{\alpha/11}$  promovia el creixement cel·lular, ja que les línies Mel270, OMM-2.3, OMM-2.5, OMM-1 i 92.1 proliferaven més ràpidament (temps de



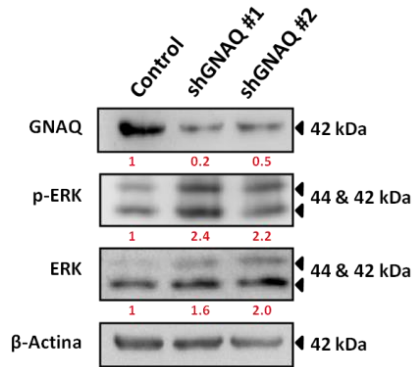
## RESULTATS

generació inferior) que les que no tenien aquestes mutacions (SP6.5, Mel290 i Mel285) (**Taula R1**). En aquest sentit, el silenciament estable de l'expressió de GNAQ<sup>m</sup> en la línia cel·lular OMM-2.5 mitjançant un shGNAQ, també afectava el temps de generació, augmentant-lo fins a 36 o 43 hores en cadascun dels clons seleccionats.

**Taula R1. Temps de generació de les línies de UM.** Càlcul del temps necessari per doblar el nombre de cèl·lules en cadascuna de les línies cel·lulars de UM. Anàlisi realitzada a partir dels valors d'absorbència obtinguts durant la fase de creixement exponencial amb l'assaig metabòlic WST-1.

Línia cel·lular	Mutació	Temps de generació (h)
<b>Mel270</b>	<i>GNAQ</i> (Q209P)	31
<b>OMM-2.3</b>	<i>GNAQ</i> (Q209P)	32
<b>OMM-2.5</b>	<i>GNAQ</i> (Q209P)	30
<b>SP6.5</b>	<i>BRAF</i> (V600E)	41
<b>OMM-1</b>	<i>GNA11</i> (Q209L)	31
<b>92.1</b>	<i>GNAQ</i> (Q209L)	27
<b>Mel290</b>	<i>GNAQ</i> <sup>wt</sup> / <i>GNA11</i> <sup>wt</sup> / <i>BRAF</i> <sup>wt</sup>	39
<b>Mel285</b>	<i>GNAQ</i> <sup>wt</sup> / <i>GNA11</i> <sup>wt</sup> / <i>BRAF</i> <sup>wt</sup>	38

Tot i que vam observar un augment en el temps de generació dels clons seleccionats amb puromicina de les cèl·lules OMM-2.5 shGNAQ (#1 i #2), que va passar a ser de 36 i 43 hores, respectivament, no vam constatar diferències en la fosforilació de les proteïnes ERK característica dels tumors de UM <sup>11</sup>. En la **Figura R1** es mostra la validació per western blot del silenciament de la proteïna GNAQ<sup>m</sup> en la línia cel·lular OMM-2.5, que va resultar gairebé complert en el clon sh GNAQ#1 i parcial en el clon sh GNAQ #2. La fosforilació de les proteïnes ERK es va observar en ambdós clons i, inclús, incrementava lleugerament en comparació amb les cèl·lules de OMM-2.5 control infectades únicament amb el vector lentiviral buit, portador també de la resistència a la puromicina.



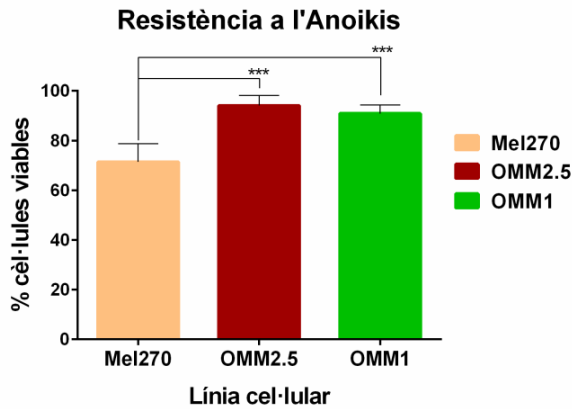
**Figura R1: El silenciament de GNAQ no comporta una reducció de la fosforilació de la proteïna ERK.** Western blot que mostra la reducció de GNAQ i la fosforilació de ERK en la línia cel·lular OMM2.5 i els clons seleccionats. Aquest és un experiment representatiu de 3, on es van carregar 30  $\mu$ g de proteïna total dels extractes cel·lulars per a cada mostra. La densitometria de la senyal es va referir a la de la  $\beta$ -Actina i s'indica en vermell.

## **2 LES LÍNIES CEL·LULARS DE MELANOMA UVEAL CONTENEN SUBPOBLACIONS AMB CARACTERÍSTIQUES DE “CANCER STEM CELLS”**

Atès que la disseminació en el UM es dona per la via hematògena <sup>137</sup>, les cèl·lules responsables de les metàstasis han de sobreviure a la mort cel·lular induïda per l'anoikis i desenvolupar un tumor en el lloc metastàtic des d'un nombre reduït de cèl·lules <sup>138</sup>. Per això, vam avaluar aquestes característiques en diverses línies establertes de UM.

### **2.1 RESISTÈNCIA A LA MORT CEL·LULAR PER ANOIKIS, FORMACIÓ D'ESFEROIDES EN SUSPENSÍO I CAPACITAT CLONOGÈNICA *IN VITRO***

Vàrem utilitzar les línies cel·lulars de UM Mel270 i OMM-2.5 portadores d'una mutació a *GNAQ* i la línia OMM-1 amb una mutació a *GNA11*, i vam avaluar la viabilitat cel·lular impedit el seu ancoratge al substrat (plàstic) a les 24, 48 i 72 hores. Per això, vàrem sembrar  $5 \cdot 10^5$  cèl·lules en plaques tractades prèviament amb polyHEMA en medi DMEM:F12 amb 5% SBF. Després de 24, 48 i 72 hores vam recollir les cèl·lules en suspensió i en vam avaluar la viabilitat utilitzant el blau de tripan. Vam observar que els percentatges de viabilitat eren superiors en les línies OMM-2.5 i OMM-1 que en la Mel270, però en tots els casos més del 70% de cèl·lules sembrades eren viables. En cap cas vam detectar adhesió cel·lular a la placa (**Figura R2**). Vam determinar també que més del 95 % de cèl·lules que havien sobreviscut a l'anoikis les primeres 24 hores sobreviuen també a les 48 i 72 hores (dades no mostrades).

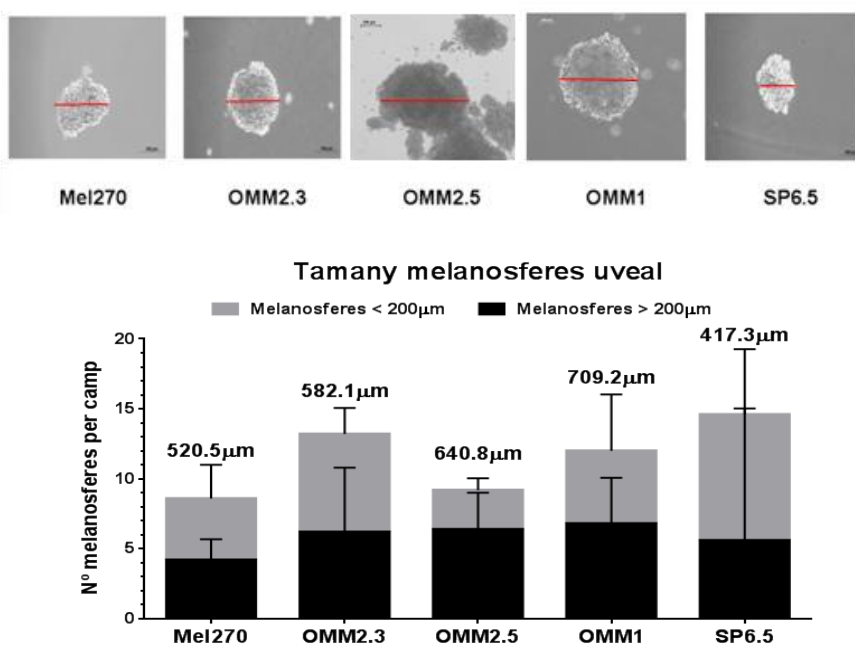


**Figura R2: Les línies cel·lulars de UM contenen poblacions resistents a la mort cel·lular per anoikis.** El gràfic de barres mostra la viabilitat cel·lular de les línies Mel270, OMM-2.5 i OMM-1 després de 48h d'haver-les sembrat en plaques tractades amb polyHEMA i en medi amb 5% de SBF. La viabilitat cel·lular es va avaluar amb blau de tripan i les barres indiquen els percentatges de cèl·lules viables respecte al total de cèl·lules sembrades. Aquest és un experiment representatiu amb 3 rèpliques tècniques on s'indica la mitjana  $\pm$  SEM. Per l'anàlisi estadística es va fer servir el test T-Student  $p^{***} < 0.001$ .

Havent comprovat la resistència a la mort per anoikis de les línies cel·lulars de UM vàrem proposar-nos analitzar si en determinades condicions algunes poblacions podien comportar-se fenotípic i funcionalment com a CSC. Tot i que la principal propietat que defineix les CSC és el seu potencial tumorigènic *in vivo*, també són capaces de proliferar en cultius 3D sense ancoratge al substrat formant estructures multicel·lulars o esferoides. A més, són capaces de generar colònies a partir de cèl·lules aïllades en condicions 2D com a conseqüència de la seva capacitat d'auto-renovació <sup>34</sup>. Per això, vam sembrar  $5 \cdot 10^3$  cèl·lules provinents d'un cultiu *in vitro* en monocapa confluent en plaques de 6 pous tractades prèviament amb polyHEMA. En aquest cas vam evitar el SBF i vam utilitzar el medi de melanòsferes amb EGF i bFGF entre d'altres (Materials i mètodes). Després de 5 dies en incubació a 37°C i amb un 5% de CO<sub>2</sub> la major part dels agregats cel·lulars observats a les 48 hores havien desaparegut i només aquells amb més de 20 cèl·lules eren capaços d'engrandir-se fins a formar

## RESULTATS

estructures multicel·lulars organitzades al cap de 10 dies (d'ara endavant, melanosferes). Després de 8 generacions consecutives disgregant mecànicament les melanosferes i sembrant  $5 \cdot 10^3$  cèl·lules novament, vam comptar el nombre i vam mesurar el diàmetre de les melanosferes produïdes per cada línia cel·lular. Vam poder comprovar que, tot i que la línia cel·lular provinent d'una metàstasi hepàtica OMM-2.5 formava esferes de major diàmetre, totes les línies cel·lulars de UM analitzades (Mel270, OMM-2.3, OMM-2.5, OMM-1 i SP6.5) contienien una subpoblació cel·lular capaç de créixer en esferoides (**Figura R3**).

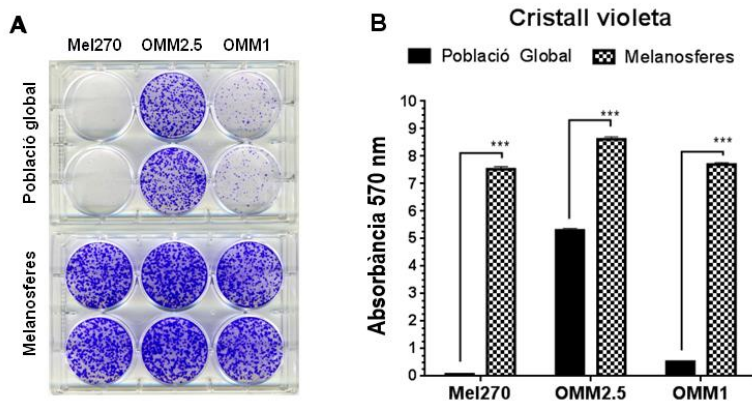


**Figura R3: Les línies de UM tenen una subpoblació cel·lular capaç de créixer en esferoides. A)** Imatge representativa en microscopi invertit dels esferoides formats a partir del creixement en suspensió de 556 cèl·lules/cm<sup>2</sup> en les línies de UM Mel270, OMM-2.3, OMM-2.5, OMM-1 i SP6.5. Barra = 100 µm. **B)** En xifres, es mostra la mitjana del diàmetre de les melanosferes obtingudes després de 8 generacions en les mateixes línies de UM contades en 5 camps diferents en un microscopi de contrast de fases a 4 augments. En l'eix vertical, es presenta el nombre de melanosferes totals contades per camp. En negre, les melanosferes amb diàmetre superior a 200 µm i, en gris, les de diàmetre inferior a 200 µm.

Així, vam comprovar que la formació de melanosferes es mantenia al llarg de diferents passes consecutius en condicions 3D en totes les línies cel·lulars, independentment de les seves diferències genotípiques.

A continuació, vam analitzar si el fet d'haver-se cultivat en condicions 3D i en absència de sèrum podia afectar a la formació de colònies en adherència al plàstic amb presència de sèrum, en comparació amb la capacitat de la resta de cèl·lules crescudes en monocapa. En ambdós casos es van preparar suspensions cel·lulars de cèl·lules aïllades per dispersió mecànica o enzimàtica per assegurar-nos que les colònies provenien de cèl·lules independents, i es van sembrar  $1 \cdot 10^3$  cèl·lules en 1 mL en una placa de 6 pous (sense tractar amb polyHEMA) amb medi 5% SBF. Després de 8 hores d'haver-les sembrat es va realitzar un control visual al microscopi de contrast de fases i es van descartar els cultius amb 10 o més agregats. Passats 11 dies de cultiu vam observar una baixa capacitat clonogènica de les cèl·lules procedents de monocapes de Mel270 enfront les procedents de monocapes de OMM-2.5 i OMM-1, ja que les primeres eren incapaces de formar colònies a partir d'una sola cèl·lula. Per contra, les línies cel·lulars derivades de metàstasi OMM-1 i especialment OMM-2.5 tenien una capacitat clonogènica més elevada, amb un 11 i 44% de la població cel·lular capaç de créixer a partir d'una sola cèl·lula, respectivament. Tot i això, en tots els casos la capacitat clonogènica de les cèl·lules procedents de melanosferes fou significativament superior a la de la població global procedent de monocapes independentment de la línia cel·lular analitzada. **(Figura R4).**

## RESULTATS

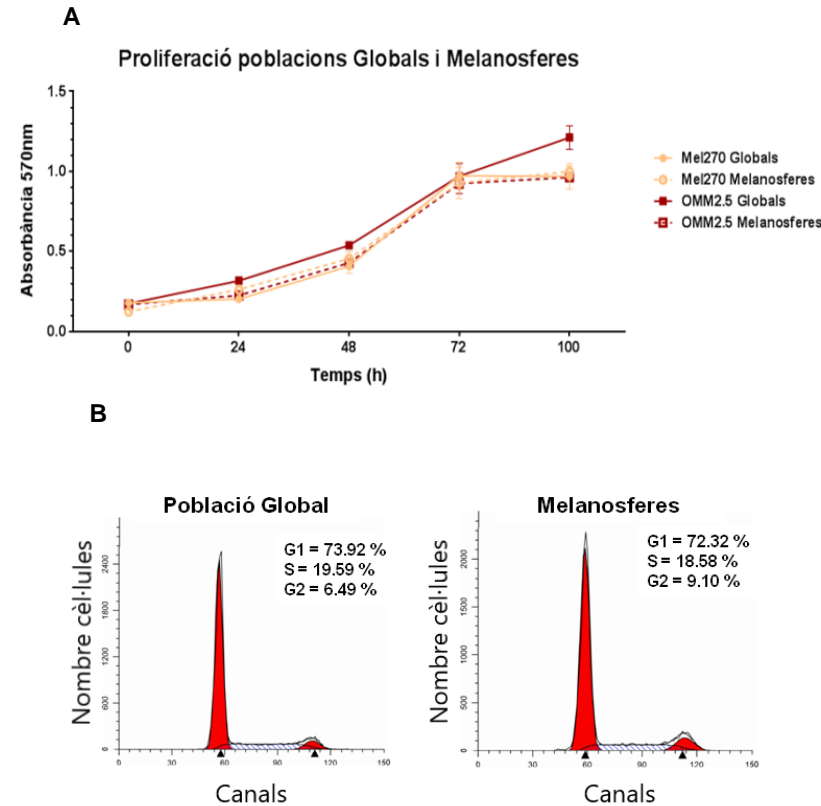


**Figura R4: Les cèl·lules derivades de melanosferes presenten una capacitat clonogènica molt superior a les cèl·lules provinents d'un cultiu en monocapa. A)** Imatge representativa de la formació de colònies en cèl·lules adherides a plàstic a partir de 111 cèl·lules/cm<sup>2</sup> provinents d'un cultiu en monocapa (població global) o d'un cultiu 3D (melanosferes) de les línies de UM Mel270, OMM2.5 i OMM1. **B)** Quantificació de les colònies formades mesurant l'absorbància obtinguda de la tinció amb violeta cristall (Materials i mètodes). Els valors representen la mitjana dels duplicats de tres experiments ± SEM. Anàlisi estadística T-Student \*\*\* p < 0.0001.

Cal assenyalar que gairebé el 100% de les cèl·lules disgregades de les melanosferes s'adhereixen al plàstic quan són cultivades en presència de sèrum i són capaces de formar monocapes entre 2 i 4 dies. Això indica que les condicions de cultiu, i en especial, la presència de sèrum, indueixen canvis reversibles en l'expressió gènica alterant el seu fenotip, fet conegut com a plasticitat cel·lular.

Per això, seguidament vam calcular el temps de generació propi de les melanosferes i les cèl·lules globals quan  $4 \cdot 10^3$  cèl·lules provinents d'un cultiu 3D (melanosferes) o d'un 2D (població global) eren cultivades en condicions adherents durant 4 dies. Mitjançant l'assaig de proliferació amb tinció quantitativa del violeta cristall vam determinar que el temps de generació en adherència de les melanosferes de Mel270 i OMM-2.5 era similar al de les cèl·lules de la població global (**Figura R5 A**). Tot i això, l'anàlisi de distribució del

cicle cel·lular realitzat per citometria de flux amb iodur de propidi va mostrar una distribució de fases lleugerament diferent entre les cèl·lules de la població global de Mel270 i les melanosferes aïllades en aquesta mateixa línia. Partint de  $1 \cdot 10^6$  cèl·lules en cultiu vam determinar una acumulació de cèl·lules en fase G2 en la mostra derivada del cultiu en esferoides (**Figura R5 B**).

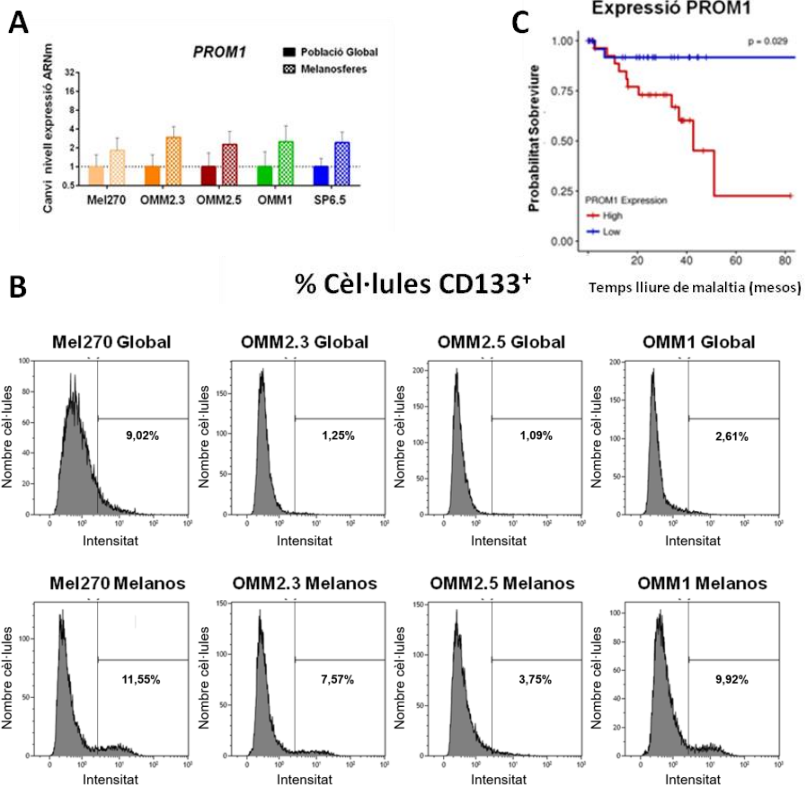


**Figura R5: Les melanosferes en adherència presenten un temps de generació similar però un cicle cel·lular diferent. A)** Corba de proliferació de les poblacions de melanosferes i globals de les línies Mel270 i OMM2.5. Valors d'absorbància obtinguts mitjançant la solubilització del violeta cristall a diferents temps. Es mostra el promig de les rèpliques  $\pm$  SD d'un experiment representatiu amb 6 rèpliques tècniques. **B)** Distribució del cicle cel·lular de  $1 \cdot 10^6$  de cèl·lules de la població global i de melanosferes provinents de la línia Mel270 tenyides amb iodur de propidi i analitzada per citometria de flux.



### 2.2 LES MELANOSFERES DE UM MOSTREN UNA EXPRESSIÓ DIFERENCIAL DE MARCADORS PROPIS DE CSCS

Per tal de caracteritzar si aquestes cèl·lules presentaven característiques de CSC, en primer lloc, vam investigar l'expressió de CD133 a les melanosferes de UM tant a nivell d'ARNm com a nivell proteic per citometria de flux. A nivell d'ARNm vam determinar que les cèl·lules de les melanosferes de les línies de UM Mel270, OMM-2.3, OMM-2.5, OMM-1 i SP6.5 tenien una sobreexpressió del gen codificant per CD133 *PROM1* respecte a l'observat en les seves respectives línies de UM a nivell global (**Figura R6A**). De la mateixa manera, el percentatge de cèl·lules que expressaven aquesta glicoproteïna (d'ara endavant CD133<sup>+</sup>) era significativament superior en les poblacions procedents dels esferoides en comparació amb el de les procedents del creixement en monocapa (**Figura R6B**). A continuació, ens vam preguntar si hi havia alguna associació entre els nivells d'expressió de CD133 i l'evolució clínica dels pacients en el UM. Per això, vam analitzar la seva expressió en les dades públiques disponibles en el TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) i vam trobar que la supervivència i el temps lliure de malaltia (DFS en anglès, *Disease Free Survival*) dels malalts estaven condicionats per la seva expressió, de manera que els tumors amb major nombre de cèl·lules CD133<sup>+</sup> tenien un pitjor pronòstic (**Figura R6C**).



**Figura R6: La presència de cèl·lules CD133<sup>+</sup> és significativament més elevada en les melanosferes que en les cèl·lules procedents de monocapa.** **A)** El gràfic de barres mostra les diferències en l'expressió de CD133/*PROM1* a nivell d'ARNm de les poblacions de melanosferes i la global en les línies cel·lulars Mel270, OMM-2.3, OMM-2.5, OMM-1 i SP6.5. Les barres indiquen els valors relatius respecte els obtinguts en la població global de cada línia cel·lular. Els resultats van ser obtinguts per qPCR de 5 extraccions d'ARN independents i les *ddCT* van ser normalitzades amb les de *L32*. Es mostra un augment significatiu en l'expressió de *PROM1* en les melanosferes de totes les línies en comparació amb els nivells de la població global. **B)** Els histogrames obtinguts amb citometria de flux amb un anticòs contra CD133 conjugat amb FITC mostren el percentatge de cèl·lules CD133<sup>+</sup> de la població cultivada en monocapa i la crescuda en esferoides de les línies cel·lulars Mel270, OMM2.3, OMM2.5 i OMM-1. La línia vertical indica el límit entre la població amb immunofenotip positiu i negatiu. Es mostra un experiment representatiu dels 3 realitzats independentment. **C)** Corba de supervivència Kaplan-Meier basada en l'expressió de *PROM1*/CD133 en tumors primaris de UM (dades públiques *in silico* del TCGA). Les diferències significatives van ser calculades amb el test log-rank.

## RESULTATS

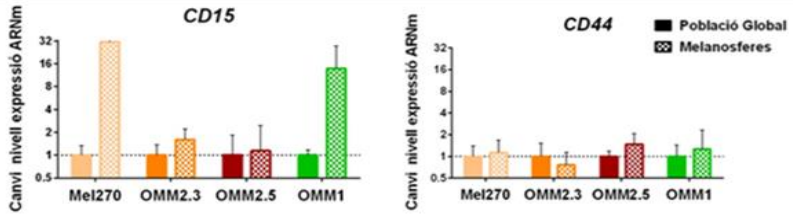
Al mesurar els nivells d'ARNm de CD15 vam observar una sobreexpressió d'aquest gen en les cèl·lules provinents de melanosferes en comparació amb les provinents de cultius 2D. Per contra, els nivells d'ARNm de CD44 van resultar elevats en totes les cèl·lules independentment de la seva procedència en cultiu i no es van observar diferències significatives en les melanosferes de UM (**Figura R7A**). Sí que vàrem observar diferències en la localització d'aquest receptor per immunofluorescència, ja que malgrat ambdues poblacions eren positives per CD44, la seva expressió en les melanosferes es trobava localitzada específicament a la membrana extracel·lular, mentre que a la població global s'observava una expressió difosa localitzada en el citoplasma (**Figura R7B**).

En la **Taula R2** es mostra un resum dels canvis observats en l'expressió dels marcadors associats a pluripotència en les melanosferes respecte les cèl·lules de la població global. Així, mentre s'observa que els nivells d'expressió de CD133 i CD15 són majors en les cèl·lules provinents de cultius en 3D, l'expressió de CD44 no és variable i només en canvia la seva localització cel·lular.

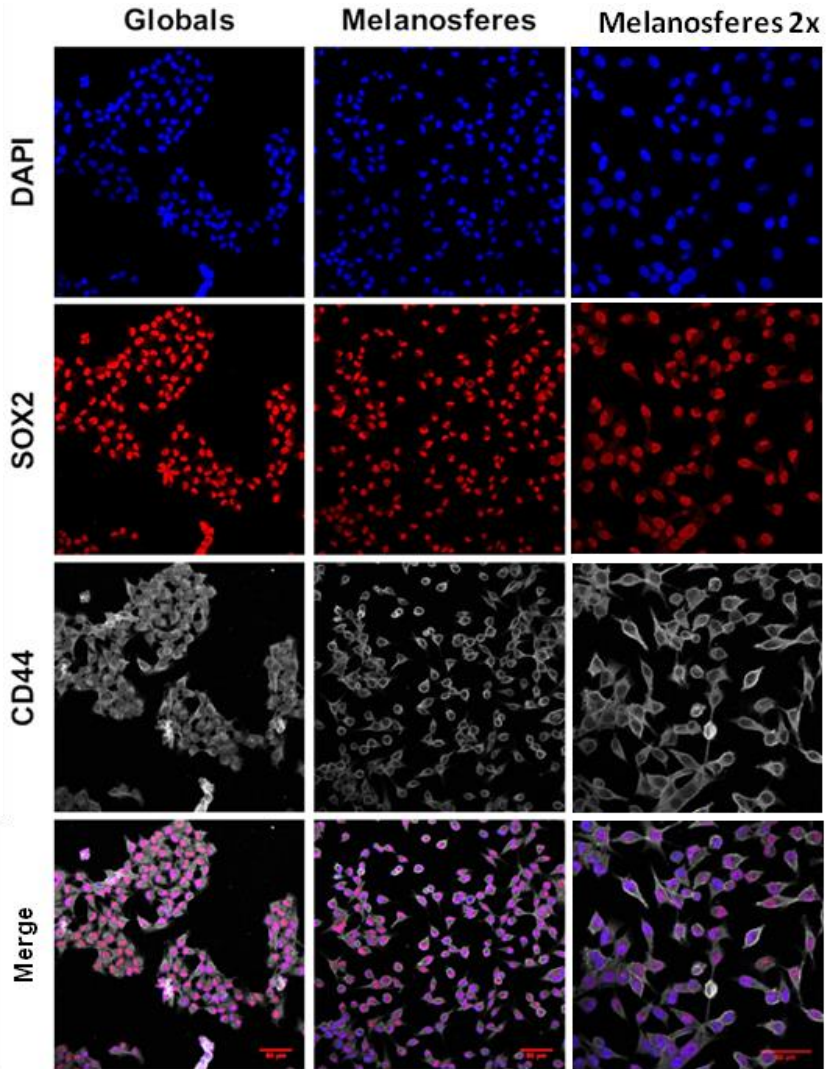
**Taula R2. Increment en les melanosferes de l'expressió de marcadors associats a pluripotència.** Llegenda: = diferències no significatives / + increment > 0.5 / ++ increment > 2 / +++ increment > 4 / ns no avaluat

Línia cel·lular	CD133	CD44	CD15
Mel270	+	=	+++
OMM-2.3	++	=	+
OMM-2.5	++	=	+
OMM-1	++	=	+++
SP6.5	++	ns	ns

**A**



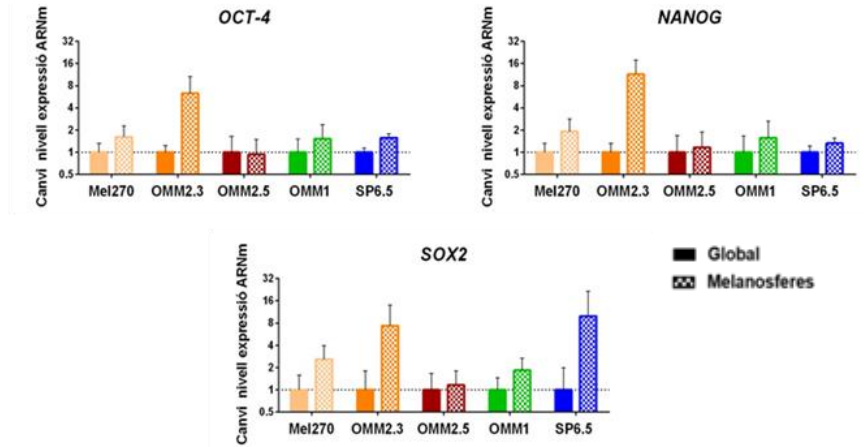
**B**



## RESULTATS

**Figura R7: Les melanosferes de UM expressen elevats nivells dels marcadors de CSC, CD15 i especialment CD44, que es troba localitzat en la seva membrana cel·lular. A)** El gràfic de barres mostra les diferències en l'expressió de *CD15* i *CD44* a nivell d'ARNm de les poblacions de melanosferes i la població global en les línies cel·lulars Mel270, OMM-2.3, OMM-2.5, OMM-1 i SP6.5. Les barres indiquen els valors relatius respecte els obtinguts en la població global de cada línia cel·lular. Els resultats van ser obtinguts per qPCR de 5 extraccions d'ARN independents i les *ddCT* van ser normalitzades amb les de *L32*. Es mostra un augment significatiu en l'expressió de *CD15* en les melanosferes però no de *CD44* en comparació amb els nivells de la població global. **B)** Immunofluorescència representativa de l'expressió de SOX2 (vermell) i CD44 (gris) a les cèl·lules Mel270 procedents de cultius en monocapa o de melanosferes. Els nuclis es van evidenciar mitjançant la tinció amb DAPI (blau). S'observa en ambdues situacions una expressió similar de Sox-2 localitzada en el nucli mentre que la localització de CD44 es veu a la membrana majoritàriament en el cas de les melanosferes. Barra = 50 µm.

Seguidament, vam analitzar els nivells d'expressió d'ARNm d'altres gens relacionats amb un fenotip de pluripotència cel·lular com són els factors de transcripció *Oct4* (en anglès, *Pou-Domain Transcription Factor 4*), *Nanog* (en anglès, *Nanog homeobox*) i *Sox2* (en anglès, *Sex Determining Region Y-box 2*). Aquests factors de transcripció estan expressats en les cèl·lules mare embrionàries i són propis dels nínxols de CSC pel seu paper en la diferenciació i el creixement tumoral <sup>139</sup>. Al determinar els seus nivells en les nostres cèl·lules vam observar una sobreexpressió d'aquests factors en les cèl·lules provinents de melanosferes respecte a les poblacions globals de les línies Mel270, OMM-2.3, OMM-1 i SP6.5. Per contra, no s'observaven diferències significatives en l'expressió d'aquests factors de transcripció en les melanosferes provinents de la línia OMM-2.5 (**Figura R8**). En el cas del *Sox-2*, havíem observat per immunofluorescència en cèl·lules de Mel270 que la seva localització es mantenia constant en el nucli tant en les cèl·lules derivades de melanosferes com de cultius en monocapa (**Figura R7B**).



**Figura R8:** La subpoblació cel·lular de UM formadora de melanosferes presenta una sobreexpressió dels factors de transcripció propis de les CSC en comparació amb les cèl·lules cultivades en monocapa. El gràfic de barres mostra les diferències en l'expressió dels gens relacionats amb pluripotència *OCT-4*, *NANOG* i *SOX2* a nivell d'ARNm entre les poblacions de melanosferes i la població global en les línies cel·lulars Mel270, OMM-2.3, OMM-2.5, OMM-1 i SP6.5. Les barres indiquen els valors relatius respecte els obtinguts en la població global de cada línia cel·lular. Els resultats van ser obtinguts per qPCR de 5 extraccions d'ARN independents i les *ddCT* van ser normalitzades amb les de *L32*.

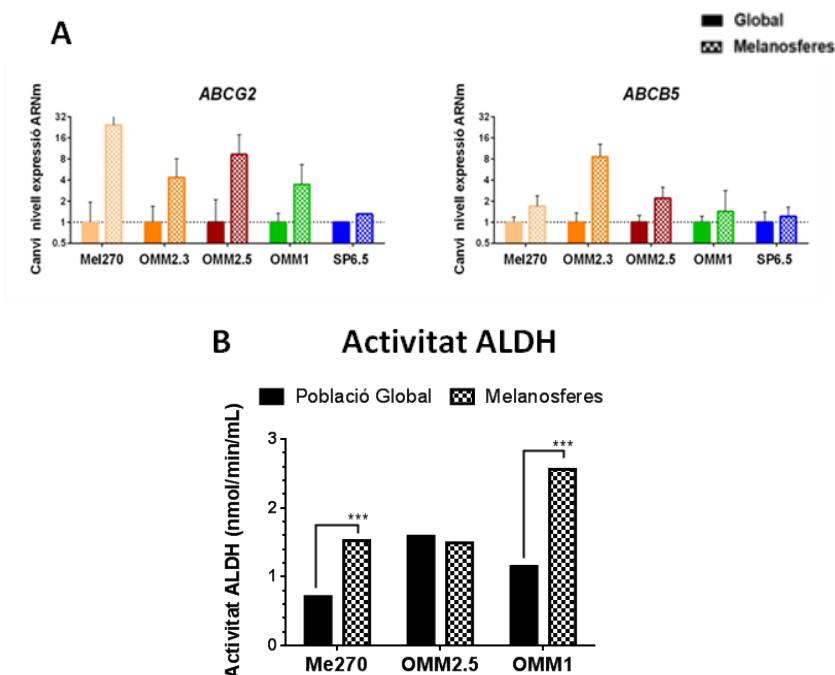
En la **Taula R3** es mostra un resum dels canvis observats en l'expressió dels factors de transcripció associats a pluripotència cel·lular a les melanosferes respecte a les cèl·lules de la població global. Es pot observar que les cèl·lules crescudes en melanosferes de les línies Mel270 i OMM-2.3 són les que més incrementen l'expressió d'aquests factors de transcripció, mentre que la OMM-2.5 no mostra diferències significatives en cap cas.

**Taula R3. Increment de l'expressió de factors de transcripció relacionats amb la pluripotència cel·lular en les melanosferes.** Llegenda: = diferències no significatives / + increment > 0.5 / ++ increment > 2 / +++ increment > 4

Línia cel·lular	Oct-4	Nanog	Sox2
Mel270	+	+	++
OMM-2.3	+++	+++	+++
OMM-2.5	=	=	=
OMM-1	+	=	+
SP6.5	+	=	+

## RESULTATS

Diversos estudis científics donen suport a la hipòtesi que les CSC són resistents als tractaments amb fàrmacs gràcies a l'expressió dels membres ABC (*ATP-Binding Cassete*), els quals pertanyen a una família de proteïnes transmembrana que hidrolitzen ATP per a les funcions de transport i exclusió de drogues <sup>140,141</sup>. Com s'indica a la **Figura R9A** vam observar l'augment de l'expressió *ABCG2* i *ABCB5* en les cèl·lules procedents de cultius de melanosferes. L'ALDH (aldehid deshidrogenasa) és una superfamília de 19 isoenzims implicats en la desintoxicació de substrats aldehids endògens i exògens, alguns dels quals es troben actius en les CSC <sup>142</sup>. Per aquest motiu vam analitzar la seva activitat en les melanosferes obtingudes de les línies cel·lulars Mel270, OMM2.5 i OMM-1. Al comparar els valors d'activitat d'ALDH de les melanosferes amb els obtinguts en les seves línies isogèniques vam observar un increment molt significatiu de la seva activitat en Mel270 i OMM-1. (**Figura R9B**).

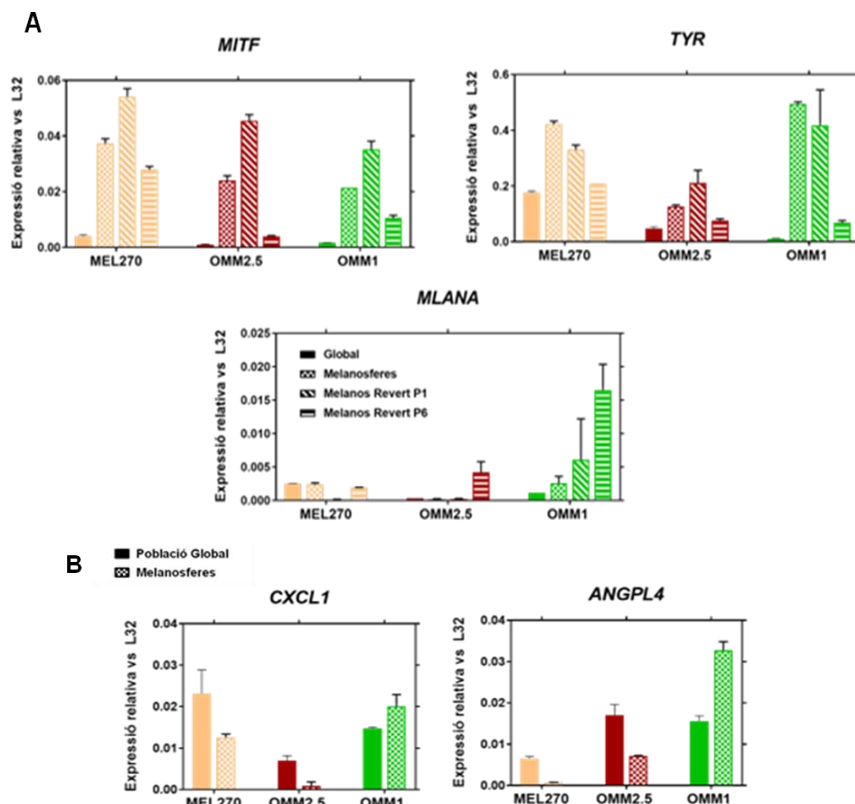


**Figura R9: Les cèl·lules de UM provinents de melanosferes presenten una alta activitat ALDH i sobreexpressen el gens de la família de transportadors ATP-binding cassette (ABC). A)** El gràfic de barres mostra les diferències en l'expressió dels gens *ABCG2* i *ABCB5* a nivell d'ARNm entre les poblacions de melanosferes i la població global en les línies cel·lulars Mel270, OMM-2.3, OMM-2.5, OMM-1 i SP6.5. Les barres indiquen els valors relatius respecte els obtinguts en la població global de cada línia cel·lular. Els resultats van ser obtinguts per qPCR de 5 extraccions d'ARN independents i les *ddCT* van ser normalitzades amb les de *L32*. Es mostra un augment significatiu en l'expressió d'ambdós gens especialment en les línies Mel270, OMM-2.3 i OMM-2.5. **B)** Es mostren els nivells d'activitat de l'enzim aldehid deshidrogenasa (ALDH) en les poblacions globals i de melanosferes de les línies Mel270, OMM2.5 i OMM1. Valors expressats en nmol/min/mL. \*\*\*  $p < 0.0001$ .

A més de cèl·lules amb fenotip CSC, entre les poblacions de melanosferes hi havia cèl·lules amb un fenotip diferenciat que mantenien una alta expressió dels gens de diferenciació melanocítica *MITF* (en anglès, *Melanogenesis Associated Transcription Factor*), *MLANA* o *MART1* (en anglès, *Melanoma Antigen Recognised by T cells*) i *Tyrosinase* -un enzim clau per a la biosíntesi de melanina<sup>143</sup>. Alhora, mesurant la seva expressió en diferents condicions, vam tornar a observar una plasticitat cel·lular elevada en les cèl·lules provinents dels cultius 3D, perquè eren capaces de recuperar el seu fenotip original 5 passes després de sembrar-les en adherència (**Figura R10A**). En aquestes poblacions de melanosferes també vam detectar l'expressió d'alguns gens propis d'esferoides, com *CXCL1* i *ANGPL4*, fet que corroborava la presència d'una població mixta (**Figura R10B**).



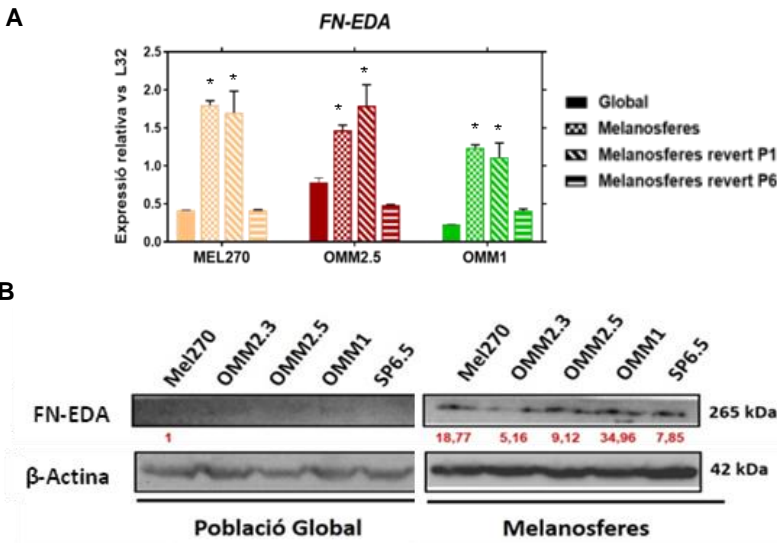
## RESULTATS



**Figura R10: Les melanospheres de UM estan formades per una població mixta amb característiques melanocítiques i d'esferoides. A):** Nivells d'expressió d'ARN missatger de gens de diferenciació melanocítica (*MITF*, *TYR* i *MLANA*) en la població global, melanospheres en suspensió, i melanospheres després d'1 i 6 divisions en adhesió. Els resultats van ser obtinguts per qPCR i les *ddCt* normalitzades amb les de *L32*. Es mostra un experiment representatiu dels 3 realitzats i es representen els promigis  $\pm$  SD de tres rèpliques tècniques. **B)** Nivells d'expressió d'ARN missatger dels gens *CXCL1* i *ANGPL4* en la població global i les melanospheres de Mel270, OMM-2.5 i OMM-1.

Un estudi de Ou i col·laboradors va demostrar que en el càncer colorectal l'expressió del domini extra A de la fibronectina (FN-EDA) està estretament lligada a una subpoblació cel·lular amb alta expressió de CD133<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> <sup>144</sup>. Atès que les cèl·lules de UM provinents de melanospheres expressen ambdós marcadors i que la FN-EDA juga un paper important en l'angiogènesi del melanoma i el

subseqüent desenvolupament i disseminació del tumor <sup>145</sup>, vam analitzar-ne la seva expressió. Tant per qPCR com per western blot, vam detectar un increment significatiu en l'expressió de FN-EDA en les poblacions de melanosferes en comparació a la població global. A més, vam constatar que aquesta sobreexpressió era específica de les cèl·lules amb característiques de CSC ja que quan aquestes perdien el seu fenotip, després de 6 passes en adhesió al plàstic, l'expressió de FN-EDA revertia als nivells dels cultius en monocapa (**Figura R11**).



**Figura R11: Les cèl·lules de UM capaces de créixer en esferes expressen alts nivells de FN-EDA. A)** Nivells d'expressió d'ARN missatger del domini extra A de la *Fibronectina* en la població global, melanosferes en suspensió, i melanosferes després d'1 i 6 passes adherides al plàstic de les línies cel·lulars Mel270, OMM-2.5 i OMM-1. Els resultats van ser obtinguts per qPCR i les *ddCt* normalitzades amb *L32*. Es mostra un experiment representatiu dels 3 realitzats independentment i es representen les mitjanes  $\pm$  SD de tres rèpliques tècniques. Anàlisi estadística T-student \*  $p < 0.05$ . **B)** Western blot representatiu de 3 experiments realitzats amb extractes cel·lulars de les línies de UM i les melanosferes aïllades de Mel270, OMM2.3, OMM2.5, OMM1 i SP6.5. S'observa un augment de la Fibronectina-EDA en les melanosferes després de carregar 30  $\mu$ g de proteïna en cada carril i normalitzar l'expressió amb la  $\beta$ -Actina.

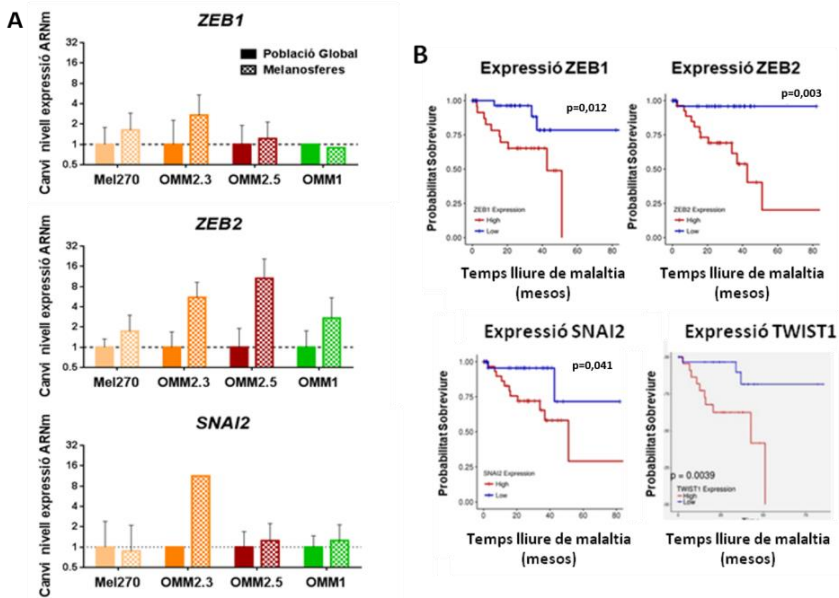
### 2.3 PLASTICITAT CEL·LULAR I *STEMNESS* EN EL UM

#### 2.3.1 CANVIS EN FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ RELACIONATS AMB LA EMT EN LES CÈL·LULES CULTIVADES EN 3D

La plasticitat cel·lular observada en les nostres melanosferes és molt evident en el cas dels carcinomes, on les cèl·lules amb fenotip epitelial adopten característiques mesenquimals i migratòries <sup>146</sup>. Per aquest motiu vam voler comprovar si les poblacions de melanosferes expressaven també els factors de transcripció *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI2* i *TWIST1*. Com es mostra en la **Figura R12A**, malgrat els nivells de *TWIST1* van resultar indetectables per qPCR en les cèl·lules provinents de cultiu en monocapa es van observar canvis d'expressió en els altres TF entre les cèl·lules de la població global i les melanosferes, en comparació amb la població global. Els nostres resultats mostren que l'expressió de *ZEB2*, estava augmentada en les cèl·lules cultivades en 3D respecte a les cèl·lules de creixement en monocapa i que aquest fet era comú en les tres línies cel·lulars de UM. En el cas de *ZEB1* i *SNAI2* la seva expressió incrementava qualitativament només en les melanosferes de la línia OMM2.3 mentre que en la resta de línies cel·lulars es mantenia constant. Curiosament, l'expressió de *ZEB2* facilita la migració dels melanoblasts durant el desenvolupament embrionari i persisteix en els melanòcits adults, éssent considerat un regulador de la diferenciació melanocítica, de manera similar a l'expressió de *SNAI2* <sup>147,148</sup>. L'increment de l'expressió de *ZEB2* en les melanosferes, coincideix amb el de *MITF* (**Figura R10**), fet que suggereix que les cèl·lules en 3D, en absència de sèrum, mantenen un fenotip proliferatiu i amb potencial per a diferenciar-se <sup>63,149</sup>. A més, ambdues proteïnes ZEB juguen un paper important en el manteniment de la *stemness*, la senescència, l'angiogènesi i la resistència a fàrmacs <sup>150</sup>.

Vàrem analitzar llavors si l'expressió d'aquests factors de transcripció en els tumors primaris de UM condicionava l'evolució clínica i la supervivència d'aquests malalts a la base de dades pública del TCGA

(<https://portal.gdc.cancer.gov/>). Vam separar els grups segons si els valors d'expressió estaven per sobre o per sota de la mediana de cada gen i vam determinar que l'alta expressió de *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI2* i *TWIST1* es correlacionava amb un menor temps lliure de malaltia (**Figura R12B**).



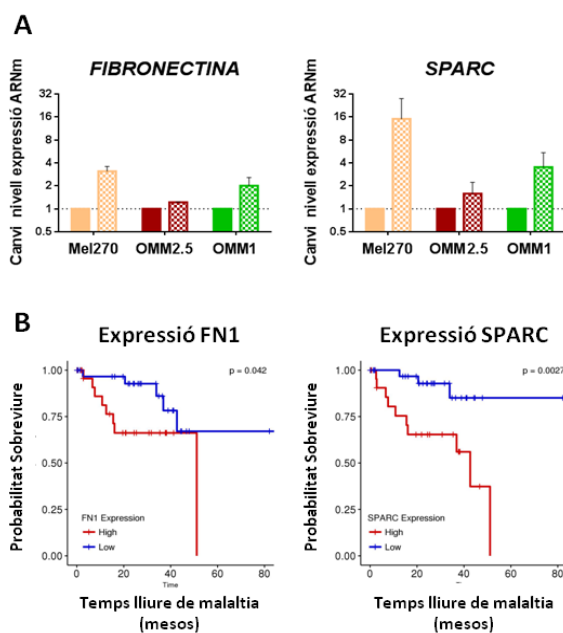
**Figura R12: Les poblacions de melanosferes de UM sobreexpressen alguns FT relacionats amb la EMT determinants en el risc de recaiguda. A)** Canvis en el nivell d'expressió obtinguts per qPCR de les melanosferes i la població global de les cèl·lules de Mel270, OMM-2.3, OMM-2.5 i OMM-1. Els histogrames mostren la mitjana dels valors relatius de les melanosferes respecte als de la població global de cada línia cel·lular obtinguts a partir de 3 extraccions d'ARN independents. **B)** Corbes Kaplan-Meier dels gens *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI2* i *TWIST1* que relacionen els seus nivells d'expressió amb el temps lliure de melanoma uveal dels pacients. Anàlisi estadística realitzada amb el test log-rank.

Malgrat no observar un increment significatiu de *SNAI2* en les cèl·lules provinents de melanosferes, vam detectar la sobreexpressió dels gens *SPARC* i *FN1* en les línies Mel270 i OMM-1 (**Figura R13A**). Així, la sobreexpressió d'aquestes dues proteïnes indica l'adquisició del

## RESULTATS

fenotip mesenquimal per part de les cèl·lules cultivades en esferoides en absència de SBF.

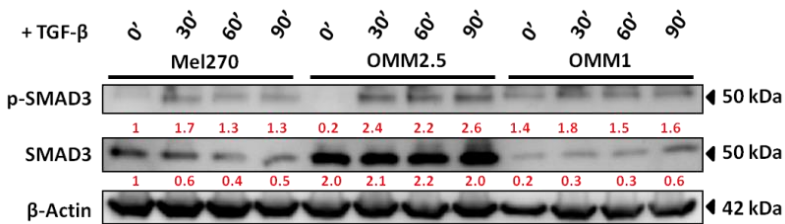
Adicionalment, vam investigar si l'expressió d'aquests factors de transcripció en els tumors primaris de UM condicionava l'evolució clínica d'aquests malalts. Després de separar els pacients de la base de dades pública del TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) segons si els valors d'expressió d'aquests gens estaven per sobre o per sota de la mediana vam concloure que l'alta expressió de *FN1* i *SPARC* era indicadora del risc de recaiguda en el UM (**Figura R13B**).



**Figura R13: Les cèl·lules de UM provinents de cultius 3D tenen una alta expressió dels gens *FN1* i *SPARC* relacionats amb un fenotip migratori i risc de recaiguda en clínica. **A)** Variació relativa en el nivell d'expressió dels gens *FN1* i *SPARC* entre les melanosferes i la població global de les cèl·lules de Mel270, OMM-2.5 i OMM-1. Els histogrames mostren el promig dels canvis calculats en les melanosferes respecte als de la població global de cada línia cel·lular. Valors obtinguts per qPCR a partir de 3 extraccions d'ARN independents. **B)** Corbes Kaplan-Meier dels gens *FN1* i *SPARC* que relacionen els seus nivells d'expressió amb el temps lliure de malaltia dels pacients amb melanoma uveal. Anàlisi estadística realitzada amb el test log-rank.**

2.3.2 CANVIS EN FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ RELACIONATS AMB LA EMT INDUÏTS PELS SENYALS DEL MICROAMBIENT

Considerant la importància del TGF- $\beta$  en el procés de EMT <sup>64,151</sup> vam tractar les línies cel·lulars de UM Mel270, OMM-2.5 i OMM-1 amb aquest factor i vam observar que totes les línies de UM hi responien a través de la via d'Smads <sup>152</sup>. De les línies cel·lulars avaluades, la OMM2.5 tenia una major quantitat de la proteïna SMAD3 total, però independentment d'això tots les cèl·lules tractades van respondre a la senyalització per TGF- $\beta$  (**Figura R14**).

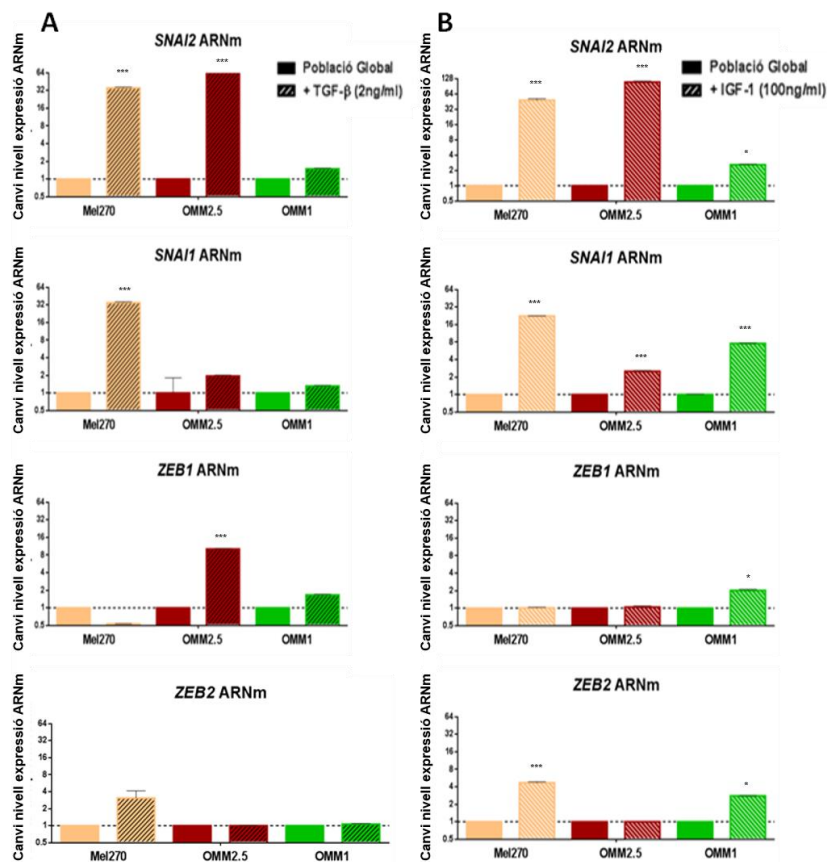


**Figura R14: El tractament amb TGF- $\beta$  indueix la fosforilació de SMAD3.** Western blot dels extractes cel·lulars de Mel270, OMM2.5 i OMM1 després de tractar les cèl·lules amb 2ng/mL de TGF $\beta$  durant 30, 60 o 90 minuts. S'observa la fosforilació d'SMAD3 en totes elles i diferent quantitat de proteïna total entre línies. Es van carregar 30  $\mu$ g de proteïna total dels extractes cel·lulars i la quantificació de la senyal (vermell) es va fer per densitometria prenent la de la  $\beta$ -Actina com a normalitzador. Aquest és un experiment representatiu de 2 realitzats independentment.

Després de determinar que el tractament de les cèl·lules amb TGF- $\beta$  provocava la fosforilació d'SMAD3 vam avaluar els canvis induïts a nivell d'ARNm en la expressió dels gens relacionats amb la EMT. Vàrem tractar les cèl·lules provinents de cultius en monocapa de les línies Mel270, OMM-2.5 i OMM-1 amb TGF- $\beta$  i vàrem observar canvis en l'expressió de *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI2* i *SNAI1*. Com es mostra a la **Figura R15A** el TGF- $\beta$  causava un increment significatiu en l'expressió de *SNAI1*, *SNAI2* i *ZEB2* en les cèl·lules de Mel270. Alhora, induïa una sobreexpressió de *SNAI1*, *SNAI2* i *ZEB1* en la línia OMM-2.5. Per contra, no induïa variacions en la línia cel·lular OMM-1, la qual expressava menors nivells de SMAD3 total.

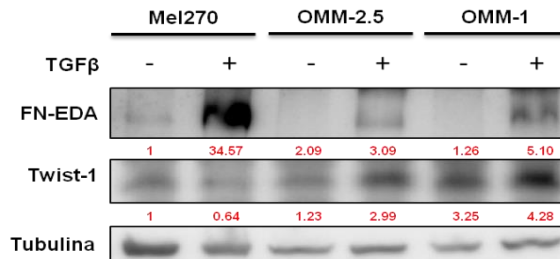
## RESULTATS

Paral·lelament, vam poder comprovar que altres factors involucrats en la migració cel·lular, com IGF-1, induïen aquesta mateixa sobreexpressió d'*SNAI2* i *SNAI1* en les línies de UM Mel270, OMM-2.5 i en aquest cas també en la OMM-1. Tot i això, el tractament amb IGF-1 no provocava canvis significatius en l'expressió de *ZEB1* en cap de les línies cel·lulars avaluades, i només en la Mel270 causava una sobreexpressió significativa de *ZEB2* (**Figura R15B**).



**Figura R15: Inducció de l'expressió dels factors de transcripció implicats en la EMT a través de TGF-β i IGF-1.** Canvis en els nivells d'expressió gènica de cadascun dels TF-EMT provocats pel tractament amb 2 ng/mL de TGF-β (**A**) o 10ng/ml de IGF-1 (**B**) durant 60 hores. Els diagrames de barres indiquen l'expressió gènica relativa als controls de les diferents línies de UM crescudes en monocapes (població global). Els resultats corresponen a un de tres experiments independents i mostren la mitja i la SD dels triplicats. Anàlisi estadística T-student \*\*\*p<0.001 \*p<0.05.

Les 3 línies de UM analitzades tenien nivells molt reduïts del TF *TWIST1*, per tant no vam poder quantificar els canvis induïts per TGF- $\beta$  a nivell d'ARNm. Tot i això, sí que vam observar un increment de Twist-1 a nivell proteic en les cèl·lules tractades amb TGF- $\beta$  de les línies OMM-2.5 i OMM-1. Addicionalment, vam observar un augment de fibronectina-EDA en les cèl·lules tractades amb TGF- $\beta$  de les línies Mel270, OMM-2.5 i OMM-1. Donat que la fibronectina és un marcador mesenquimal, l'expressió del qual va lligada a Twist-1 <sup>153</sup>, vam interpretar que malgrat no poder quantificar els nivells de Twist-1 per ARNm la seva expressió es veia igualment augmentada després del tractament amb TGF- $\beta$  (**Figura R16**). A més, en les línies cel·lulars de UM Mel290 i 92.1, on els nivells basals de *TWIST1* eren significativament majors, vam observar per qPCR un increment significatiu de *TWIST1*, de 2 i 20 vegades respectivament, després de l'addició del TGF- $\beta$  (dades no mostrades).



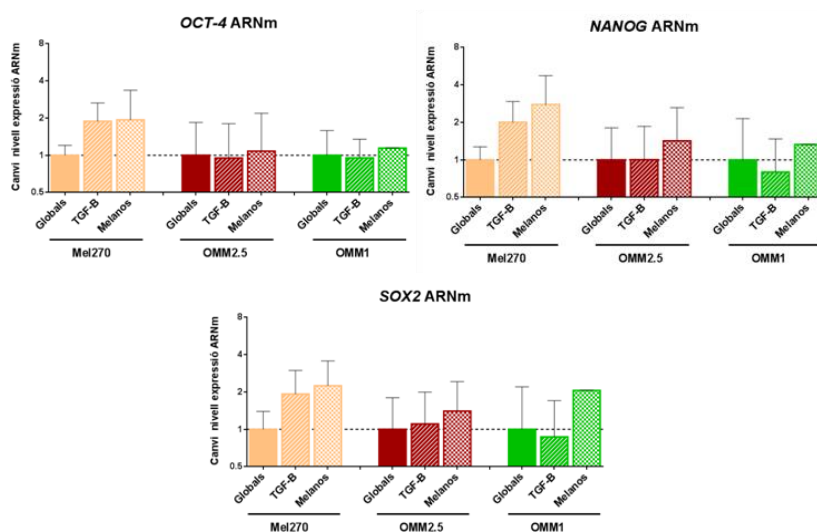
**Figura R16: El TGF- $\beta$  indueix la sobreexpressió de FN-EDA i Twist-1 en el UM.** Western blot dels extractes cel·lulars de Mel270, OMM2.5 i OMM1 després de tractar les cèl·lules amb 2ng/mL de TGF- $\beta$  durant 60 hores. S'observa l'expressió de FN-EDA i Twist-1 en les cèl·lules tractades i en un control. Es van carregar 30  $\mu$ g de proteïna total dels extractes cel·lulars i la quantificació de la senyal (vermell) es va fer per densitometria prenent la de la Tubulina com a normalitzador. Aquest és un experiment representatiu de 2 realitzats independentment.

Aquest augment en l'expressió de gens relacionats amb la EMT, tal i com suggereixen estudis realitzats amb altres tipus de càncers <sup>154</sup>, anava acompanyat, alhora, d'un increment de l'expressió dels gens característics de la pluripotència cel·lular en la línia cel·lular Mel270. Com es mostra en la **Figura R17** el tractament amb TGF- $\beta$  d'aquestes



## RESULTATS

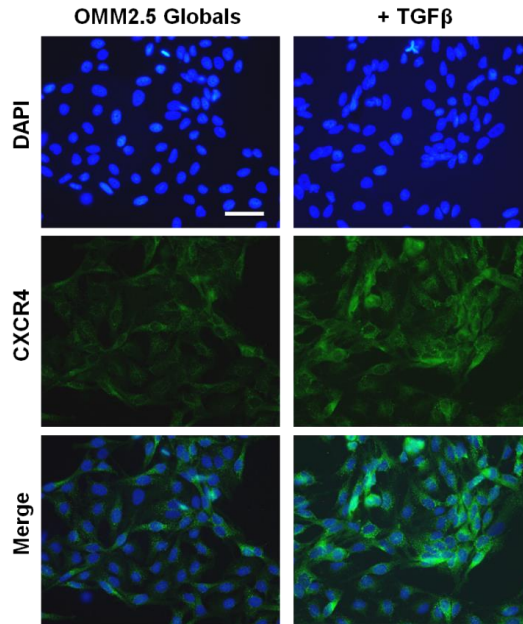
cèl·lules induïa un perfil propi de les CSC, que ja havíem observat prèviament en les cèl·lules provinents de les melanosferes, amb una alta expressió dels factors de transcripció *CT4*, *NANOG* i *SOX2*. Aquests efectes, no s'observaven en les línies OMM-2.5 i OMM-1, que malgrat respondre a TGF- $\beta$  a través de l'activació de SMADs, no adquirien els canvis genètics induïts a nivell de EMT i *stemness* observats en la Mel270.



**Figura R17: El TGF- $\beta$  indueix l'expressió de gens relacionats amb característiques pluripotencials (*OCT-4*, *NANOG*, i *SOX2*) en la línia cel·lular Mel270.** El diagrama de barres mostra l'increment de l'expressió d'aquests gens vers als controls de cadascuna de les línies de UM. Els resultats foren obtinguts mitjançant qPCR i com a controls vam utilitzar l'expressió de les cèl·lules crescudes en monocapa sense tractament amb TGF- $\beta$ . Els valors corresponen a la mitja i la SD dels triplicats tècnics d'un experiment representatiu de tres independents.

Un estudi de Bertran i col·laboradors relaciona la inducció del perfil EMT causat pel TGF- $\beta$  amb la sobreexpressió del receptor CXCR4 en els tumors a fetge <sup>155</sup>. Per això, nosaltres vam avaluar els nivells d'expressió proteica de CXCR4 en les cèl·lules de UM OMM-2.5 en cultius 2D després de tractar-les 60 hores amb TGF- $\beta$  2 ng/mL. L'anàlisi de CXCR4 per immunofluorescència (**Figura R18**) va

mostrar un marcatge positiu intens d'aquestes cèl·lules després del tractament amb TGF- $\beta$ .



**Figura R18: El tractament amb TGF- $\beta$  indueix la sobreexpressió de CXCR4 en les cèl·lules de UM.** Detecció de CXCR4 a les cèl·lules OMM2.5 (monocapa) amb o sense tractament amb 2 ng/mL de TGF- $\beta$  durant 60 hores. En verd, l'expressió de CXCR4 a la membrana. En blau dapi. Barra = 100 $\mu$ m.

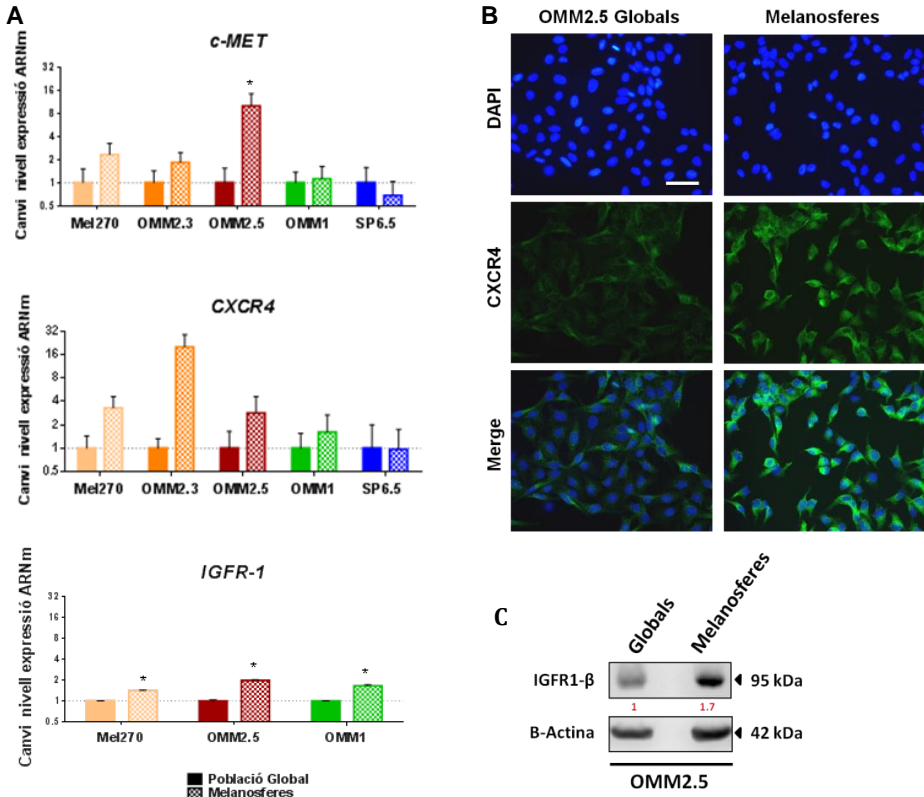
Com a resum d'aquest capítol podem dir que hem determinat una població cel·lular de les línies de UM capaç de créixer en melanosferes que presenta característiques de CSC i alhora una alta expressió de gens involucrats en la EMT.

### **3 ANÀLISI DE LES CAPACITATS MIGRATÒRIES DE LES MELANOSFERES DE UM**

Per estudiar l'especificitat del UM per metastatitzar al fetge vam analitzar l'efecte de les unions cMET-HGF, CXCR4-SDF1 i IGFR1 $\beta$ -IGF1, ja que els receptors es troben expressats en els melanòcits de l'úvea i els lligands són altament produïts pel fetge <sup>97,156,157</sup>.

#### **3.1 EXPRESSIÓ DELS RECEPTORS IGFR1- $\beta$ , c-MET I CXCR4 EN LES CÈL·LULES DE UM**

Primerament, vam analitzar l'expressió d'aquests receptors en les cèl·lules de UM procedents dels cultius en monocapa així com en les cèl·lules obtingudes a partir de melanosferes dels cultius 3D en absència de sèrum. En el cas de c-MET vam observar un increment de més de 2 vegades de la seva expressió en les melanosferes provinents de Mel270, OMM-2.3 i OMM-2.5 respecte les seves isogèniques. Vam detectar una sobreexpressió encara major del receptor CXCR4 en totes les melanosferes excepte les de SP6.5. També vàrem detectar un increment significatiu en l'expressió del receptor IGFR-1 $\beta$  en les melanosferes de Mel270, OMM-2.5 i OMM-1 en comparació amb les seves isogèniques (**Figura R19A**). Els resultats es van validar també a nivell proteic per la citoquina CXCR4 i el receptor de la insulina IGFR-1 $\beta$ . En el primer cas, la immunofluorescència amb un anticòs anti-CXCR4 conjugat amb fluorocrom verd va mostrar una major intensitat en les melanosferes de OMM2.5 en comparació amb l'observada en les cèl·lules crescudes en monocapa (població global) (**Figura R19B**). En el segon, l'anàlisi per western blot va validar la sobreexpressió de IGFR-1 $\beta$  en les melanosferes de OMM2.5 (**Figura R19C**).

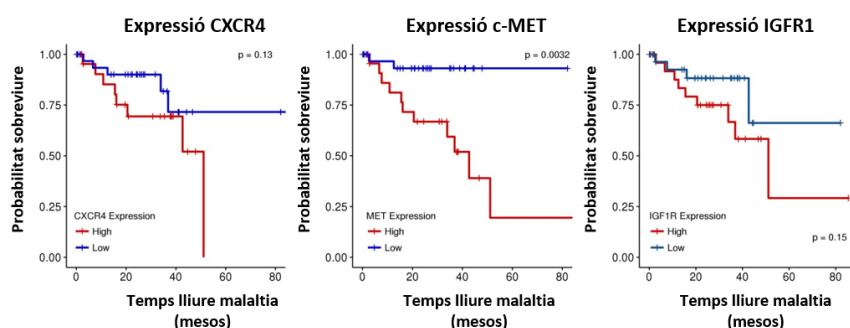


**Figura R19: Les cèl·lules procedents de melanosferes de UM expressen *c-MET*, *CXCR4* i *IGFR-1β*.** **A)** Els diagrames de barres mostren l'expressió relativa de *c-MET*, *CXCR4* i *IGFR-1β* en les melanosferes respecte a la de les monocapes per a cadascuna de les línies cel·lulars. Les barres representen la mitjana i la SD dels triplicats tècnics d'un experiment representatiu de tres experiments independents. Per l'anàlisi estadística es utilitzar el test T-student \*  $p < 0.05$ . **B)** Immunocitofluorescència de les cèl·lules procedents de monocapes (població global) i de melanosferes de la línia OMM2.5 amb un anticòs contra CXCR4 (verd). La tinció amb DAPI (blau) visualitza els nuclis. Barra = 100  $\mu$ m. **C)** Western blot dels extractes de la població global i de melanosferes de la línia cel·lular OMM2.5 on es veu la quantificació proteica del receptor de IGF1. Es van carregar 30  $\mu$ g de proteïna en cada carril i es va utilitzar  $\beta$ -Actina com a control de càrrega i normalitzador.

A continuació, ens vam preguntar si hi havia alguna associació entre els nivells d'expressió d'aquests receptors i l'evolució clínica dels pacients en el UM. Per això, vam analitzar la seva expressió en les dades públiques disponibles en el TCGA

## RESULTATS

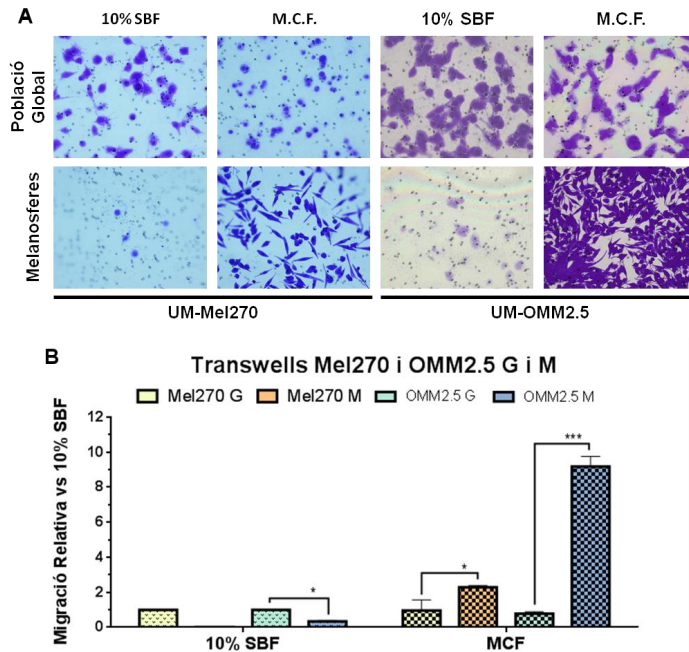
(<https://portal.gdc.cancer.gov/>) i vam trobar que la supervivència i el temps lliure de malaltia dels malalts estaven condicionats per la seva expressió, de manera que els tumors amb una expressió per sobre de la mediana de *CXCR4*, *c-MET* i *IGFR1* presentaven major risc de recaiguda (**Figura R20**).



### 3.2 CAPACITAT MIGRATÒRIA *IN VITRO* DE LES CÈL·LULES DE UM

Els resultats previs indiquen que les cèl·lules procedents del cultiu 3D (melanosferes) tenen característiques CSC-Like, expressen TF relacionats amb la EMT i els receptors IGF1 $\beta$ , *c-MET* i *CXCR4*. Per això, vam decidir avaluar la seva capacitat migratòria en comparació a la de les cèl·lules crescudes en monocapa (població global). L'assaig de migració per transwells realitzat va evidenciar que únicament les cèl·lules de les melanosferes eren capaces de migrar a través d'una matriu de col·lagen desnaturalitzat (gelatina) quan s'exposaven a un medi condicionat de fibroblasts (MCF) com a quimioatracent. Per contra, no es produïa migració cel·lular quan les melanosferes eren exposades a un quimioatracent inespecífic com és el DMEM:F12 amb 10% de sèrum boví fetal (SBF), vers el qual migraven només les

cèl·lules crescudes en monocapa de les línies cel·lulars Mel270 i OMM2.5 (**Figura R21**).

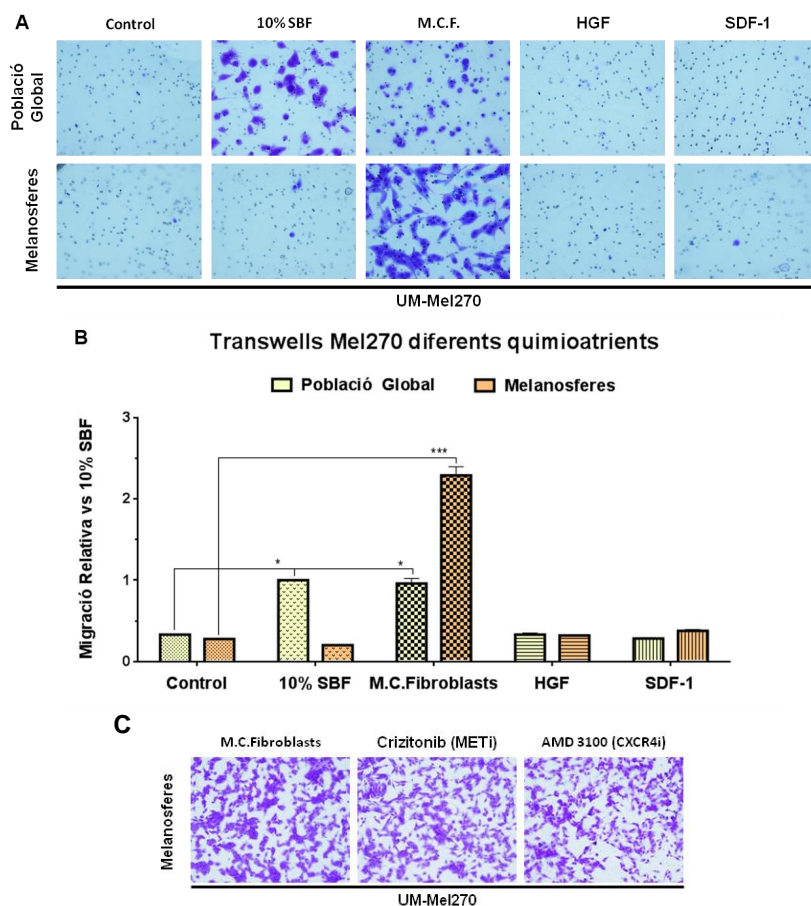


**Figura R21: Les melanòsomes de UM tenen una capacitat migratòria específica vers el MCF.** Assaig de migració per transwells de les poblacions globals i de melanòsomes de les línies cel·lulars Mel270 i OMM2.5. Es mostra la migració obtinguda a partir de  $2 \cdot 10^5$  cèl·lules després de 16 hores utilitzant com a quimioatracient un medi condicionat de fibroblasts murins o DMEM:F12 amb 10% SBF. **A)** Imatges representatives de la part inferior dels transwells tenyits amb violeta cristall (20x). **B)** Quantificació de les cèl·lules a la cara inferior de la membrana mitjançant la tinció amb violeta cristall. El diagrama de barres mostra l'absorbància a 570 nm de la solubilització del colorant d'un experiment representatiu de tres experiments independents. L'alçada de les barres indica la mitja dels duplicats i la SD \*  $p < 0.05$ . \*\*\*  $p < 0.0001$ . MCF = Medi Condicionat de Fibroblasts.

Per esbrinar les citocines responsables d'aquesta especificitat migratòria vam emprar els lligands de c-MET i CXCR4 com a quimioatracients. Ni el factor de creixement d'hepatòcits (HGF, lligand de c-MET) ni el CXCL12/SDF-1 (ligand de CXCR4) individualment van induir una major resposta migratòria en les poblacions de

## RESULTATS

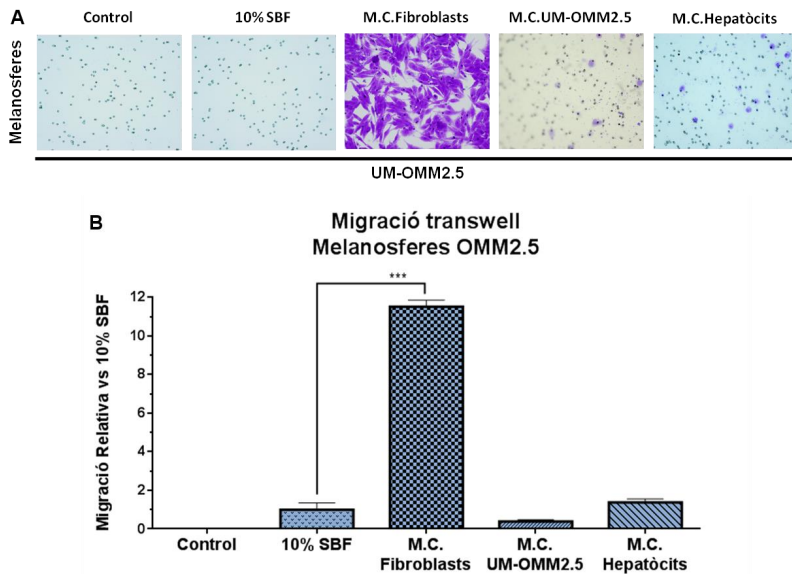
melanosferes respecte l'obtinguda amb sèrum boví fetal en la línia cel·lular Mel270 (**Figura R22A i B**). Tampoc el tractament amb els inhibidors (1 hora abans d'afegir el MCF) Crizitonib (inhibidor de c-MET) ni AMD3100 (inhibidor de CXCR4) van causar una inhibició de la migració en la població de les melanosferes (**Figura R22C**).



**Figura R22: L'HGF i el SDF-1 no indueixen la migració específica de les melanosferes de UM.** Assaig de migració per transwells de les poblacions globals i de melanosferes de la línia cel·lular Mel270 amb diferents quimioatients. Es mostra la migració obtinguda a partir de  $2 \cdot 10^5$  cèl·lules després de 16 hores vers un MCF, el HGF i el SDF-1. **A)** Imatges representatives de la part inferior dels transwells tenyits amb violeta cristall (20x). **B)** Quantificació de les cèl·lules a la cara inferior de la membrana mitjançant la tinció amb violeta cristall. El diagrama de barres mostra l'absorbància a 570 nm de la solubilització del colorant d'un

experiment representatiu de tres experiments independents. L'alçada de les barres indica la mitja dels duplicats i la SD \*  $p < 0.05$ . \*\*\*  $p < 0.0001$ . MCF = Medi Condicionat de Fibroblasts. **C)** Imatge representativa de la incapacitat dels inhibidors de MET i CXCR4 de bloquejar la migració de les melanosferes de Mel270 atretes pel MCF (10x).

A continuació, vam analitzar l'efecte del medi condicionat per elles mateixes i un medi d'hepatòcits neonatals (MCH) com a quimioatracients, a la fi de descartar un efecte autocrí i possibles elements comuns entre el MCF i MCH <sup>95,158</sup>. Com es mostra en la **Figura R23** vam comprovar que les melanosferes de OMM2.5 només migraven amb el MCF, ja que no s'observava un increment en la migració superior al produït pel DMEM + 10% SBF en cap de les altres situacions.



**Figura R23: Les cèl·lules de les melanosferes de UM migren únicament sota l'efecte de components específics del MCF.** Assaig de migració per transwells de les poblacions globals i de melanosferes de la línia cel·lular OMM-2.5 enfront diferents quimioatracients. Es mostra la migració obtinguda a partir de  $2 \cdot 10^5$  cèl·lules després de 16 hores enfront un MCF, un MCH i un MC de les cèl·lules OMM2.5. **A)** Imatges representatives de la part inferior dels transwells tenyits amb violeta cristall (20x). **B)** Quantificació de les cèl·lules a la cara inferior de la membrana mitjançant la tinció amb violeta cristall. El diagrama de barres mostra

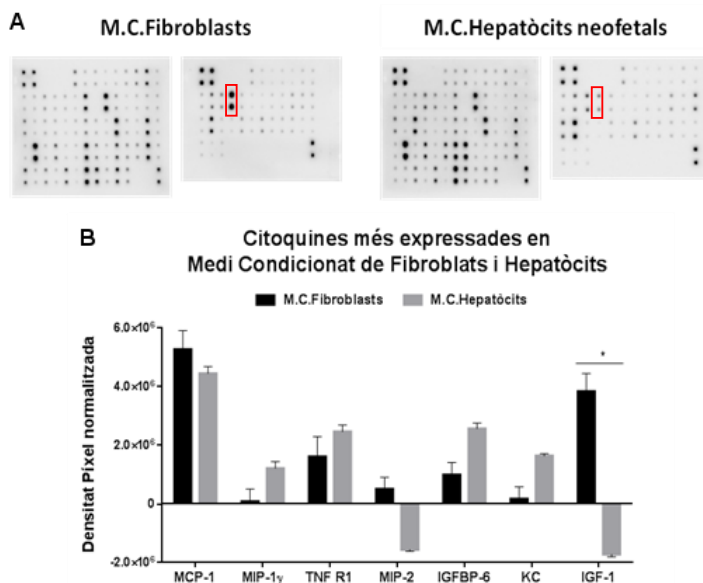


## RESULTATS

l'absorbància a 570 nm de la solubilització del colorant d'un experiment representatiu de tres experiments independents. L'alçada de les barres indica la mitja dels duplicats i la SD \*\*\*  $p < 0.0001$ . MCF = Medi Condicionat de Fibroblasts, MCH = Medi Condicionat Hepatòcits, MC = Medi Condicionat.

### 3.3 LA SENYALITZACIÓ A TRAVÉS DE IGFR-1 ÉS IMPORTANT PER A LA MIGRACIÓ DE LES MELANOSFERES DE UM

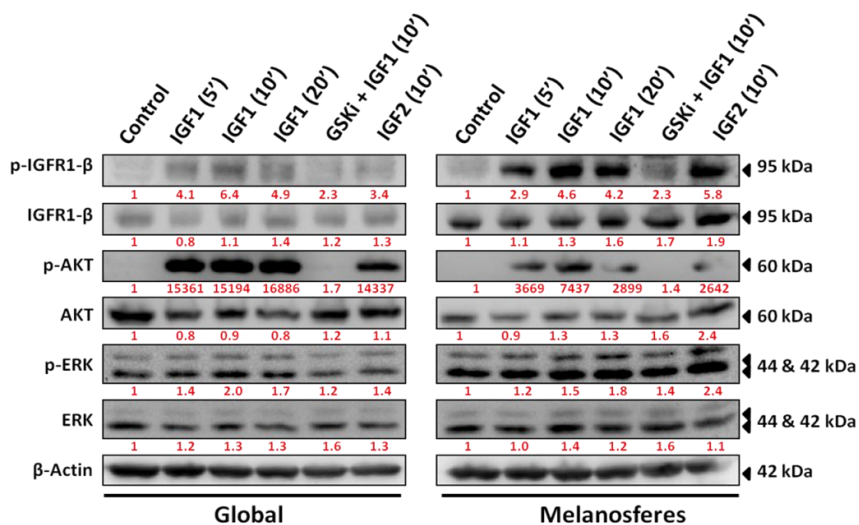
Mitjançant un array de citoquines detectat per ELISA vam determinar quines eren les citoquines majoritàriament expressades en el MCF en comparació a les presents en el MCH. Les imatges dels immunoblots obtinguts en cada medi es mostren en la **Figura R24A**. En ambdós casos hi predominava l'expressió de citoquines proinflamatòries (MCP1, MIP-1, TNF-R1, MIP-2, KC) juntament amb altres relacionades amb el cicle cel·lular i la proliferació (IGFBP-6 i IGF-1). Tot i que gran part de les citoquines més expressades coincidien, la senyal del IGF-1 era l'única citoquina que estava significativament molt més expressada en el MCF que en el MCH (**Figura R24B**).



**Figura R24: El factor de creixement IGF-1 es troba diferencialment present en el MCF en comparació amb el MCH.** Immunoblot de les citoquines presents en el MCF i MCH obtingut amb l'array *RayBio C-Series Mouse Cytokine Antibody Array C1000*. **A)** Imatge representativa de la membrana blotada amb els medis corresponents. Enquadrat en vermell es mostra l'expressió de IGF-1 **B)** Densitometria amb les 5 citoquines més expressades per cada medi normalitzades amb la mitjana dels valors obtinguts en els diversos controls positius de les membranes. S'observen diferències significatives entre els dos medis en la citoquina IGF-1. \*  $p < 0.05$ . Imatges representatives de dos experiments independents.

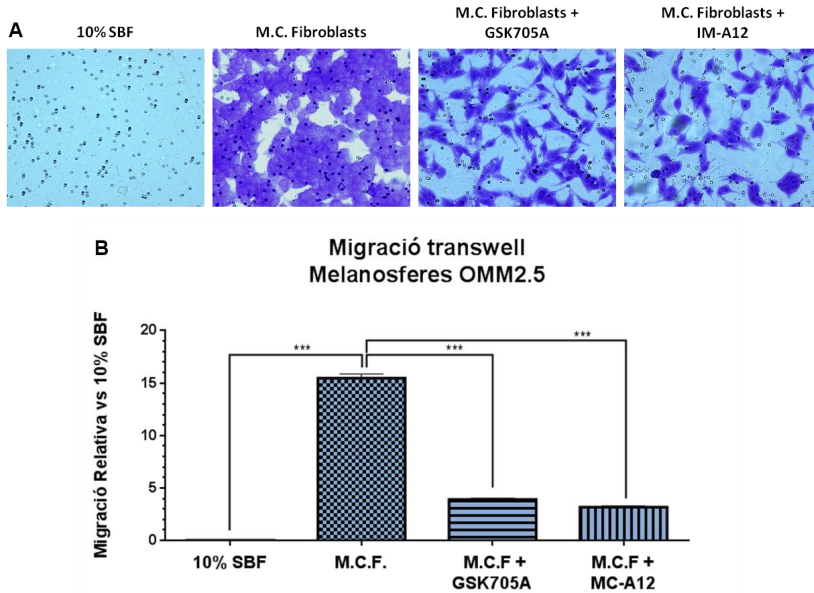
Per validar l'efecte de l'IGF-1 en la migració de les cèl·lules de UM es van tractar les cèl·lules de la línia OMM2.5 amb 100 nM d'aquest factor de creixement i es va realitzar un western blot per detectar la fosforilació del seu receptor al cap de 5, 10 i 20 minuts. A més, es va analitzar la seva resposta enfront a IGF-2 i a IGF-1 posteriorment al tractament amb un inhibidor contra el receptor IGFR-1 $\beta$  (GSK705A). Vam constatar que es produïa una ràpida fosforilació del receptor de IGF-1, a partir dels 5 minuts, i que aquest fet era especialment remarcable en la subpoblació de les melanosferes. Tot i que l'activació de IGFR-1 $\beta$  es donava també a través de IGF-2, els nivells de IGFR-1 $\beta$  fosforilats es reduïen significativament quan s'utilitzava l'inhibidor GSK705A a 1  $\mu$ M. En els casos en que s'activava la senyalització a través de IGFR-1 $\beta$ , a més, es produïa una fosforilació subsidiària de AKT. Per contra, la fosforilació de ERKs s'observava de manera independent a IGF-1 (**Figura R25**).

## RESULTATS



**Figura R25: El tractament amb IGF-1 causa una ràpida fosforilació del receptor IGFR-1β de les cèl·lules de UM.** Western blot de les poblacions global i de melanosferes en la línia OMM-2.5 després de tractar-les amb IGF-1 (100 ng/mL), IGF-1 (100 ng/mL) en presència de l'inhibidor GSK705A (1μM) (GSKi), o IGF-2 (100ng/mL) i vehicle com a control. Es mostra una ràpida fosforilació de IGFR-1β i AKT en tots els casos excepte en les cèl·lules tractades amb l'inhibidor. Es van carregar 30μg d'extracte cel·lular per carril i la quantificació fou normalitzada amb la senyal de β-Actina. Es mostra una composició representativa de dos experiments independents.

En aquest punt, atesa la presència de IGF-1 en el MCF i després de comprovar els efectes sobre la fosforilació del seu receptor a les cèl·lules procedents de les melanosferes de UM, vam realitzar uns assaigs de migració per transwells bloquejant el receptor IGFR-1β. Primer, vam tractar les melanosferes de OMM-2.5 amb l'anticòs recombinant humà IMC-A12 o bé amb un fàrmac específic contra el receptor IGFR-1β (GSK705A) durant 1 hora. Posteriorment, vam sembrar les cèl·lules a la part superior dels transwells utilitzant el MCF com a quimioattractant. El bloqueig d'aquest receptor per qualsevol d'aquests dos mètodes va resultar en una inhibició significativa de la migració de les cèl·lules de les melanosferes, reduint-la en més del 75% (**Figura 26**).

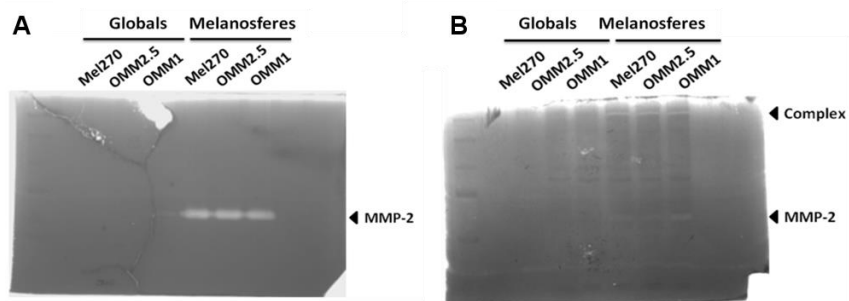


**Figura R26: El bloqueig del receptor IGFR-1 $\beta$  resulta en una reducció significativa en la migració de les melanosferes.** Assaig de migració per transwells de les poblacions globals i de melanosferes de la línia cel·lular OMM-2.5 enfront el MCF amb diferents inhibidors. Es mostra la migració obtinguda a partir de  $2 \cdot 10^5$  cèl·lules després de 16 hores enfront un MCF després de bloquejar l'acció de IGFR-1 de les cèl·lules de UM afegint els inhibidors IMC-A12 (anticòs bloquejant) i GSK705A contra IGFR-1 $\beta$  a la part superior del transwell. **A)** Imatges representatives de la part inferior dels transwells tenyits amb violeta cristall (20x). **B)** La quantificació de les cèl·lules a la cara inferior de la membrana mitjançant la tinció amb violeta cristall. El diagrama de barres mostra l'absorbància a 570 nm de la solubilització del colorant d'un experiment representatiu de tres experiments independents. L'alçada de les barres indica la mitjana dels duplicats i la SD \*\*\*  $p < 0.0001$ . MCF = Medi Condicionat de Fibroblasts.

Un estudi de Lorenc i els seus col·laboradors <sup>159</sup> va demostrar que l'activació de la via de IGFR-1 $\beta$  a través del seu lligand incrementa addicionalment a la fosforilació de AKT la motilitat cel·lular a través de les metal·loproteïnes (MMPs). Així, les MMPs jugarien un paper important en la invasió i metàstasi. A causa del fenotip migratori observat en les cèl·lules de UM provinents de melanosferes nosaltres vam voler comparar l'activitat gelatinolítica produïda per les cèl·lules

## RESULTATS

de les melanosferes i de la població global en tres línies cel·lulars de UM. Mitjançant un anàlisi de zimografia (SDS-PAGE amb una matriu de gelatina) vam detectar una elevada presència de MMP-2 en el medi provinent de cèl·lules de les línies Mel270, OMM-2.5 i OMM-1 capaces de créixer en melanosferes. En canvi, no vam detectar activitat zimogràfica en cap dels medis obtinguts de les línies cel·lulars analitzades (**Figura R27A**). Així mateix, l'activitat MMP-2 fou detectada només en les cèl·lules provinents de melanosferes (**Figura R27B**).



**Figura R27: Les poblacions de melanosferes alliberen gran quantitat de MMP-2 a l'espai extracel·lular. A)** Zimograma de les metal·loproteïnes (MMPs) presents en el medi obtingut de Mel270, OMM-2.5 i OMM-1. S'observa la banda corresponent a la MMP-2 (68 kDa) només en el medi obtingut per les melanosferes. **B)** Zimograma on s'analitza la presència d'aquesta MMP-2 en les cèl·lules provinents de melanosferes.

D'aquesta manera vam poder corroborar l'avantatge migratori que presenten les cèl·lules obtingudes a partir de melanosferes de les línies cel·lulars de UM, fet especialment sensible en la línia cel·lular OMM-2.5.

## **4 AVALUACIÓ DE LA RESPOSTA ANTIPROLIFERATIVA CAUSADA PER INHIBIDORS DE TKR IN VITRO**

### **4.1 LES CÈL·LULES AMB CARACTERÍSTIQUES CSC-LIKE SÓN MÉS RESISTENTS ALS INHIBIDORS DE PROTEÏNA QUINASES**

A causa de les diferències observades entre la població de cèl·lules crescudes en melanosferes i la població global vam investigar en ambdues poblacions l'efecte de diversos inhibidors sintètics contra les següents proteïna quinases: CaMK, CDK, CKI & II, EGFRK, GSK, IKK, IGFR, JAK, JNK, MAPK, MEK, MLCK, PI3K, PDGFRK, PKA, PKC, RAF, SAPK, Src-family i VEGF entre d'altres. Mitjançant la llibreria *Screen-Well® Kinase Inhibitor Library; Enzo, Catalog #BML-2832-0100* vam avaluar l'efecte antiproliferatiu i de supervivència causats per aquests inhibidors en les línies cel·lulars portadores de la mutació *GNAQ* (Q209P) Mel270, OMM-2.3 i OMM-2.5. Les cèl·lules viables de les monocapes o bé les resistents a l'anoikis de les diferents línies van ser sembrades directament en plaques de 96 pous en medi complet amb 5% SBF que els hi proporcionava els lligands de diferents receptors (RTKs) i també factors de creixement. 48 hores després de tractar les cèl·lules adherides al substrat amb 10  $\mu$ M de cada inhibidor o bé amb el vehicle (DMSO) vam determinar-ne l'efecte mitjançant l'assaig colorimètric WST-1 (que mesura la reducció del substrat per les cèl·lules metabòlicament actives o viables).

Els resultats d'aquesta primera anàlisi es mostren en forma de *Heatmap* en la **Figura R28**, on s'indiquen les vies de senyalització afectades pels inhibidors segons l'activitat metabòlica de les cèl·lules viables respecte els controls tractats únicament amb DMSO. Les vies de MAPK i de NF $\kappa$ B, juntament amb les ciclines nuclears, eren els grups que englobaven un major nombre d'inhibidors efectius contra

## RESULTATS

viabilitat cel·lular. Cal senyalar que varis inhibidors que afectaven les proteïnes PKC, PKA i PKG també eren capaços de comprometre la viabilitat respecte als controls. Pel que fa a la via de PI3K/AKT, només dos inhibidors (LY 204002 i Triciribine respectivament) afectaven la viabilitat cel·lular de les cèl·lules de UM *in vitro*. D'altra banda, només un dels inhibidors de GSK-3 $\beta$  (Kenpauillone) de la via de WNT, un dels canals de transport de calci (KN-42) i un de la via de JAK/Stat (ZM 449829) van resultar efectius. En el cas de l'inhibidor de ROCK va mostrar certa afectació de la viabilitat cel·lular en totes les línies cel·lulars. Finalment, vam observar que del gran ventall d'inhibidors contra els diversos TKGFR, només alguns contra els receptors de EGF i PDGF mostraven una alteració de la viabilitat en les cèl·lules de UM.

Via	Num	Inhibidor	Diana	Mel270		OMM2.3		OMM2.5	
				G	A	G	A	G	A
WNT	72	Kenpauillone	GSK-3 $\beta$						
	70	Indirubin-3'-monooxime	GSK-3 $\beta$						
	69	Indirubin	GSK-3 $\beta$ , CDK5						
PKC & PKA	31	GF 109203X	PKC						
	32	Hypericin	PKC						
	36	H-8	PKA, PKG						
	5	H-9-HCl	PKA, PKG, MLCK & PKC.						
	38	HA-1077-2HCl	PKA, PKG						
	34	D-erythro-Sphingosine (DES)	PKC						
	58	Rottlerin	PKC $\delta$						
	67	2,2',3,3',4,4'-Hexahydroxy-1,1'-biphenyl-6,6'-dimethanol dimethyl ether (HBDDE)	PKC $\alpha$ , PKC $\gamma$						
	33	Ro 31-8220 mesylate	PKC						
	37	HA-1004-HCl	PKA, PKG						
	35	H-89-2HCl	PKA						
	22	PKC-412	PKC						
	4	H-7-2HCl	PKA, PKG, MLCK & PKC						
	57	Palmitoyl-DL-carnitine	PKC						

# RESULTATS

MAPK	43	ML-9 HCl	MLCK			
	68	SP 600125	JNK			
	2	U-0126	MEK			
	3	SB-203580	p38 MAPK			
	1	PD-98059	MEK			
	42	ML-7 HCl	MLCK			
	53	ZM 336372	cRAF			
	49	5-Iodotubericidin	ERK2, adenosine kinase, CK1, CK2			
	51	SB-202190	p38 MAPK			
	56	GW 5074	cRAF			
RhoA	71	Y-27632·2HCl	ROCK			
Ca <sup>2+</sup>	40	KN-62	CaMK II			
	41	KN-93	CaMK II			
TKGFR	18	TYRPHOSTIN AG 1478	EGFRK			
	52	PP2	Src family			
	10	RG-1462	EGFRK			
	55	AG-1296	PDGFRK			
	11	TYRPHOSTIN 23	EGFRK			
	28	AG-879	NGFRK			
	15	TYRPHOSTIN 51	EGFRK			
	27	AG-370	PDGFRK			
	20	TYRPHOSTIN 9	PDGFRK			
	7	AG-494	EGFRK, PDGFRK			
	8	AG-825	HER1-2			
	54	SU 4312	Fik1			
	9	Lavendustin A	EGFRK			
	24	PP1	Src family			
	12	TYRPHOSTIN 25	EGFRK			
	39	2-Hydroxy-5-(2,5-dihydroxybenzylamino)benzoic acid (HDBA)	EGFRK, CaMK II			
	79	BML-285	EGFRK			
	14	TYRPHOSTIN 47	EGFRK			
	61	Erbstatin analog	EGFRK			
	13	TYRPHOSTIN 46	EGFRK, PDGFRK			
	23	Piceatannol	Syk			
63	SU1498	Fik1				
21	Hydroxy-2-naphthalenylmethylphosphonic acid (HNMPA)	IRK				
PI3K	74	Triciribine	Akt signaling pathway			
	29	LY 294002	PI 3-K			
	75	BML-257	Akt			
	80	Rapamycin	mTOR			
	30	Wortmannin	PI 3-K			
	62	Quercetin·2H2O	PI 3-K			
CICLINES	48	Roscovitine	CDK			
	46	Olomoucine	CDK			
	44	2-Aminopurine	p58 PITSLRE β1			
	45	N9-isopropyl-olomoucine	CDK			
	77	BML-259	CDK5/p25			
JAK Stat	64	ZM 449829	JAK-3			
	25	AG-490	JAK-2			
NF-κB	73	Terreic acid	BTK			
	26	AG-126	IRAK			
	50	LFM-A13	BTK			
	66	5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB)	CK II			
	76	SC-514	IKK2			
	65	BAY 11-7082	IKK pathway			
	78	Apigenin	CK II			



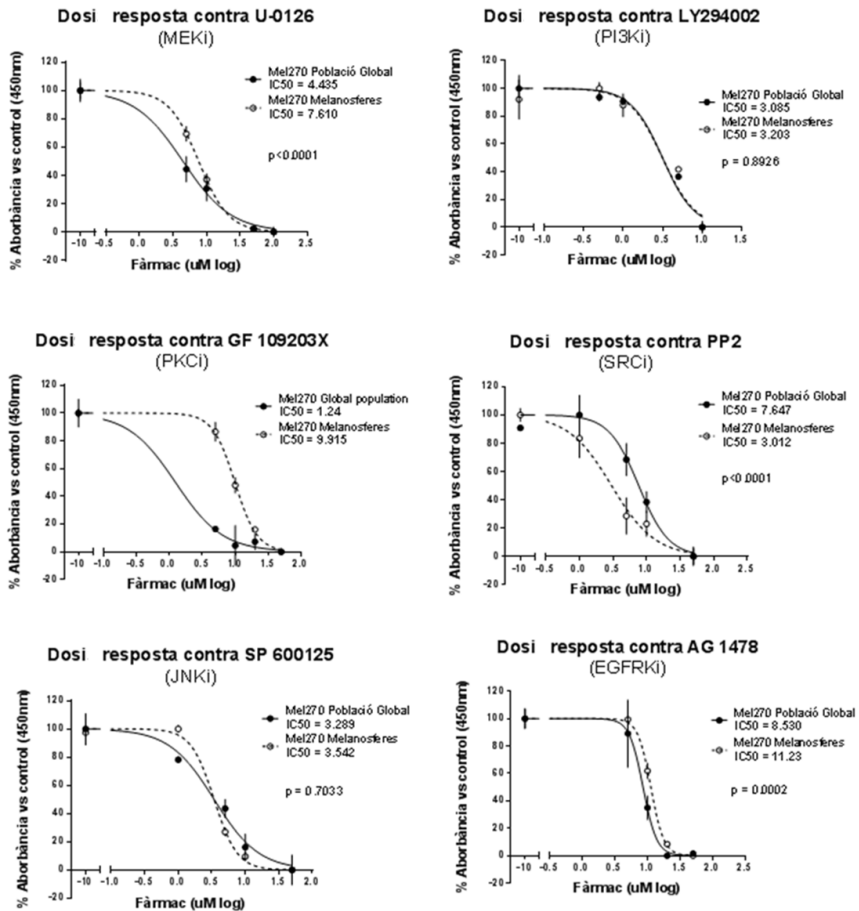


## RESULTATS

**Figura R28. El tractament amb inhibidors de proteïna quinases compromet la viabilitat cel·lular *in vitro* de les cèl·lules de UM.** Heatmap representatiu de l'efecte sobre la viabilitat cel·lular de cadascun dels 80 inhibidors de la llibreria *Screen-Well® Kinase Inhibitor Library; Enzo, Catalog #BML-2832-0100*. Les senyals de gradació de color indiquen la viabilitat cel·lular relativa al control (vehicle), on vermell (= 0) significa que no hi ha cèl·lules viables i verd (= 1) que tenen la mateixa viabilitat que el control. Les cèl·lules procedents de monocapa (G) i les resistents a l'anoikis (A) de les línies Mel270, OMM-2.3 i OMM-2.5 van ser tractades durant 24 hores amb 10  $\mu$ M de fàrmac i es va mesurar la seva viabilitat mitjançant l'assaig amb WST-1. Els inhibidors es troben agrupats segons la via de senyalització que afecten.

D'altra banda, aquesta anàlisi ens va indicar que la línia cel·lular provinent d'un tumor primari (Mel270) era més sensible als inhibidors de TK que les línies cel·lulars provinents de metàstasis hepàtiques (OMM-2.3 i OMM-2.5), ja que la mateixa concentració de fàrmacs resultava en una major reducció del nombre de cèl·lules metabòlicament actives. Al comparar l'efecte d'aquests inhibidors entre la població resistent a l'anoikis i la població global (procedent de monocapes), vam observar una efectivitat lleugerament menor contra les cèl·lules resistents a l'anoikis. Finalment, vam seleccionar els inhibidors GF109X, U-0126, SP 600125, AG 1478, PP2 i LY 29002, com a candidats més prometedors per a la validació del seu efecte a diferents concentracions.

A continuació, vam avaluar l'efecte causat pel tractament a les cèl·lules procedents de cultius 2D (població global) i de melanosferes de la línia cel·lular de Mel270 durant 48h amb els inhibidors seleccionats a concentracions creixents (de 100 nM a 100  $\mu$ M). Els resultats de la **Figura R29** indiquen que les cèl·lules amb un fenotip CSC-Like (procedents de les melanosferes) presentaven una major resistència farmacològica contra els inhibidors de MEK (U-0126), PKC (GF 109X) i EGFRK (AG 1478) en comparació a la població global. Per contra, l'inhibidor competitiu de SRC, PP2, mostrava una IC 50 en melanosferes menor a la observada en la població global. Finalment, els inhibidors de JNK (SP 600125) i de PI3K (LY 294002) resultaven igualment efectius contra ambdues poblacions.



**Figura R29: Les melanosferes de UM presenten menor sensibilitat enfront els inhibidors de PKC, MEK i SRC.** Els diferents gràfics indiquen la sensibilitat de les cèl·lules procedents de cultius en monocapa (població global) (línia contínua) i de melanosferes (línia discontinua) de Mel270 vers les concentracions creixents de cadascun dels fàrmacs. Els resultats són representatius d'un de tres experiments independents i s'expressen com a percentatge de viabilitat respecte els valors obtinguts amb les cèl·lules tractades amb DMSO (control) i corresponen a la mitjana ± SD de 6 rèpliques. Els valors de IC50 indiquen la concentració necessària d'inhibidor per reduir el 50% de la viabilitat del control, obtinguda per l'assaig metabòlic WST-1. Es mostren diferències significatives entre els valors determinats per melanosferes i la població global en els inhibidors de PKC, MEK i SRC. El valor de significació es va calcular amb el test extra-sum-of-squares F test.

## RESULTATS

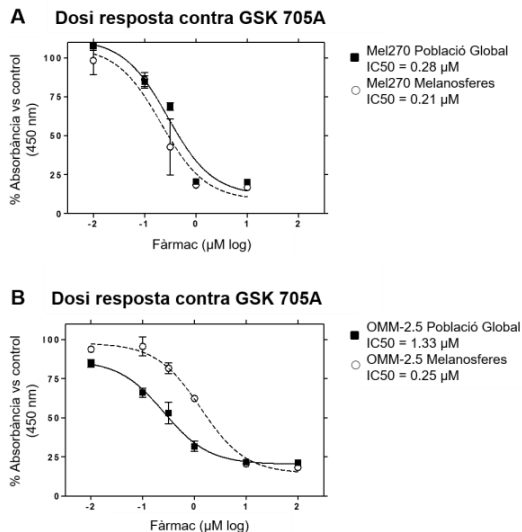
Després de calcular les IC50 de cadascun d'aquests inhibidors també en les línies OMM-2.5 i OMM-1 i les seves melanosferes vam observar una resposta similar, ja que de nou, les IC50 de les cèl·lules procedents de les melanosferes d'ambdues línies eren superiors a les observades en les poblacions globals. A més, vam comprovar l'aturada del cicle cel·lular causada per la concentració determinada com a IC50 per aquests inhibidors. Mitjançant la incorporació d'Uridina a través de l'assaig de proliferació per BrdU vam validar l'efectivitat de U-0126, GF 109X, PP2, SP 600125 i AG 1478, malgrat en el cas de l'últim, la dosi necessària efectiva va resultar ser molt més elevada. Sorprenentment, a través d'aquest assaig, l'inhibidor de PI3K, LY 294002, va resultar ineficaç en la reducció de la proliferació cel·lular (**Taula R4**).

**Taula R4. IC50 dels inhibidors en les cèl·lules de UM.** IC50 és la dosi causant de la inhibició de la proliferació en el 50% de la població cel·lular. Amb el fons gris, valors calculats a partir de les mesures d'absorbància obtingudes amb l'assaig metabòlic WST-1. Amb el fons blanc, percentatge de cèl·lules BrdU+. 2D: Cèl·lules crescudes en monocapa. Melanos: Cèl·lules provinents de melanosferes.

FÀRMAC		LÍNIA CEL·LULAR					
		Mel270		OMM-2.5		OMM-1	
		2D	Melanos	2D	Melanos	2D	Melanos
U-0126 (MEKi)	IC50 (µM)	<b>4,44</b>	<b>7,61</b>	<b>11,22</b>	<b>11,28</b>	<b>11,71</b>	<b>6,74</b>
	BrdU+ (%)	1,56	8,40	1,19	2,53	0,53	0
LY 294002 (PI3Ki)	IC50 (µM)	<b>3,09</b>	<b>3,20</b>	<b>3,14</b>	<b>3,77</b>	<b>5,08</b>	<b>5,12</b>
	BrdU+ (%)	51,61	100,46	92,99	88,17	77	64,55
SP 600125 (JNKi)	IC50 (µM)	<b>3,28</b>	<b>3,54</b>	<b>5,69</b>	<b>4,60</b>	<b>3,43</b>	<b>4,59</b>
	BrdU+ (%)	84,6	52,41	36,87	59,58	36,17	23,94
GF109203X (PKCi)	IC50 (µM)	<b>1,24</b>	<b>9,92</b>	<b>7,44</b>	<b>11,54</b>	<b>8,99</b>	<b>10,86</b>
	BrdU+ (%)	15,51	30,93	30,9	15,97	23,98	5,86
PP2 (Src)	IC50 (µM)	<b>7,65</b>	<b>3,01</b>	<b>3,77</b>	<b>7,31</b>	<b>3,08</b>	<b>6,80</b>
	BrdU+ (%)	65,53	44,33	48,63	48,44	41,17	33,27
AG 1478 (EGFRKi)	IC50 (µM)	<b>8,53</b>	<b>11,23</b>	<b>17,34</b>	<b>15,47</b>	<b>6,09</b>	<b>5,51</b>
	BrdU+ (%)	82,37	52,2	43,5	57,29	92,72	98,63

## 4.2 EL BLOQUEIG DE LES VIES DE MAPK I TKR COMPROMETEN LA SUPERVIVÈNCIA DE LES CÈL·LULES DE UM AMB FENOTIP DE CSC

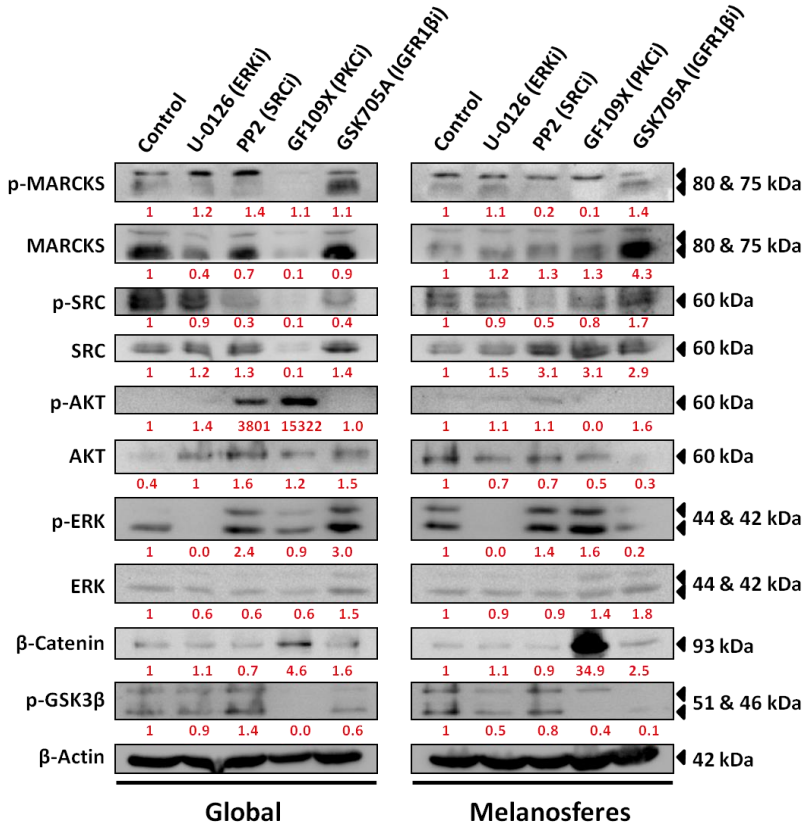
Entre els quatre inhibidors més eficients (U-0126, GF 109X, PP2, SP 600125) l'inhibidor de JNK va ser descartat com a possible candidat contra el UM per la manca de molècules específiques contra aquesta diana. La proteïna quinasa JNK conté una seqüència molt conservada genèticament, que es troba repetida en diverses molècules; és per això, que tots els fàrmacs desenvolupats fins a data d'avui han estat farmacològicament ineficients a la clínica <sup>160,161</sup>. L'actual existència en clínica de molècules contra la resta de dianes postulades ens va fer analitzar més a fons el mecanisme d'acció d'aquests inhibidors. Mitjançant western blot vam determinar l'efecte causat pels inhibidors de MEK, SRC i PKC en la senyalització cel·lular tant de la població global (cultius 2D) com de la provinent de melanosferes de la línia OMM-2.5. A més, i tenint en compte els resultats del capítol anterior hi vam afegir el tractament amb l'inhibidor de IGFR-1 $\beta$  (GSK 705A) la IC<sub>50</sub> del qual fou de 1.3  $\mu$ M (**Figura R30**).



## RESULTATS

**Figura R30: L'inhibidor de IGFR-1 GSK705A compromet la supervivència de les cèl·lules de Mel270 i OMM-2.5.** Els histogrames mostren la sensibilitat de les cèl·lules procedents de cultius en monocapa (població global) i de melanosferes de Mel270 **(A)** i OMM2.5 **(B)** vers les concentracions creixents de l'inhibidor de IGFR-1 GSK 705A. Els resultats són representatius d'un de tres experiments independents i s'expressen com a percentatge de viabilitat respecte els valors obtinguts amb les cèl·lules tractades amb DMSO (control) i corresponen a la mitjana  $\pm$  SD de 6 rèpliques. Els valors de IC50 indiquen la concentració necessària d'inhibidor per reduir el 50% de la viabilitat del control, obtinguda per l'assaig metabòlic WST-1.

Les cèl·lules van ser tractades amb l'inhibidor de MEK (U-0126) durant 6h i per immunoblot vam detectar una disminució dels nivells de la proteïna ERK fosforilada però la resta de les vies analitzades de senyalització no es van trobar afectades. Per contra, el tractament durant 6 hores amb l'inhibidor competitiu contra SRC (PP2) va disminuir de forma eficaç els nivells de SRC fosforilat però va resultar en un increment de l'expressió de les proteïnes AKT i ERK fosforilades, especialment en la població global. La incubació durant 16 hores de les cèl·lules OMM2.5 amb GF109X, inhibidor de les isoformes  $\alpha$  i  $\beta$ 1 de PKC, es va traduir en una reducció significativa dels nivells de MARCKS fosforilat -un substrat directe de la PKC- tant en la població global com en la de melanosferes. Tot i això, aquesta inhibició va resultar en un elevat increment dels nivells de AKT fosforilat especialment en la població global. A més a més, probablement induïa una acumulació de  $\beta$ -Catenina al nucli, atès que el nivells GSK3 $\beta$  fosforilada es mostraven baixos. Finalment, el tractament durant 16 hores amb el fàrmac contra IGFR-1 $\beta$  (GSK705A) va reduir els nivells de ERK i GSK-3 $\beta$  fosforilades en les cèl·lules de melanosferes però no va disminuir la fosforilació de ERK en les cèl·lules de la població global **(Figura R31)**.



**Figura R31: La inhibició de ERK i de IGFR-1β compromet la supervivència cel·lular sense sobreactivar vies de senyalització alternatives.** Western blot de les poblacions globals i de melanosferes de OMM2.5 tractades amb inhibidors contra ERK (5μM), SRC (5μM), PKC (10μM) i IGFR1β (1μM). Valors de l'immunoblot obtinguts a partir de 30 μg de proteïna per carril comparant-los amb el control del primer carril i normalitzats amb β-Actina.

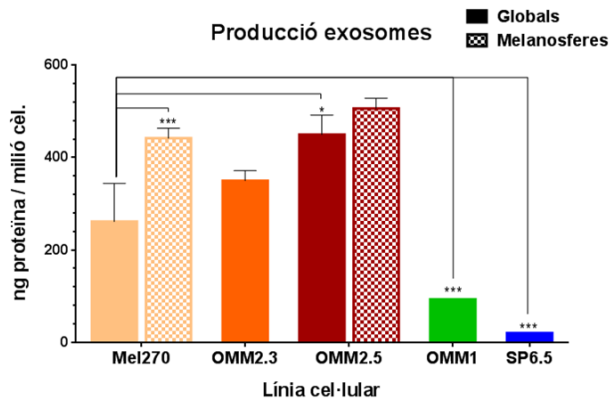
Amb aquests resultats nosaltres suggerim una combinació d'inhibidors contra ERK i IGFR-1 per tal d'inhibir el creixement cel·lular sense incrementar la senyalització alternativa alhora que bloquejaríem en gran mesura la migració cel·lular.

## **5 QUANTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DELS EXOSOMES PRODUÏTS *IN VITRO* PER LES CÈL·LULES DE UM**

Diversos estudis apunten també als exosomes com a principals responsables de l'organotropisme i les metàstasis per la seva habilitat d'encapsular i transferir proteïnes, àcids nucleics, citoquines i factors de creixement involucrats en la metàstasi <sup>78,79,85</sup>. Per aquest motiu vam analitzar la producció d'exosomes d'algunes línies cel·lulars de UM *in vitro*.

### **5.1 LES LÍNIES CEL·LULARS DE UM PROVINENTS DE METÀSTASIS O MELANOSFERES PRODUEIXEN UNA MAJOR QUANTITAT D'EXOSOMES *IN VITRO***

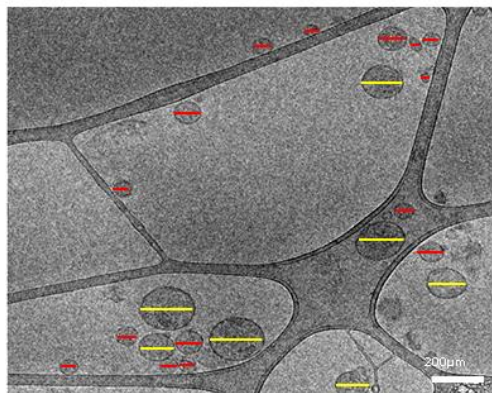
L'aïllament d'exosomes de les cèl·lules de UM cultivades *in vitro* es va realitzar a partir de la ultracentrifugació del medi condicionat obtingut de la incubació de les monocapes confluents al 70% durant 60 hores (en medi sense sèrum). Mitjançant la posterior quantificació per BCA, vam observar que les línies cel·lulars provinents de les metàstasis hepàtiques (OMM-2.3 i OMM-2.5) eren les major productores d'exosomes, amb 350 i 450 ng de proteïna aproximadament per cada  $10^6$  cèl·lules, respectivament. Per contra, la resta de línies cel·lulars avaluades secretaven una quantitat significativament menor d'aquestes microvesícules. Amb el mateix procediment es van aïllar els exosomes de les cèl·lules procedents de melanosferes de les línies Mel270 i OMM-2.5. En ambdós casos es va aïllar una quantitat d'exosomes superior al de les seves línies isogèniques, i similar entre elles, fet especialment remarcable en les melanosferes de la línia cel·lular de UM Mel270 (**Figura R32**).



**Figura R32: Les cèl·lules provinents de metàstasis hepàtiques i melanosferes produeixen una major quantitat d'exosomes *in vitro*.** Quantificació per BCA de les microvesícules alliberades al medi per part de les línies cel·lulars Mel270, OMM2.3, OMM2.5, OMM1 i SP6.5. Amb l'interior a quadres es mostren les quantificacions obtingudes a partir de melanosferes. Valors expressats per milió de cèl·lules. \* $p < 0.05$ . \*\*\* $p < 0.0001$ .

Per tal de confirmar que les molècules aïllades eren exosomes, vam determinar el seu diàmetre a través de la seva observació al microscopi electrònic. Tot i que actualment no hi ha un consens clar de quina és la mida exacta pròpia dels exosomes, les vesícules secretades d'entre 30-100  $\mu\text{m}$  amb un contingut proteic i d'àcids nucleics determinat són considerats exosomes <sup>162</sup>. A través de la microscopia electrònica nosaltres vam mesurar la mida de les microvesícules secretades per les melanosferes de la línia OMM-2.5. Encara que alguna de les microvesícules aïllades per ultracentrifugació tenia un diàmetre superior a l'establert com a característic dels exosomes (30-100 nm), vàrem concloure que aproximadament el 70% de les vesícules aïllades eren exosomes (Figura R33).

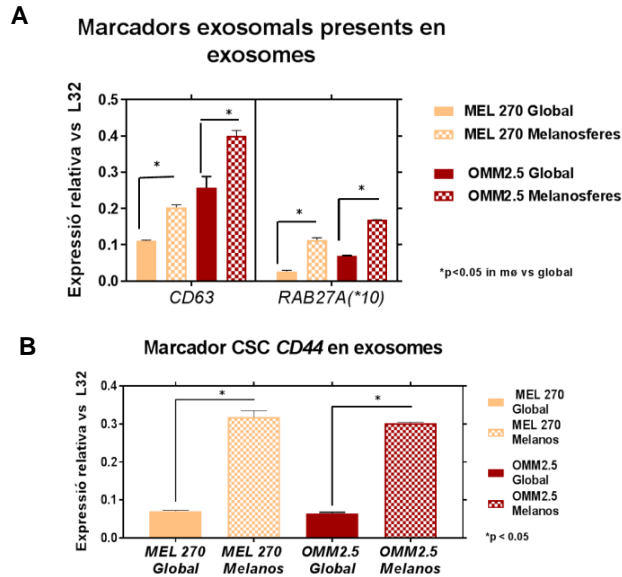




**Figura R33: Més del 70% de les vesícules obtingudes per ultracentrifugació són exosomes.** Anàlisi de les microvesícules aïllades de la línia OMM-2.5 a través de microscopia electrònica. Les vesícules amb diàmetres propis d'exosomes (30-100 µm) es troben marcades en vermell mentre que la resta de microvesícules es troben en groc (100-200 µm). Barra = 200 µm.

## 5.2 ELS EXOSOMES SECRETATS PER LES CÈL·LULES DE UM CONTENEN MARCADORS PROTEICS I ARNS ESPECÍFICS

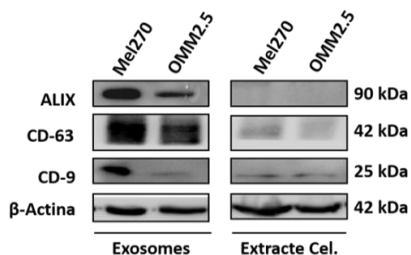
Com a marcadors propis dels exosomes s'han definit les tetraspanines CD63, CD9, CD81 i CD82, les molècules relacionades amb la biogènesi ALIX i Tsg101, les proteïnes de transport GTPases, Annexines i Flotilina, i les integrines que faciliten la unió amb les cèl·lules diana <sup>78</sup>. Així, nosaltres vam avaluar l'expressió d'ARNm del marcador relacionat amb la biogènesi *RAB27* i la tetrasparina *CD63* en els exosomes obtinguts de les poblacions globals i de melanosferes de les línies Mel270 i OMM-2.5. En tots els exosomes estudiats vam trobar una alta expressió d'ambdós gens amb un augment significatiu d'aquests marcadors en els exosomes de les melanosferes (**Figura R34A**). L'anàlisi de marcadors de cèl·lules mare en els exosomes va validar també la presència d'altres quantitats d'ARNm de *CD44* en les microvesícules secretades per part de les melanosferes de Mel270 i OMM-2.5 (**Figura R34B**).



**Figura R34: Els exosomes provinents de les melanosferes contenen alts nivells d'ARNm de CD63, RAB27 i CD44.** Nivells d'expressió gènica dels marcadors exosomals CD63 i RAB27A (**A**) i el marcador propi de les CSC CD44 (**B**) obtinguts per qPCR. Es mostra la mitjana de 3 repeticions tècniques  $\pm$  SD d'un experiment representatiu d'entre 3 extraccions diferents. Valors de *ddCt* normalitzats amb *GAPDH*. Es mostren diferències significatives entre els exosomes provinents de melanosferes i els de la població global. Anàlisi estadística realitzada amb el test T-Student \*  $p < 0.05$ .

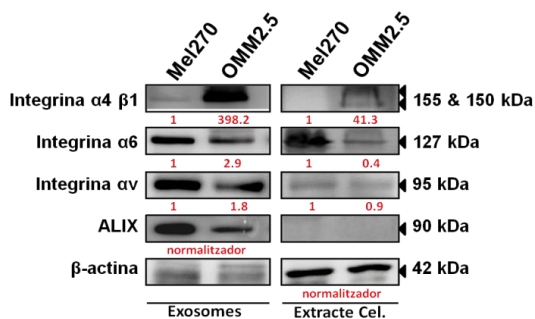
També a nivell proteic vam avaluar per western blot l'expressió dels marcadors exosomals Alix, CD63 i CD9 en els exosomes de Mel270 i OMM-2.5. Així, vam comprovar que a través de l'aïllament per ultracentrifugació dels components secretats en el medi de les cèl·lules de UM obteníem exosomes propis de cadascuna d'aquestes línies cel·lulars (**Figura R35**).

## RESULTATS



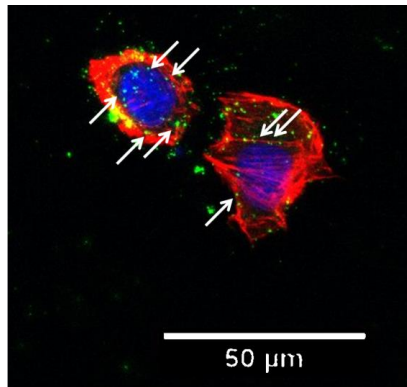
**Figura R35: L'extracte proteic obtingut de les microvesícules secretades per les cèl·lules de UM està enriquit en exosomes.** Western blot corresponent a l'anàlisi del contingut proteic de 12  $\mu$ g de la fracció obtinguda de les microvesícules de Mel270 i OMM2.5. S'observen els marcadors exosomal ALIX, CD63 i CD9 amb la  $\beta$ -Actina com a control de càrrega.

Després de caracteritzar les microvesícules obtingudes de les cèl·lules provinents de les línies Mel270 i OMM-2.5 vam avaluar més a fons el seu contingut proteic. Així doncs, vam mirar per western blot l'expressió de les integrines relacionades amb la metàstasi en els exosomes de Mel270 i OMM-2.5. Vam comprovar que els exosomes, especialment de les cèl·lules OMM-2.5, expressaven gran quantitat de les integrines  $\alpha 4$ ,  $\beta 1$  i  $\alpha 6$ . En la mateixa línia vam observar una elevada expressió de la integrina  $\alpha v$ , relacionada amb el tropisme a fetge<sup>85</sup>, en els exosomes de OMM-2.5 (**Figura R36**).



**Figura R36: Els exosomes alliberats per les cèl·lules de UM expressen un alt contingut d'integrines.** Western blot de les línies cel·lulars Mel270 i OMM2.5 on s'avaluen els nivells de les integrines  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 6$  i  $\alpha v$  presents en el contingut proteic de 12  $\mu$ g de la fracció d'exosomes o en 30  $\mu$ g d'extracte cel·lular. Els valors estan normalitzats amb ALIX en el cas dels exosomes i  $\beta$ -Actina en els extractes cel·lulars.

Finalment, vam comprovar si els exosomes secretats per les cèl·lules eren captats per les cèl·lules hepàtiques. D'aquesta manera, podrien intercanviar informació que faciliti la metastasi del UM, tal i com suggereixen Peinado i els seus col·laboradors en el melanoma cutani <sup>79</sup>. Per tal de fer un seguiment dels exosomes obtinguts en la línia de UM OMM-2.5 vam marcar les microvesícules aïllades per ultracentrifugació mitjançant la incorporació de PKH67. Posteriorment, vam tractar hepatòcits murins *in vitro* amb 25 ng d'aquests exosomes durant una nit, vam contratenyir les cèl·lules amb DAPI i fal·loïdina, i vam observar les cèl·lules sota un microscopi confocal. Com es mostra en la **Figura R37** els hepatòcits cultivats *in vitro* eren capaços de captar i internalitzar els exosomes provinents de cèl·lules de UM en un temps inferior a 16 hores.



**Figura R37: Els exosomes de UM són captats i internalitzats per hepatòcits *in vitro*.** Immunofluorescència d'hepatòcits cultivats *in vitro* tractats O/N amb exosomes provinents de la línia OMM-2.5. Imatge obtinguda amb un microscopi confocal. En blau, els nuclis cel·lulars tenyits amb DAPI. En verd, els exosomes de UM marcats amb PKH67. En vermell, les fibres d'estrès marcades amb fal·loïdina. Barra = 50 µm.

En resum, vam observar que les cèl·lules hepàtiques capten i internalitzen els exosomes derivats de les cèl·lules de UM. D'aquesta manera, les cèl·lules del tumor primari, i en especial les CSC, podrien enviar informació al nínxol pre-metastàtic que facilitarien la posterior adaptació del tumor en el fetge.



# DISCUSSIÓ

**Bases Moleculares i Estratègies Terapèutiques contra les Metàstasis  
del Melanoma Uveal**



El melanoma uveal (UM) és un tumor maligne derivat dels melanòcits de la cresta neural del tracte uveal. La incidència s'estima en 0,6 per 100.000 individus però constitueix un 80% de tots els tumors oculars en adults <sup>1</sup>. Es tracta d'un tumor amb un alt potencial metastàtic i fins a un 40% dels pacients desenvoluparan metàstasis hepàtiques que comportaran la seva mort. Aquesta situació no ha canviat en els darrers 30 anys <sup>163</sup>, a causa de la resistència que presenten les metàstasis als tractaments actuals, com la quimioteràpia <sup>5,6,59,164</sup>.

La disseminació de les cèl·lules de melanoma uveal (UM) des del tumor primari, ocorre exclusivament per via hematògena atesa l'absència de vasos limfàtics a l'ull <sup>165,166</sup>. La majoria de cèl·lules que entren al torrent sanguini des del tumor primari, inicien un procés d'apoptosi anomenat "anoikis", induït per la pèrdua d'ancoratge a la matriu extracel·lular que les envoltava <sup>60,137</sup>. Només les cèl·lules capaces de sobreviure a aquest procés podran arribar als òrgans distants on desenvoluparan metàstasis. En el cas del UM, l'òrgan preferent de les metàstasis és el fetge <sup>167,168</sup>, però les causes d'aquest tropisme encara no són del tot conegudes <sup>4,97,169</sup>.

En conseqüència, aquesta tesi té com a propòsit la cerca d'estratègies terapèutiques contra les cèl·lules metastàtiques amb tropisme pel fetge.



## **1 LES “CANCER STEM CELL-LIKE” DE MELANOMA UVEAL: NOVES DIANES CONTRA LES METÀSTASIS.**

Els tumors són heterogenis atès que contenen diversos tipus cel·lulars amb diferents característiques fenotípiques i moleculars. Les subpoblacions contingudes en el tumor estan organitzades jeràrquicament per una d'elles, les “Cancer Stem Cells” (CSC). Aquestes cèl·lules tenen capacitat pròpia de renovació i un alt potencial de diferenciació <sup>170,171</sup>. A més, només les CSC (altrament anomenades: TICs, *Tumor Initiating Cells*) tenen la capacitat d'iniciar i mantenir el creixement tumoral en models experimentals <sup>172</sup>. De fet, s'ha suggerit que poden ser la causa de les recidives tumorals, de la resistència als fàrmacs i les responsables de la metastasi <sup>38,173,174</sup>.

El procés metastàtic consisteix en diverses etapes: invasió, intravasació, extravasació i creixement metastàtic a l'òrgan diana <sup>58</sup>. Aquest procés és molt ineficient perquè la majoria de cèl·lules que entren al torrent sanguini des del tumor primari, inicien un procés d'apoptosi anomenat “anoikis”, induït per la pèrdua d'ancoratge a la matriu extracel·lular que les envolta <sup>60,137</sup>. De fet, la resistència a l'anoikis és un tret característic de les CSC <sup>138</sup>.

D'acord amb el que s'ha exposat, vam decidir fer els assajos terapèutics amb cèl·lules resistents a l'anoikis. Per això, en primer lloc vam estudiar si les línies cel·lulars de UM eren capaces de sobreviure i proliferar *in vitro* en condicions d'independència d'ancoratge al substrat, i vam analitzar algunes de les característiques pròpies de les CSC. Els nostres resultats indiquen que la majoria de les línies estudiades eren resistents a l'anoikis i, a més, capaces de proliferar en suspensió. Aquests resultats estaven d'acord amb els publicats recentment els quals demostraven que les cèl·lules procedents de tumors de UM són capaces de créixer en suspensió formant esferoides

multicel·lulars que sobreexpressen gens relacionats amb la resistència a l'anoikis <sup>36</sup>. També en aquest sentit, Tura i els seus col·laboradors van constatar la presència de cèl·lules de UM circulants i viables en gairebé tots els pacients inclosos en el seu estudi, de la mateixa manera que les cèl·lules de línies cultivades *in vitro* sobreviuen a l'anoikis. En contra del esperat, però, en el seu estudi el nombre o la presència de cèl·lules circulants no s'associava a la presència de metàstasi ni eren factor pronòstic en el moment de la seva detecció en sang <sup>175</sup>. Això suggereix que potser no totes les cèl·lules circulants que han escapat del primari i resistit al reconeixement per part del sistema immune de l'hoste, tenen característiques de CSC o TIC, malgrat presentar resistència a l'anoikis. De fet, s'ha pogut observar en d'altres tumors que les poblacions de CSC confereixen resistència a l'anoikis a les poblacions no-CSC durant la formació d'esferes en cultiu 3D <sup>176</sup>.

Per aquest motiu, vam avaluar també si les cèl·lules capaces de sobreviure en condicions no adherents eren capaces de créixer en cultius 3D. Vam observar que totes les línies cel·lulars avaluades contenien una població de cèl·lules capaces de formar esferoides i que a més presentaven una capacitat clonogènica significativament major a la de la resta de cèl·lules crescudes en monocapa. Aquest fet també ha estat comprovat per Kalirai en dues de les línies de UM i suggereix que les línies de UM retenen poblacions amb característiques de CSC que estaven presents en el tumor de l'hoste, amb una gran capacitat per autorenovar-se, proliferar i generar tumors <sup>34</sup>.

A continuació, vam estudiar la presència de marcadors característics de les CSC en les poblacions de cèl·lules que creixien en monocapa (població global) i les que formaven melanosferes en cultius 3D en absència de sèrum. La detecció d'una major presència de cèl·lules CD133<sup>+</sup> en cultius provinents de melanosferes de les línies Mel270, OMM-2.3, OMM-2.5 i OMM-1 en comparació amb les cultivades en monocapa, suggereix que aquestes cèl·lules podrien tenir o adoptar

## DISCUSSIÓ

característiques de CSC. Cal senyalar que en l'anàlisi *in silico* del TCGA de pacients de UM vam trobar una associació estadísticament significativa entre l'expressió d'ARNm de *PROM1* o CD133 amb el temps lliure de malaltia. L'expressió de CD133 és característica de les CSC i fins i tot ha estat emprada per a seleccionar aquestes poblacions en diversos tipus de tumors i també s'havia detectat en les línies de UM Mel270, OMM-2.3 i OMM-2.5 <sup>47</sup>. Tot i això, no és suficient per a determinar la identitat de les poblacions de CSC atesa l'heterogeneïtat de la seva expressió en un mateix tipus de tumor. Per això, es considera necessari ampliar els estudis amb altres marcadors o gens de la cresta neural per caracteritzar la població específica de CSCs <sup>46,177</sup>. Així doncs, vam avaluar també la presència d'altres marcadors típics de CSC en la població obtinguda del creixement de melanosferes. Tant el CD15 com el CD44 han estat descrits com a marcadors de CSC en molts tipus de càncers, inclòs el melanoma cutani, pel seu paper en la migració, proliferació i resistència a fàrmacs. El CD15 o SSEA1 (en anglès, *Stage-specific embryonic antigen 1*) està present en les cèl·lules embrionàries neuronals i representa un marcador de CSC en tumors cerebrals <sup>178</sup>. El CD44 és una glicoproteïna transmembrana expressada en molts tipus de cèl·lules mare embrionàries i, a més, és un marcador de CSC <sup>179</sup>. El CD44 és responsable de la unió amb els components de la matriu extracel·lular com l'àcid hialurònic i l'osteopontina i, a més, contribueix a la proliferació cel·lular, la migració i la invasió de les cèl·lules tumorals mitjançant l'activació d'AKT <sup>179,180</sup>. Alhora, la seva sobreexpressió s'associa al fenotip de la EMT i al de les CSC en diferents carcinomes <sup>181</sup> i en aquest sentit s'utilitza com a marcador de pronòstic en el melanoma cutani <sup>52</sup>. En el nostre estudi, no vàrem trobar increments significatius dels nivells d'ARN de CD44 a les melanosferes de UM respecte als de les cèl·lules creixent en monocapa, però sí que vàrem detectar per immunocitoquímica una expressió diferencial. En la població crescuda en monocapa de la línia Mel270 la tinció de CD44 era citoplasmàtica i difosa, mentre que en la població de cèl·lules

crescudes en melanosferes es localitzava a membrana, fet que podria conferir-li les propietats funcionals esmentades. També vam comprovar en l'anàlisi *in silico* del TCGA de pacients de UM, una associació estadísticament significativa entre l'expressió d'ARNm de *CD44* i el temps lliure de malaltia.

A més, vam analitzar l'expressió dels factors de transcripció *Oct-4*, *Sox-2* i *Nanog*, atès que la seva expressió conjunta és clau en la carcinogènesi i s'atribueix a les característiques d'*stemness* <sup>139,182</sup>. També vam analitzar l'expressió dels transportadors de la família ABC (com *ABCG2* i *ABCB5*) que permeten mantenir una alta activitat de transport de membrana i exclusió de drogues <sup>140,141</sup>. En tots els casos, aquests gens es trobaven altament expressats en les poblacions cel·lulars de UM capaces de créixer en esferoides, independentment de la línia cel·lular de la qual provenien, en comparació a les poblacions crescudes en monocapa. Addicionalment, l'activitat enzimàtica ALDH, responsable de la detoxificació cel·lular <sup>142</sup>, també va resultar superior en les cèl·lules provinents de melanosferes.

Els resultats exposats fins aquí, ens indiquen que les melanosferes de les línies de melanoma uveal generades en cultius 3D en absència de sèrum tenen una proporció més elevada de cèl·lules amb alta capacitat clonogènica que reflexa l'habilitat d'autoregeneració i expressen els biomarcadors característics de les CSC, en comparació amb les cèl·lules que creixen en monocapa en presència de sèrum.

Sorprenentment vam observar que les melanosferes sobreexpressaven gens relacionats amb la melanogènesi i l'expressió de melanina. En el melanoma cutani, l'expressió elevada de MITF es correlaciona amb un fenotip proliferatiu i poc migratori <sup>183</sup>. En canvi, la sobreexpressió del factor de transcripció MITF en el UM, està associada a un fenotip més invasiu a conseqüència de l'efecte oposat que té la fosforilació de Erk1/2 i Akt en aquest tipus de melanoma <sup>143,184</sup>. Durant la progressió tumoral, les cèl·lules de melanoma amb

## DISCUSSIÓ

fenotip proliferatiu poden variar i adoptar característiques invasives i a l'inrevés, com a conseqüència dels efectes del microambient, responsables de la regulació i l'expressió de *MITF* <sup>185</sup>. Així, es poden adaptar a les necessitats de cada moment.

Coincidint amb altres autors, hem observat que en les melanosferes de Mel270, OMM-2.5 i OMM-1, l'expressió dels gens relacionats amb la melanogènesi *MLANA*, *TYR* i *MITF* i la dels gens associats a les característiques d'*stemness*, reverteix després de cultivar les cèl·lules 6 passes en condicions d'adhesió al substrat. Aquest fet ens indica l'enorme plasticitat que tenen les cèl·lules de melanoma uveal <sup>177</sup> i explicaria la diversitat de fenotips presents en un mateix tumor. En els últims anys diversos estudis han defensat que en els tumors, les CSCs es troben en un equilibri dinàmic amb les no-CSCs <sup>182</sup>. Per això, s'ha proposat que la *stemness* més que ser predeterminada per la presència de poblacions específiques en els tumors, és una qualitat que les cèl·lules guanyen o perden segons les senyals del microambient <sup>174</sup>.

La plasticitat cel·lular és molt evident en el cas dels carcinomes on les cèl·lules amb fenotip epitelial adopten característiques mesenquimals i migratòries (i a l'inrevés), com a resultat dels canvis en l'expressió de factors de transcripció (TF) com *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1* i *TWIST2* <sup>146</sup>. En el melanoma, però, aquests canvis són més complexos i si bé s'ha pogut esbrinar el seu mecanisme en els melanomes cutanis, poc en sabem encara quan es tracta de melanomes uveals <sup>63</sup>. La transició epiteli-mesènquima (TEM) orquestrada pels esmentats TF té lloc en situacions fisiològiques o patològiques i precisament aquests factors, regulen les propietats de cèl·lules mare i diferenciació en les cèl·lules del llinatge melanocític <sup>149</sup>. En els últims anys diversos estudis han demostrat la relació entre les CSC i aquest procés de EMT <sup>186</sup> o el procés invers (MET) <sup>146,187</sup>. Tot i això, en el melanoma hi ha controvèrsia entre CSC i EMT atès que, per exemple, la pèrdua

d'expressió de *Zeb1* no necessàriament implica la desaparició de la població CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> en les cèl·lules B16-F10 de melanoma murí <sup>188</sup>.

En les poblacions obtingudes a partir del creixement en melanosferes nosaltres vam observar una elevada expressió de *ZEB1*, *ZEB2* i *SNAI2* respecte a l'expressió de les cèl·lules en monocapa. Alguns estudis de UM ja han demostrat la implicació d'aquests TF en la EMT del melanoma <sup>26-27</sup>, i nosaltres vam comprovar, a través de l'anàlisi *in silico* del TCGA en pacients de UM, que hi havia una associació estadísticament significativa entre l'alta expressió d'ARNm de *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI2* i *TWIST1* i un menor temps lliure de malaltia.

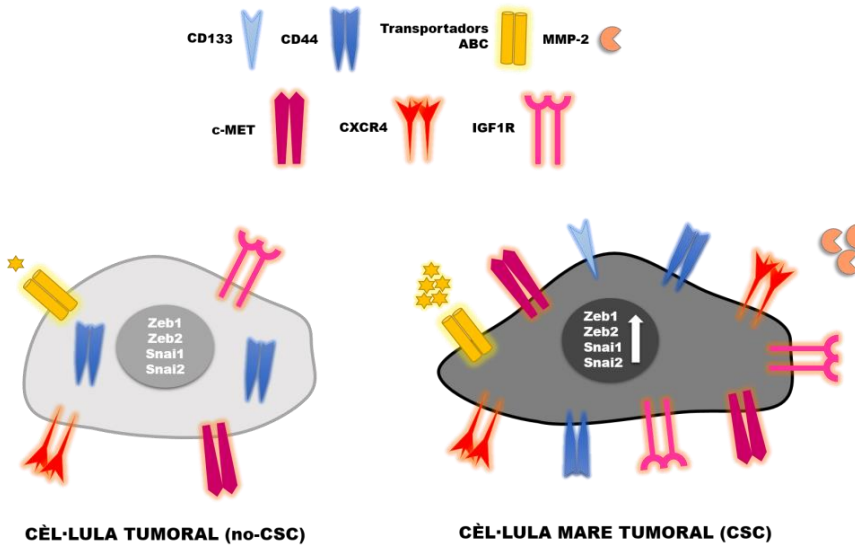
Ahora, vam detectar una major expressió de la *FIBRONECTINA-EDA* i *SPARC* en les cèl·lules provinents de melanosferes. La proteïna SPARC (osteonectina) és secretada al medi extracel·lular per les cèl·lules tumorals i és responsable directa de la regulació de SLUG (*SNAI2*) <sup>189</sup>. La forma EDA de la fibronectina, en canvi, s'expressa en els melanòcits com a resultat de l'adquisició d'un fenotip pseudo-mesenquimal i està estretament lligada a l'expressió de *CD133* i *CD44* <sup>144</sup>, suggerint la connexió entre la "pseudo-EMT" del melanoma amb les característiques de CSC.

L'anomenat bescanvi fenotípic del melanoma es refereix a l'adopció de característiques invasives i migratòries de les cèl·lules a causa dels guanys d'expressió de *ZEB1* i *TWIST1* amb pèrdua de *ZEB2*, *SNAI2* <sup>63,149</sup>. Aquest bescanvi és reversible i els principals desencadenants són TGF- $\beta$ , la hipòxia i alguns receptors RTKs <sup>190</sup>. Per aquest motiu vam tractar les línies cel·lulars de UM Mel270, OMM-2.3, OMM-2.5 i OMM-1 amb TGF- $\beta$  i vam observar que totes les línies de UM hi responien i activaven la via de Smads causant un increment considerable en l'expressió de *SNAI1*, *SNAI2*, FN-EDA i *TWIST-1*. Aquest, coincidia a més amb una major expressió del receptor CXCR4 i dels factors de transcripció *OCT-4*, *NANOG* i *SOX2* en la línia cel·lular Mel270, adquirint un perfil d'expressió que també havíem observat en

## DISCUSSIÓ

les cèl·lules obtingudes a partir del creixement en melanosferes. Així, vam observar una coincidència entre el perfil pseudo-EMT i el de CSC-Like a les cèl·lules de UM, que coincideix amb la hipòtesi de que l'adopció de característiques de CSC s'associa amb la EMT facilitant la invasió i la metastasi <sup>64,154,191</sup>. Per aquest motiu, vàrem analitzar les capacitats migratòries de les cèl·lules de UM i si aquestes facilitaven o no el tropisme cap el fetge.

El tropisme i l'especificitat metastàtica de les cèl·lules del UM pel fetge suggereix que, a més d'una connexió amb la via de disseminació hematògena, aquest òrgan els hi proporciona un microentorn favorable per el seu creixement, allotjament i supervivència. El fet que les cèl·lules metastàtiques del UM expressin de manera aberrant els receptors IGFR1 $\beta$ , c-MET i CXCR4, i el fetge produeixi grans quantitats de determinats factors de creixement i citoquines com l'IGF-1, el HGF o SDF1 <sup>97,156,157</sup>, suggereix que les unions específiques cMET - HGF, CXCR4 - SDF1 i IGFR1 $\beta$  - IGF1 poden jugar un paper importantíssim en el control de la migració cel·lular. A més, aquestes unions poden activar les vies de senyalització de PI3K/AKT, ERKs i NOTCH. Els nostres resultats indiquen que les cèl·lules de UM capaces de créixer en esferoides amb fenotip de CSC i característiques de EMT sobreexpressaven els receptors *c-MET* i *IGFR-1 $\beta$*  i la quimiocina *CXCR4*, fet que podria afavorir la seva migració al fetge (**Figura D1**). A més, en els pacients de UM de la bases de dades públiques del TCGA, el nivell d'expressió de *c-MET* també es correlacionava amb un menor temps lliure de malaltia. Aquests fets, es correlacionen amb varis treballs els quals apunten que els tumors de UM amb una expressió elevada de c-MET, CXCR4 i IGFR-1 $\beta$  tenen un major risc de desenvolupar metastasis hepàtiques a causa de la presència dels seus lligands en el fetge, HGF, SDF-1 i IGF-1, respectivament <sup>73,192,193</sup>. Per tot plegat, el següent que vam fer va ser avaluar si aquestes cèl·lules presentaven una capacitat migratòria elevada.



**Figura D1: Model de CSC de UM segons el seu tropisme pel fetge.** L'expressió diferencial dels receptors de membrana i els TF sobreexpressats en les CSC en comparació amb la resta de cèl·lules tumorals justificaria el tropisme de les cèl·lules de UM cap al fetge. Les CSC es caracteritzen per l'expressió de CD133, la localització de CD44 a membrana, l'activació dels canals de transport de la família ABC, i alhora, l'expressió dels receptors c-MET, CXCR4 i IGF1R. CSC: Cèl·lules mare tumorals. UM: Melanoma uveal. TF: Factors de transcripció.

En els assajos de migració per transwell vam observar que les cèl·lules derivades de melanosferes responien de forma diferencial a factors determinats presents en un medi condicionat de fibroblasts (MCF). Mentre les cèl·lules provinents de melanosferes es mostraven altament migratòries davant d'aquest medi, el MCF no induïa cap tipus de migració a la població global de cèl·lules creixudes en monocapa de les línies de UM Mel270 i OMM-2.5. Aquest fet no és d'estranyar atès que en alguns tumors epitelials s'ha demostrat que els fibroblasts que envolten el tumor primari influeixen les CSC i potencien la seva capacitat migratòria <sup>194</sup>. A aquests fibroblasts se'ls anomena CAFs (en anglès, *Cancer Associated Fibroblasts*) i secreten senyals extracel·lulars que faciliten la invasió de la ECM per part de les CSC mitjançant una redistribució de l'esquelet d'actina i la senyalització



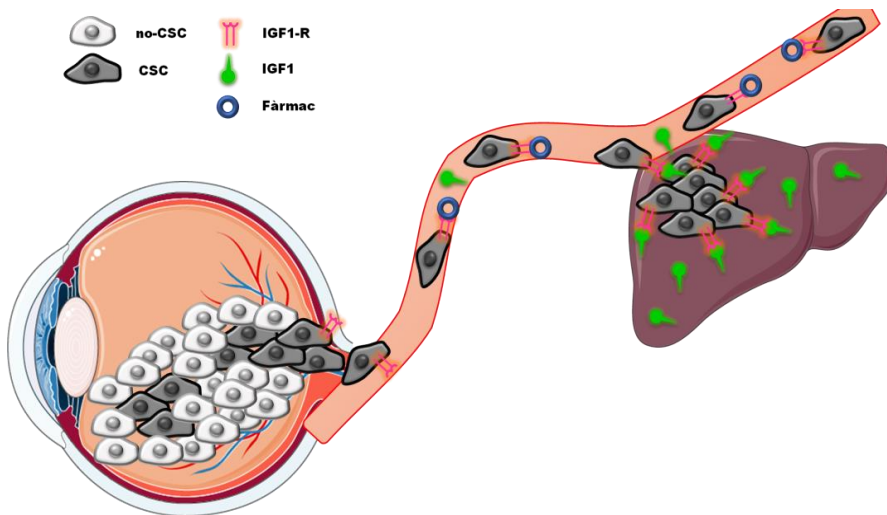
## DISCUSSIÓ

cel·lular a través de FAK i  $\beta$ -catenina <sup>194,195</sup>. Al comparar l'efecte d'altres medis condicionats sobre aquesta població, vam descartar una atracció inespecífica per part de les citoquines inflamatories també presents en el medi <sup>196</sup>.

No vam observar cap efecte migratori directe causat pels lligand de c-MET (HGF) ni CXCR4 (SDF-1) quan s'utilitzaven en la part inferior del transwell. Tampoc la inhibició d'ambdós receptors a través dels fàrmacs Crizitonib i AMD3100 va mostrar una reducció en la capacitat migratòria de les melanosferes sota les condicions d'atracció del MCF. Aquests resultats són contraris als observats en un estudi previ de Surriga i col·laboradors <sup>72</sup>, on van demostrar que la inhibició farmacològica de c-MET amb un fàrmac o un ARNsi específic, abrogaven la migració i el nombre de metàstasis observades en xenografts. Tot i això, no vam observar una disminució del creixement tumoral del UM. Actualment hi ha estudis clínics amb aquest inhibidor però encara no s'han publicat els resultats <sup>197</sup>. Paral·lelament, la inefectivitat de la migració a través de la unió CXCR4 - SDF1 es correlaciona amb un estudi del 2008 on Haochuan i els seus col·laboradors <sup>71</sup> evidenciaven que malgrat l'expressió de CXCR4 està correlacionada amb el mal pronòstic, no pot ser l'única responsable de la migració tumoral del UM perquè la seva expressió és molt baixa en les metàstasis hepàtiques.

Finalment, vam apostar pel IGF-1 com a màxim responsable de la migració específica de les melanosferes de UM, ja que vam descobrir que es trobava altament expressat en el MCF (el qual induïa la migració en les melanosferes) però no era detectable en el MCH (el qual no provocava cap tipus de migració). Girnita i els seus col·laboradors <sup>75</sup> ja havien postulat que la presència del receptor de IGF-1 era indicador de mal pronòstic en el UM i que la seva inhibició amb picropodophyllin (PPP) era capaç d'induir una regressió tumoral i reduir la seva invasió. Tot i això, ningú ha demostrat fins ara que les CSC del UM puguin respondre específicament a l'atracció per aquest

estímul. En els nostres estudis hem pogut comprovar que el tractament de les cèl·lules de UM amb IGF-1 estimula una ràpida fosforilació de IGFR-1 $\beta$  que resulta en una fosforilació subsidiària d'AKT. Per contra, el bloqueig d'aquest receptor a través d'un fàrmac o bé un anticòs (GSK705A i IMC-A12, respectivament) disminueix significativament la senyalització per la via de IGFR-1 $\beta$  i alhora la migració induïda pel MCF. Així doncs, el bloqueig d'aquest receptor podria ser una bona eina per reduir substancialment el nombre de pacients de UM amb metàstasis hepàtiques (**Figura D2**).



**Figura D2: Model hipotètic de metàstasi en el UM dependent de la interacció de IGF-1 amb les CSC.** La secreció extracel·lular de IGF-1 per part de les cèl·lules no tumorals induiria la migració de les CSC presents en la massa tumoral i la invasió de la ECM. Gràcies a les seves característiques migratòries i de supervivència, aquestes cèl·lules s'incorporarien en el torrent sanguini i disseminarien cap a l'òrgan majoritàriament productor de IGF-1, el fetge. La interacció IGF-1 & IGFR-1 facilitaria la colonització d'aquest òrgan i es desenvoluparia una nova massa tumoral. Per contra, la utilització d'un fàrmac contra el IGFR-1 ajudaria a bloquejar aquesta interacció reduint no només la incorporació de les CSC en el torrent sanguini sinó evitant també la seva extravasació a fetge, el nínxol metastàtic per excel·lència en el UM.

D'altra banda, vam observar una producció i activitat de la MMP-2 exclusiva de les cèl·lules provinents de melanosferes de Mel270,

## DISCUSSIÓ

OMM-2.5 i OMM-1. Aquest fet, suggereix que les CSC dirigirien la invasió degradant les membranes basals i afavoririen l'angiogènesi tumoral<sup>49</sup>. Aquest fet coincideix amb les observacions prèvies d'altres autors que postulaven MMP-2 com a factor de mal pronòstic perquè es trobava expressat en les cèl·lules de UM del front invasiu i en les de l'estroma que rodeja els marges tumorals<sup>198</sup>. De fet, la inhibició d'aquesta MMP redueix la migració cel·lular del UM de la mateixa manera que passa en altres tipus de tumors<sup>159,199</sup>. És important senyalar que en cèl·lules glials amb característiques de CSC, l'activació d'AKT per la unió del IGF-1 al seu receptor IGF-1R provoca la co-localització de MMP-2 amb la integrina  $\beta 1$  i p-FAK a les protrusions cel·lulars. D'aquesta manera, facilita la reorganització del citoesquelet d'actina i, en conseqüència, la migració i proteòlisi pericel·lular del front invasiu<sup>50</sup>. No sabem si és així en les cèl·lules de UM i per això ho estudiarem properament.

En conjunt, els resultats obtinguts fins aquí apunten que les cèl·lules de les melanosferes amb característiques de CSC tenen una capacitat migratòria i invasiva superior a la resta, atribuïda, almenys en part, a l'activació de les vies de senyalització subsidiàries a IGFR-1 $\beta$ . El fet que el fetge produeixi quantitats importants de IGF-1<sup>200</sup>, podria justificar l'òrgan-especificitat de les metàstasis del UM a fetge. Així, l'estudi de les característiques cel·lulars i moleculars específiques d'aquestes cèl·lules ens condueix a pensar que les estratègies terapèutiques contra elles podrien ser molt més efectives contra la metàstasi del UM que la quimioteràpia convencional.

## **2 AVALUACIÓ DE TERÀPIES ESPECÍFIQUES CONTRA EL MELANOMA UVEAL**

Malgrat els avenços en els tractaments quimioteràpics convencionals inclús amb l'aplicació local, la supervivència de cinc anys en el 80% dels malats de UM no ha canviat i quasi el 50% desenvolupen metàstasis hepàtiques <sup>201</sup>. A més, actualment, només el 5% dels malalts es beneficien dels tractaments amb immunoteràpies <sup>164,202</sup>.

En una primera aproximació vam voler comprovar l'efecte del silenciament estable del gens *GNAQ* / *GNA11*. Els resultats obtinguts sobre el temps de generació de les nostres línies de UM *in vitro* van mostrar que les que presentaven mutacions en els gens *GNAQ* (Mel270, OMM-2.3, OMM-2.5 i 92.1) o *GNA11* (OMM-1) tenien un creixement molt més accelerat que les línies de UM sense aquestes mutacions (Mel285 i Mel290). Aquest fet es deu a l'activació mantinguda de les vies de senyalització subsidiàries involucrades en la proliferació cel·lular causada per la mutació a la subunitat  $\alpha$  d'aquests receptors <sup>88</sup>. A més, el silenciament de *GNAQ*<sup>m</sup> en la línia OMM-2.5 induïa un increment en el temps de generació d'aquestes cèl·lules *in vitro*. Tot i això, les cèl·lules sobreviuen i vam observar que la fosforilació de ERK no es reduïa en aquestes condicions, suggerint que el silenciament de les proteïnes oncogèniques *GNAQ* i *GNA11* no és suficient per erradicar les cèl·lules de UM. Això podria atribuir-se, en part, a la presència d'alteracions com la pèrdua de BAP-1 <sup>6,163</sup> o modificacions en les vies de senyalització dels UM avançats <sup>11,88</sup>.

La manca de progressos terapèutics en el UM és deguda a la resistència intrínseca o adquirida de les cèl·lules tumorals però també, i molt especialment, per la presència de CSC. A diferència de les poblacions no-CSC, les CSC són altament resistents als fàrmacs, és per això, que les estratègies dirigides contra elles podrien ser molt més efectives en el tractament del UM <sup>203</sup>. Les CSC tenen especialment activades diverses vies de senyalització relacionades amb els

## DISCUSSIÓ

mecanismes d'autorenovació cel·lular (Notch, Wnt i Hedgehog) i d'altres relacionades amb la proliferació, supervivència, la diferenciació i l'apoptosi. Això, és conseqüència de les mutacions iniciadores de la tumorigènesi (en anglès, *driver mutations*) i altres alteracions secundàries adquirides durant la progressió del tumor. En referència a les darreres, la sobreexpressió de receptors de tirosina quinases (RTK) com c-KIT, IGFR-1, c-MET, VEGF i EGFR, és molt freqüent en els UM metastàtics<sup>88</sup>. Aquestes alteracions col·laboren en l'activació de diverses vies de senyalització, incloent les MAPK i PI3K/AKT, que contribueixen a l'adquisició de capacitats invasives, migratòries i en definitiva, a la progressió tumoral. Per això, ens vam centrar en la cerca d'inhibidors específics d'aquests RTKs que poguessin ser eficaços contra les CSC<sup>204</sup>. A través d'una llibreria de 80 inhibidors sintètics de diferents quinases (CaMK, CDK, CKI & II, EGFRK, GSK, IKK, IGFR, JAK, JNK, MAPK, MEK, MLCK, PI3K, PDGFRK, PKA, PKC, RAF, SAPK, Src-family i VEGF entre d'altres) vam avaluar l'efecte antiproliferatiu i de supervivència causats per aquests inhibidors en les línies de UM Mel270, OMM-2.3 i OMM-2.5. Concretament, vam avaluar en paral·lel la resposta induïda en les cèl·lules crescudes en 2D i en la població de cèl·lules amb resistència a l'anoikis. El fet que les línies provinents d'una metàstasi com les OMM-2.3 i OMM-2.5 fossin molt més resistents als fàrmacs que la línia tumoral obtinguda del tumor primari Mel270<sup>121</sup>, confirmava el que ja hem comentat sobre les cèl·lules metastàtiques. Al mateix temps, vam observar un efecte antiproliferatiu menor dels inhibidors en les cèl·lules resistents a l'anoikis. A continuació, vam seleccionar els inhibidors més efectius i vam validar novament la seva efectivitat en les melanosferes de Mel270, OMM-2.3, OMM-2.5 i OMM-1. Els nostres resultats indicaven que les cèl·lules de les melanosferes presentaven una major resistència als efectes de molts dels inhibidors i que aquestes diferències eren especialment significatives en la línia Mel270, on la població global era derivada d'un tumor primari. Després de determinar les IC50 de cadascun dels inhibidors vam

comprovar com afectaven al temps de generació *in vitro* i al percentatge de cèl·lules en divisió i vam seleccionar un inhibidor de MEK, un de SRC, un de PKC i un de IGFR-1 com a millors candidats. En el cas concret de l'inhibidor de PKC GF109X, vam calcular una dosi efectiva IC50 contra les melanosferes 5 vegades superior a la de la població global. Aquesta proteïna és molt important per a la senyalització de la via canònica de Wnt i el manteniment de les propietats pluripotencials i migratòries de les CSC <sup>205</sup>, però vàrem observar que a conseqüència del tractament, les cèl·lules activaven vies de supervivència com les de ERK o AKT. Similarment, el bloqueig de la senyalització a través de SRC provocava una sobreactivació de la via de PI3K en les cèl·lules crescudes en monocapa a través d'una fosforilació d'AKT. Entre els seleccionats, només els inhibidors de MEK (U-0126) i IGFR-1 $\beta$  (GSK 705A) no van induir l'activació de vies alternatives implicades en supervivència, és per això, que vam triar-los com a millors candidats per a la teràpia contra les CSC del UM. Actualment existeixen estudis pre-clínic amb inhibidors contra MEK en combinació amb PI3K <sup>206</sup> o PKC <sup>38</sup> que han aportat evidència terapèutica suficient per utilitzar-se com a tractament eficaç en el UM. Tot i això, encara cap combinació ha prosperat a la fase clínica en pacients de UM.

Per nosaltres, els inhibidors de IGFR-1 $\beta$  resulten especialment prometedors per les troballes i la implicació d'aquest receptor en els processos de migració i del tropisme al fetge de les cèl·lules de UM. En aquest sentit, estem investigant l'efecte del silenciament estable d'aquest receptor en les poblacions de cèl·lules amb característiques de CSC (estudis en curs al laboratori). Malgrat que el bloqueig de IGFR-1 $\beta$  en assajos clínics realitzats en altres tipus de càncer ha generat resultats negatius <sup>207</sup> creiem que és un bon candidat per al tractament del UM. De fet, altres estudis pre-clínic suggereixen que la inhibició de IGFR-1 $\beta$  podria ser una teràpia eficaç contra el UM <sup>115</sup>. Per això, nosaltres apostaríem per una combinació terapèutica seqüencial

## DISCUSSIÓ

utilitzant un inhibidor d'ERK i un de IGFR-1 $\beta$  que impediria la progressió del UM alhora que reduiria la migració cel·lular de les cèl·lules responsables de la metàstasi del UM.

Estudis duts a terme per l'equip de Yang i Grossniklaus<sup>208,209</sup> apunten que la injecció ortotòpica de cèl·lules d'una línia de UM resulten en el creixement de micrometàstasis hepàtiques que representen el model de desenvolupament en humans. Amb aquest objectiu, membres del nostre grup han desenvolupat amb èxit un model metastàtic ortotòpic de melanoma uveal que genera metàstasis hepàtiques. Aquest és, sens dubte, el pas següent per comprovar l'efecte combinatori o adjuvant dels inhibidors proposats. **(Figura Suplementària 1).**

### **3 LES CÈL·LULES DE UM SECRETEN EXOSOMES QUE SÓN CAPTATS PELS HEPATÒCITS IN VITRO**

Com hem comentat prèviament, les CSC poden tenir un paper clau en la progressió tumoral a través de l'intercanvi de senyals amb el microambient que permeten orquestrar diverses funcions autocrines i paracrines per regular el creixement i la disseminació tumoral. Aquesta senyalització cel·lular es duu a terme, en part, a través dels exosomes secretats, i evidències recents han demostrat que la seva presència en el "nínxol pre-metastàtic" facilita l'assentament cel·lular metastàtic a posteriori <sup>78,210,211</sup>. Això ocorre perquè els exosomes són capaços d'encapsular i transferir proteïnes, àcids nucleics i factors de creixement involucrats en la metàstasi, i interaccionar específicament amb el microambient de l'òrgan receptor de la metàstasi facilitant el creixement de les cèl·lules tumorals <sup>77-79,85</sup>. Sobre aquesta base, vam estudiar si els exosomes segregats per poblacions de CSC-Like del melanoma uveal podien millorar el creixement metastàtic en el fetge.

Per aconseguir aquest objectiu, vam utilitzar poblacions de cèl·lules de cultiu en monocapa i poblacions provinents de melanosferes, de línies cel·lulars de UM. Vam observar una secreció d'exosomes significativament major per part de la població CSC-like de Mel270 en comparació amb la població global. Per contra, les diferències entre la quantitat d'exosomes de cèl·lules derivades de melanosferes o de cultius en monocapa de la línia OMM2.5 va mostrar diferències menors. Aquest resultat no és sorprenent perquè la línia cel·lular OMM2.5 pertany a una lesió metastàtica del tumor originari de la línia Mel270 i ja secretava major quantitat d'exosomes en la població global <sup>120</sup>. D'aquesta manera es pot fer una extrapolació directa entre el potencial metastàtic de les cèl·lules i la quantitat d'exosomes secretats.



## DISCUSSIÓ

A causa que els exosomes són partícules nano-escala que poden arribar a la majoria de territoris, ja sigui dins del tumor o travessant els vasos sanguinis i entrant en la circulació sistèmica del cos, també vam estudiar-ne el seu contingut <sup>85,212</sup>. Nosaltres vam determinar la presència d'ARNm de gens relacionats amb *stemness* en el seu interior (*CD44*), especialment en els exosomes provinents de melanosferes, i una alta expressió de les integrines  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$  i  $\alpha v$ , les quals estan descrites com a indicadors de mal pronòstic i metastasis <sup>85</sup>. Per aquest motiu, suggerim que els exosomes poden participar en el manteniment de la proliferació de les cèl·lules tumorals en el nínxol metastàtic.

Finalment, vam estudiar l'organotropisme dels exosomes derivats de cèl·lules de UM. Segons el descrit en la recent publicació d'Hoshino <sup>85</sup> i els nostres resultats obtinguts en la detecció de receptors relacionats amb el tropisme al fetge, vam avaluar la resposta d'un cultiu cel·lular d'hepatòcits enfront el tractament amb exosomes. En una anàlisi *in vitro* vam comprovar que els exosomes de UM són captats i internalitzats per hepatòcits en menys de 24 hores, de manera que l'alliberament del seu contingut en el fetge podria afavorir l'adaptació del nou tumor uveal allí. Un fet similar ha estat descrit pel grup de Costa-Silva <sup>86</sup> a partir dels exosomes de cèl·lules pancreàtiques. En el seu estudi, han demostrat que els exosomes provinents de cèl·lules pancreàtiques causen una cadena d'esdeveniments al fetge quan són captats per les cèl·lules hepàtiques. L'alta expressió resultant de MIF, TGF- $\beta$  i Fibronectina i el reclutament de subsidiari de macròfags proporcionava a les cèl·lules tumorals unes condicions més favorables pel seu creixement que es traduïa en un major nombre de metastasis en el nou òrgan *in vivo* <sup>86</sup>.

Serà interessant pròximament analitzar la captació d'aquests exosomes *in vivo* i si la seva presència afavoreix el desenvolupament de metastasis en el UM. Actualment s'està realitzant un estudi específic per iTRAQ per tal de determinar el contingut de proteïnes

transportades en exosomes derivats de la producció global i de les cèl·lules provinents de melanosferes en la línia cel·lular Mel270. Així, si es confirma la importància d'aquestes microvesícules en l'organotropisme, la seva inactivació emergiria com a una nova opció terapèutica per reduir el substancial nombre de metàstasis dels pacients amb UM.



# CONCLUSIONS

**Bases Moleculars i Estratègies Terapèutiques contra les Metàstasis  
del Melanoma Uveal**



1. Les **mutacions** a *GNAQ* i *GNA11* proporcionen un **avantatge proliferatiu** a les cèl·lules de melanoma uveal.
2. Les cèl·lules de les línies de **melanoma uveal** són **resistents** a la mort cel·lular per **anoikis**.
3. Les línies cel·lulars de melanoma uveal contenen subpoblacions de cèl·lules capaces de **créixer en suspensió** i **generar melanosferes** en cultius 3D.
  - 3.1. La **capacitat clonogènica** d'aquestes cèl·lules és significativament **molt superior** a la de les cèl·lules que creixen en monocapa.
  - 3.2. Les cèl·lules de les melanosferes **sobreexpressen** gens relacionats amb l'*stemness* -*CD133*, *CD44*, *CD15* i els factors de transcripció *OCT-4*, *SOX-2* i *NANOG*- a més de *MITF*, en comparació amb les cèl·lules que creixen en monocapa.
  - 3.3. Aquestes cèl·lules tenen una **activitat ALDH** significativament **més elevada** que la de les monocapes de les línies Mel270 i OMM-1. Alhora, presenten una **expressió augmentada** dels membres de la família ABC (*ATP-Binding Cassete*) *ABCG2* i *ABCB5*.
  - 3.4. El **fenotip** de les melanosferes **característic d'*stemness*** **reverteix** al cap de 5-6 passes en cultiu en monocapa i en presència de sèrum.
4. El **tractament** de les cèl·lules en monocapa amb **TGF- $\beta$**  incrementa significativament els nivells d'expressió dels factors de transcripció *SNAI1*, *SNAI2*, *ZEB1* i *TWIST1* juntament amb els gens *SPARC*, *CXCR4* i *FN-EDA*, relacionats amb la EMT. Alhora, indueix l'expressió dels **gens pluripotencials** *OCT-4*, *NANOG*, i *SOX2* fins a nivells similars als de les melanosferes.
5. Les cèl·lules de les **melanosferes sobreexpressen** el receptor **IGFR-1 $\beta$** . El **tractament** amb inhibidors o l'anticòs **bloquejant**

## CONCLUSIONS

- d'aquest receptor IMC-A12 **abroguen** la **capacitat migratòria** exclusiva de les melanosferes.
6. **Exclusivament** les cèl·lules de les **melanosferes** secreten la **gelatinasa MMP-2** al medi extracel·lular.
  7. Les cèl·lules capaces de créixer en **melanosferes** són més **resistents** a l'efecte antiproliferatiu dels **inhibidors de proteïna quinases** que les cèl·lules crescudes en monocapes.
  8. Atesa l'activació indirecta de vies de senyalització relacionades amb la supervivència causada per alguns inhibidors, els **fàrmacs** contra **MEK** i **IGFR-1** són els **més indicats per al tractament** de les cèl·lules de UM amb característiques d'*stemness*.
  9. Les cèl·lules de les **melanosferes** i les de la **línia metastàtica OMM-2.5** secreten una **quantitat major d'exosomes**, els quals són reconeguts, captats i internalitzats pels hepatòcits *in vitro*.



# BIBLIOGRAFIA



**Bases Moleculares i Estratègies Terapèutiques contra les Metàstasis  
del Melanoma Uveal**





1. Rand Simpson, E. *et al.* International validation of the American Joint Committee on Cancer's 7th edition classification of uveal melanoma. *JAMA Ophthalmol.* **133**, 376–383 (2015).
2. Lorenzo, D. & Caminal, J. Genética del melanoma de úvea. *Ann. d'Oftalmologia* **24**, 59–66 (2016).
3. Coupland, S. E., Lake, S. L., Zeschnigk, M. & Damato, B. E. Molecular pathology of uveal melanoma. *Eye* **27**, 230–242 (2013).
4. Amaro, A. *et al.* The biology of uveal melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* **36**, 109–140 (2017).
5. Caminal, J. M. *et al.* Relative survival of patients with uveal melanoma managed in a single center. *Melanoma Res.* **22**, 271–277 (2012).
6. Pons, F. *et al.* Metastatic uveal melanoma: Is there a role for conventional chemotherapy? - A single center study based on 58 patients. *Melanoma Res.* **21**, 217–222 (2011).
7. Krantz, B., Dave, N., Komatsubara, K. M., Marr, B. P. & Carvajal, R. D. Uveal melanoma: epidemiology, etiology and treatment of primary disease. *Clin. Ophthalmol.* **11**, 279–289 (2017).
8. Harbour, J. W. The genetics of uveal melanoma: An emerging framework for targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res.* **25**, 171–181 (2012).
9. Chattopadhyay, C. *et al.* Uveal melanoma: From diagnosis to treatment and the science in between. *Cancer* 2299–2312 (2016).
10. Shields, C. L. *et al.* American joint committee on cancer classification of uveal melanoma (anatomic stage) predicts prognosis in 7731 patients: The 2013 zimmerman lecture. *Ophthalmology* **122**, (2015).
11. Robertson, A. G. *et al.* Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer Cell* **32**, 204–220 (2017).
12. Vader, M. J. C. *et al.* GNAQ and GNA11 mutations and downstream YAP activation in choroidal nevi. *Br. J. Cancer* **117**, 884–887 (2017).

## BIBLIOGRAFIA

13. Van Raamsdonk, C. D. *et al.* Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* **457**, 599–602 (2009).
14. Yavuziyigitoglu, S. *et al.* Correlation of Gene Mutation Status with Copy Number Profile in Uveal Melanoma. *Ophthalmology* **124**, 573–575 (2017).
15. Johnson, C. P. *et al.* Systematic genomic and translational efficiency studies of uveal melanoma. *PLoS One* **12**, 1–17 (2017).
16. Furney, S. J. *et al.* SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma. *Cancer Discov.* **3**, 1122–1129 (2013).
17. Field, M. G. *et al.* PRAME as an independent biomarker for metastasis in uveal melanoma. *Clin. Cancer Res.* **22**, 1234–1242 (2016).
18. Field, M. G. *et al.* Epigenetic reprogramming and aberrant expression of PRAME are associated with increased metastatic risk in Class 1 and Class 2 uveal melanomas. *Oncotarget* **7**, 59209–59219 (2016).
19. Chang, S. H., Worley, L. A., Onken, M. D. & Harbour, J. W. Prognostic biomarkers in uveal melanoma: Evidence for a stem cell-like phenotype associated with metastasis. *Melanoma Res.* **18**, 191–200 (2008).
20. Bergeron, M.-A., Champagne, S., Gaudreault, M., Deschambeault, A. & Landreville, S. Repression of genes involved in melanocyte differentiation in uveal melanoma. *Mol. Vis.* **18**, 1813–22 (2012).
21. Li, Y., Jia, R. & Ge, S. Role of epigenetics in uveal melanoma. *Int. J. Biol. Sci.* **13**, 426–433 (2017).
22. Achberger, S. *et al.* Circulating immune cell and microRNA in patients with uveal melanoma developing metastatic disease. *Mol. Immunol.* **58**, 182–186 (2014).
23. Migliore, C. *et al.* MicroRNAs impair MET-mediated invasive growth. *Cancer Res.* **68**, 10128–10136 (2008).
24. Triozzi, P. L. *et al.* Association of tumor and plasma microRNA

- expression with tumor monosomy-3 in patients with uveal melanoma. *Clin Epigenetics* **8**, 80–88 (2016).
25. Sharma, A., Fröhlich, M. M. S. H. & Loeffler, F. G. H. K. U. Genetic and epigenetic insights into uveal melanoma. *Clin. Genet.* **93**, 952–961 (2018).
  26. Maat, W. *et al.* Epigenetic Inactivation of RASSF1a in Uveal Melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 486–490 (2007).
  27. Berdasco, M. *et al.* DNA Methylomes Reveal Biological Networks Involved in Human Eye Development , Functions and Associated Disorders. *Sci. Rep.* **7**, 1–15 (2017).
  28. Grzywa, T. M., Paskal, W. & Włodarski, P. K. Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. *Transl. Oncol.* **10**, 956–975 (2010).
  29. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
  30. Barrandon, Y. & Green, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 2302–2306 (1987).
  31. Gerlinger, M. & Swanton, C. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *Br. J. Cancer* **103**, 1139–1143 (2010).
  32. Beck, B. & Blanpain, C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 727–738 (2013).
  33. Agliano, A., Calvo, A. & Box, C. The challenge of targeting cancer stem cells to halt metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **44**, 25–42 (2017).
  34. Kalirai, H., Damato, B. E. & Coupland, S. E. Uveal melanoma cell lines contain stem-like cells that self-renew, produce differentiated progeny, and survive chemotherapy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 8458–8466 (2011).
  35. de Lange, M. J. *et al.* Heterogeneity revealed by integrated genomic analysis uncovers a molecular switch in malignant uveal melanoma. *Oncotarget* **6**, 37824–35 (2015).
  36. Ness, C. *et al.* Multicellular tumor spheroids of human uveal

## BIBLIOGRAFIA

- melanoma induce genes associated with anoikis resistance, lipogenesis, and SSXs. *Mol. Vis.* **23**, 680–694 (2017).
37. Medema, J. P. & Vermeulen, L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* **474**, 318 (2011).
  38. Ayob, A. Z. & Ramasamy, T. S. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J. Biomed. Sci.* **25**, (2018).
  39. Plaks, V., Kong, N. & Werb, Z. The cancer stem cell niche: How essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell* **16**, 225–238 (2015).
  40. Meacham, C. E. & Morrison, S. J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* **501**, 328–337 (2013).
  41. Parmiani, G. Melanoma cancer stem cells: Markers and functions. *Cancers (Basel)*. **8**, 4–8 (2016).
  42. Greaves, M. Cancer stem cells as ‘units of selection’. *Evol. Appl.* **6**, 102–108 (2013).
  43. F. Quail, D., J. Taylor, M. & Postovit, L.-M. Microenvironmental Regulation of Cancer Stem Cell Phenotypes. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **7**, 197–216 (2012).
  44. Lee, G., Hall, R. R. & Ahmed, A. U. HHS Public Access. *J. Stem Cell Res. Ther.* **6**, 34–48 (2016).
  45. Kumar, D., Gorain, M., Kundu, G. & Kundu, G. C. Therapeutic implications of cellular and molecular biology of cancer stem cells in melanoma. *Mol. Cancer* **16**, 1–18 (2017).
  46. Djirackor, L., Shakir, D., Kalirai, H., Petrovski, G. & Coupland, S. E. Nestin expression in primary and metastatic uveal melanoma - possible biomarker for high-risk uveal melanoma. *Acta Ophthalmol.* **96**, 503–509 (2018).
  47. Thill, M. *et al.* Expression of CD133 and other putative stem cell markers in uveal melanoma. *Melanoma Res.* **21**, 405–416 (2011).
  48. Klein, W. M. *et al.* Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod. Pathol.* **20**, 102–107 (2007).
  49. Liu, C. *et al.* The interaction between cancer stem cell marker

- CD133 and Src protein promotes Focal Adhesion Kinase (FAK) phosphorylation and cell migration. *J. Biol. Chem.* **291**, 15540–15550 (2016).
50. Yuan, S. H. *et al.* Cell-surface marker signatures for the Isolation of neural stem cells, glia and neurons derived from human pluripotent stem cells. *PLoS One* **6**, (2011).
  51. Chen, C., Zhao, S., Karnad, A. & Freeman, J. W. The biology and role of CD44 in cancer progression: Therapeutic implications. *J. Hematol. Oncol.* **11**, 1–23 (2018).
  52. Erfani, E. *et al.* Comparative expression analysis of putative cancer stem cell markers CD44 and ALDH1A1 in various skin cancer subtypes. *Int. J. Biol. Markers* **31**, 53–61 (2016).
  53. Apostolou, P., Papadimitriou, M. & Papisotiriou, I. Stemness Gene Profiles of Circulating Tumor Cells. *J. Cancer Ther.* **08**, 155–167 (2017).
  54. Yu, J. *et al.* Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science (80-. )*. **318**, 1917–1920 (2007).
  55. Boumahdi, S. *et al.* SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature* **511**, 246–250 (2014).
  56. Lutz, N. W. *et al.* Expression of cell-surface marker ABCB5 causes characteristic modifications of glucose, amino acid and phospholipid metabolism in the G3361 melanoma-initiating cell line. *PLoS One* **11**, 1–17 (2016).
  57. Bi, J. *et al.* The SDF-1/CXCR4 chemokine axis in uveal melanoma cell proliferation and migration. *Tumor Biol.* **37**, 4175–4182 (2016).
  58. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 1–6 (2003).
  59. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486–541 (2018).
  60. Paoli, P., Giannoni, E. & Chiarugi, P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 3481–3498 (2013).

## BIBLIOGRAFIA

61. Fofaria, N. M. & Srivastava, S. K. Critical role of STAT3 in melanoma metastasis through anoikis resistance. *Oncotarget* **5**, 7051–7064 (2014).
62. Onken, M. D., Li, J. & Cooper, J. A. Uveal melanoma cells utilize a novel route for transendothelial migration. *PLoS One* **9**, 1–16 (2014).
63. Asnaghi, L. *et al.* EMT-associated factors promote invasive properties of uveal melanoma cells. *Mol. Vis.* **21**, 919–929 (2015).
64. Schlegel, N. C., von Planta, A., Widmer, D. S., Dummer, R. & Christofori, G. PI3K signalling is required for a TGF $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal-like transition (EMT-like) in human melanoma cells. *Exp. Dermatol.* **24**, 22–28 (2015).
65. Chen, Y. *et al.* ZEB1 regulates multiple oncogenic components involved in uveal melanoma progression. *Sci. Rep.* **7**, 1–14 (2017).
66. Xu, W., Yang, Z. & Lu, N. A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition. *Cell Adh. Migr.* **9**, 317–324 (2015).
67. Cantelli, G. *et al.* TGF- $\beta$ -Induced Transcription Sustains Amoeboid Melanoma Migration and Dissemination. *Curr. Biol.* **25**, 2899–2914 (2015).
68. Hardy, S. D., Shinde, A., Wang, W.-H., Wendt, M. K. & Geahlen, R. L. Regulation of epithelial-mesenchymal transition and metastasis by TGF- $\beta$ , P-bodies, and autophagy. *Oncotarget* **8**, 103302–103314 (2017).
69. Costanza, B., Umelo, I., Bellier, J., Castronovo, V. & Turtoi, A. Stromal Modulators of TGF- $\beta$  in Cancer. *J. Clin. Med.* **6**, 7 (2017).
70. Bakalian, S. *et al.* Molecular pathways mediating liver metastasis in patients with uveal melanoma. *Clin Cancer Res* **14**, 951–956 (2008).
71. Li, H., Alizadeh, H. & Niederkorn, J. Y. Differential Expression of Chemokine Receptors on Uveal Melanoma Cells and Their Metastases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 636–643 (2008).
72. Surriga, O. *et al.* Crizotinib, a c-Met Inhibitor, Prevents

- Metastasis in a Metastatic Uveal Melanoma Model. *Mol. Cancer Ther.* **12**, 2817–2826 (2013).
73. Frenkel, S., Zloto, O., Pe'er, J. & Barak, V. Insulin-like growth factor-1 as a predictive biomarker for metastatic uveal melanoma in humans. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 490–493 (2013).
  74. All-Ericsson, C. *et al.* Insulin-like growth factor-1 receptor in uveal melanoma: a predictor for metastatic disease and a potential therapeutic target. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 1–8 (2002).
  75. Girnita, A. *et al.* The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor picropodophyllin causes tumor regression and attenuates mechanisms involved in invasion of uveal melanoma cells. *Acta Ophthalmol.* **86**, 26–34 (2008).
  76. Scala, S. *et al.* CXC chemokine receptor 4 is expressed in uveal malignant melanoma and correlates with the epithelioid-mixed cell type. *Cancer Immunol. Immunother.* **56**, 1589–1595 (2007).
  77. Zhao, H. *et al.* The key role of extracellular vesicles in the metastatic process. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1869**, 64–77 (2018).
  78. Tucci, M. *et al.* Exosomes in melanoma: a role in tumor progression, metastasis and impaired immune system activity. *Oncotarget* **9**, 20826–20837 (2018).
  79. Peinado, H. *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* **18**, 883–891 (2012).
  80. Kourembanas, S. Exosomes: Vehicles of Intercellular Signaling, Biomarkers, and Vectors of Cell Therapy. *Annu. Rev. Physiol.* **77**, 13–27 (2015).
  81. Xiao, D. *et al.* Melanoma cell-derived exosomes promote epithelial- mesenchymal transition in primary melanocytes through paracrine/autocrine signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Lett.* **376**, 318–327 (2017).
  82. Hood, J. L., San Roman, S. & Wickline, S. A. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor



## BIBLIOGRAFIA

- metastasis. *Cancer Res.* **71**, 3792–3801 (2011).
83. Muller, L., Mitsuhashi, M., Simms, P., Gooding, W. E. & Whiteside, T. L. Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets. *Sci. Rep.* **6**, 1–13 (2016).
  84. Eldh, M. *et al.* MicroRNA in exosomes isolated directly from the liver circulation in patients with metastatic uveal melanoma. *BMC Cancer* **14**, 1–10 (2014).
  85. Hoshino, A. *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329–335 (2015).
  86. Costa-Silva, B. *et al.* Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* **17**, (2015).
  87. Urtatiz, O. & Van Raamsdonk, C. D. Gnaq and Gna11 in the Endothelin signaling pathway and melanoma. *Front. Genet.* **7**, 1–10 (2016).
  88. Park, J. J. *et al.* Oncogenic signaling in uveal melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **00**, 1–12 (2018).
  89. Chen, X. *et al.* RasGRP3 Mediates MAPK Pathway Activation in GNAQ Mutant Uveal Melanoma. *Cancer Cell* **31**, 685–696.e6 (2017).
  90. Patel, M. *et al.* Therapeutic implications of the emerging molecular biology of uveal melanoma. *Clin. Cancer Res.* **8**, 2087–2100 (2011).
  91. Abdel Mouti, M., Dee, C., Coupland, S. E. & Hurlstone, A. F. L. Minimal contribution of ERK1/2-MAPK signalling towards the maintenance of oncogenic GNAQ(Q209P)-driven uveal melanomas in zebrafish. *Oncotarget* **7**, 39654–39670 (2016).
  92. Feng, X., Chen, Q. & Gutkind, J. S. Oncotargeting G proteins: The Hippo in the room. *Oncotarget* **5**, 10997–10999 (2014).
  93. Vaqué, J. P. *et al.* A Genome-wide RNAi Screen Reveals a Trio-Regulated Rho GTPase Circuitry Transducing Mitogenic Signals Initiated by G Protein-Coupled Receptors. *Mol. Cell* **49**, 94–108 (2013).
  94. Amirouchene-Angelozzi, N. *et al.* The mTOR inhibitor

- Everolimus synergizes with the PI3K inhibitor GDC0941 to enhance anti-tumor efficacy in uveal melanoma. *Oncotarget* **7**, (2016).
95. Wu, X. *et al.* C-Met, epidermal growth factor receptor, and insulin-like growth factor-1 receptor are important for growth in uveal melanoma and independently contribute to migration and metastatic potential. *Melanoma Res.* **22**, 123–132 (2012).
96. Babaei, M. A., Kamalidehghan, B., Saleem, M., Huri, H. Z. & Ahmadipour, F. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: A potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des. Devel. Ther.* **10**, 2443–2459 (2016).
97. Bakalian, S. *et al.* Molecular Pathways Mediating Liver Metastasis in Patients with Uveal Melanoma. *Clin. Cancer Res.* **14**, 951–957 (2008).
98. Chitnis, M. M., Yuen, J. S. P., Protheroe, A. S., Pollak, M. & Macaulay, V. M. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6364–6370 (2008).
99. Yoon, S. O. *et al.* Focal Adhesion- and IGF1R-Dependent Survival and Migratory Pathways Mediate Tumor Resistance to mTORC1/2 Inhibition. *Mol. Cell* **67**, 512–527 (2017).
100. Takebe, N. *et al.* Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: Clinical update. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **12**, 445–464 (2015).
101. Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H. & Band, V. Shared signaling pathways in normal and breast cancer stem cells. *J. Carcinog.* **10**, 38 (2011).
102. Zhong, Y. *et al.* NOTCHI is a poor prognostic factor for breast cancer and is associated with breast cancer stem cells. *Onco. Targets. Ther.* **9**, 6865–6871 (2016).
103. Abel, E. V. *et al.* The notch pathway is important in maintaining the cancer stem cell population in pancreatic cancer. *PLoS One* **9**, 1–13 (2014).
104. Asnaghi, L. *et al.* Notch signaling promotes growth and invasion in uveal melanoma. *Clin. Cancer Res.* **18**, 654–665 (2012).
105. Zhang, S. S., Huang, Z. W., Li, L. X., Fu, J. J. & Xiao, B. Identification

## BIBLIOGRAFIA

- of CD200+colorectal cancer stem cells and their gene expression profile. *Oncol. Rep.* **36**, 2252–2260 (2016).
106. Dow, L. E. *et al.* Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer. *Cell* **161**, 1539–1552 (2015).
  107. Malanchi, I. *et al.* Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on  $\beta$ -catenin signalling. *Nature* **452**, 650–653 (2008).
  108. Kaochar, S. *et al.* ICG-001 exerts potent anticancer activity against uveal melanoma cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **59**, 132–143 (2018).
  109. Corda, G. & Sala, A. Non-canonical WNT/PCP signalling in cancer: Fzd6 takes centre stage. *Oncogenesis* **6**, (2017).
  110. Zhao, C. *et al.* Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* **458**, 776–779 (2009).
  111. Wang, F. *et al.* Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer stem-like cells. *J. Cancer* **7**, 408–417 (2016).
  112. Luke, J. J. *et al.* Biology of advanced uveal melanoma and next steps for clinical therapeutics. *Pigment Cell Melanoma Res.* **28**, 135–147 (2014).
  113. Yang, J., Manson, D. K., Marr, B. P. & Carvajal, R. D. Treatment of uveal melanoma: where are we now? *Ther. Adv. Med. Oncol.* **10**, 1–17 (2018).
  114. Valsecchi, M. E. *et al.* Adjuvant Sunitinib in High-Risk Patients with Uveal Melanoma. Comparison with Institutional Controls. *Ophthalmology* **125**, 210–217 (2018).
  115. Goh, A. Y. & Layton, C. J. Evolving systemic targeted therapy strategies in uveal melanoma and implications for ophthalmic management: A review. *Clin. Exp. Ophthalmol.* **44**, 509–519 (2016).
  116. Matthey, M. *et al.* Targeted inhibition of G q signaling induces airway relaxation in mouse models of asthma. *Sci. Transl. Med.* **9**, 1–11 (2017).

117. Yoo, J. H. *et al.* ARF6 Is an Actionable Node that Orchestrates Oncogenic GNAQ Signaling in Uveal Melanoma. *Cancer Cell* **29**, 889–904 (2016).
118. Carvajal, R. D. *et al.* Effect of selumetinib vs chemotherapy on progression-free survival in uveal melanoma: A randomized clinical trial. *J. Am. Med. Assoc.* **311**, 2397–2405 (2014).
119. Shoushtari, A. N. *et al.* A randomized phase 2 study of trametinib with or without GSK2141795 in patients with advanced uveal melanoma. *J. Clin. Oncol.* **34**, 9511 (2016).
120. Jager, M. J., Magner, J. A. B., Ksander, B. R. & Dubov, S. R. Uveal Melanoma Cell Lines: Where Do They Come From? *Trans Am. Ophthalmol. Soc.* **114**, 1–16 (2016).
121. Griewank, K. G. *et al.* Genetic and molecular characterization of uveal melanoma cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res.* **25**, 182–187 (2012).
122. Yanai, N., Suzuki, M. & Obinata, M. Hepatocyte Cell Lines Established from Transgenic Mice Harboring Temperature-Sensitive Simian Virus 40 Large T-Antigen Gene. *Contrib. Nephrol.* **197**, 50–56 (1991).
123. Ali, S. H. & DeCaprio, J. A. Cellular transformation by SV40 large T antigen: Interaction with host proteins. *Semin. Cancer Biol.* **11**, 15–22 (2001).
124. Wong-Lee, J. G. & Lovett, M. Rapid and sensitive PCR method for identification of Mycoplasma species in tissue culture. in *Diagnostic Molecular and Microbiology Principles and Applications*. Washington DC: American Society for Microbiology 257–260 (1993).
125. Feoktistova, M., Geserick, P. & Leverkus, M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, 343–346 (2016).
126. Riss, T. L. *et al.* Cell Viability Assays. in *Assay Guidance Manual* **7**, 1–31 (2016).
127. Peskin, A. V. & Winterbourn, C. C. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Drugs* **293**, 157–166 (2000).

## BIBLIOGRAFIA

128. Cappella, P., Gasparri, F., Pulici, M. & Moll, J. *Cell proliferation method: Click chemistry based on BrdU coupling for multiplex antibody staining. Current Protocols in Cytometry* **45**, (2008).
129. Lindahl, R. Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**, 283-335 (1992).
130. Ivascu, A. & Kubbies, M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J. Biomol. Screen.* **11**, 922-932 (2006).
131. Albini, A. *et al.* A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.* **47**, 3239-3245 (1987).
132. Crissman, H. A. & Steinkamp, J. A. Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J. Cell Biol.* **59**, 766-771 (1973).
133. Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J. & Nilsen, T. W. Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harb. Protoc.* **5**, 1-4 (2010).
134. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
135. Marion M. Bradford. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
136. Gabriel, O. & Gersten, D. M. Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis, I. *Anal. Biochem.* **203**, 1-21 (1992).
137. Valastyan, S. & Weinberg, R. A. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* **147**, 275-292 (2011).
138. Kruyt, F. A. E. & Schuringa, J. J. Apoptosis and cancer stem cells: Implications for apoptosis targeted therapy. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 423-430 (2010).
139. Liu, A., Yu, X. & Liu, S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: Small genes make a big difference. *Chin. J.*

- Cancer* **32**, 483–487 (2013).
140. Wu, C. P. *et al.* Overexpression of ATP-binding cassette transporter ABCG2 as a potential mechanism of acquired resistance to vemurafenib in BRAF(V600E) mutant cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 325–334 (2013).
  141. Roudi, R. *et al.* Comparative gene-expression profiling of CD133(+) and CD133(-) D10 melanoma cells. *Futur. Oncol* **11**, 2383–2393 (2015).
  142. Xu, X. *et al.* Aldehyde dehydrogenases and cancer stem cells. *Cancer Lett.* **369**, 50–57 (2015).
  143. D’Mello, S. A. N., Finlay, G. J., Baguley, B. C. & Askarian-Amiri, M. E. Signaling pathways in melanogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–18 (2016).
  144. Ou, J. *et al.* Fibronectin extra domain A (EDA) sustains CD133+/CD44+subpopulation of colorectal cancer cells. *Stem Cell Res.* **11**, 820–833 (2013).
  145. Van Obberghen-Schilling, E. *et al.* Fibronectin and tenascin-C: Accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth. *Int. J. Dev. Biol.* **55**, 511–525 (2011).
  146. Nieto, M. A. Epithelial plasticity: A common theme in embryonic and cancer cells. *Science (80-. )*. **342**, (2013).
  147. Denecker, G. *et al.* Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. *Cell Death Differ.* **21**, 1250–1261 (2014).
  148. Shirley, S. H. *et al.* Slug expression during melanoma progression. *Am. J. Pathol.* **180**, 2479–2489 (2012).
  149. Caramel, J. *et al.* A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Cell* **24**, 466–480 (2013).
  150. Sánchez-Tilló, E. *et al.* Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *Am. J. Cancer Res.* **1**, 897–912 (2011).
  151. Li, F. Z., Dhillon, A. S., Anderson, R. L., McArthur, G. & Ferrao, P.

## BIBLIOGRAFIA

- T. Phenotype Switching in Melanoma: Implications for Progression and Therapy. *Front. Oncol.* **5**, 1–7 (2015).
152. Nieto, M. A., Huang, R. Y. Y. J., Jackson, R. A. A. & Thiery, J. P. P. Emt: 2016. *Cell* **166**, 21–45 (2016).
153. Cao, H. H. *et al.* Inhibition of the STAT3 signaling pathway contributes to apigenin-mediated anti-metastatic effect in melanoma. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016).
154. Malfettone, A. *et al.* Transforming growth factor- $\beta$ -induced plasticity causes a migratory stemness phenotype in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **392**, 39–50 (2017).
155. Bertran, E. *et al.* Overactivation of the TGF- $\beta$  pathway confers a mesenchymal-like phenotype and CXCR4-dependent migratory properties to liver tumor cells. *Hepatology* **58**, 2032–2044 (2013).
156. Baserga, R. The Insulin-like Growth Factor I Receptor: A Key to Tumor Growth? *Cancer Res.* **55**, 249–252 (1995).
157. Cruz, J., Reis-Filho, J. S., Silva, P. & Lopes, J. M. Expression of c-met tyrosine kinase receptor is biologically and prognostically relevant for primary cutaneous malignant melanomas. *Oncology* **65**, 72–82 (2003).
158. Woodward, J. K. L. *et al.* Stimulation and Inhibition of Uveal Melanoma Invasion by HGF, GRO, IL-1 $\alpha$  and TGF- $\beta$ . *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, (2002).
159. Lorenc, V. E., Jaldín-Fincati, J. R., Luna, J. D., Chiabrande, G. A. & Sánchez, M. C. IGF-1 regulates the extracellular level of active MMP-2 and promotes müller glial cell motility. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **56**, 6948–6960 (2015).
160. Bubici, C. & Papa, S. JNK signalling in cancer: In need of new, smarter therapeutic targets. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 24–37 (2014).
161. Wang, Y. *et al.* MALT1 promotes melanoma progression through JNK/c-Jun signaling. *Oncogenesis* **6**, e365 (2017).
162. Derkus, B., Emregul, K. C. & Emregul, E. A new approach in stem cell research—Exosomes: Their mechanism of action via cellular pathways. *Cell Biol. Int.* **41**, 466–475 (2017).

163. Sato, T., Han, F. & Yamamoto, A. The biology and management of uveal melanoma. *Curr. Oncol. Rep.* **10**, 431–438 (2008).
164. Kinsey, E. N. & Salama, A. K. S. Metastatic uveal melanoma-A review of current therapies and future directions. *Eur. Oncol. Haematol.* **13**, 100–106 (2017).
165. Dithmar, S., Rusciano, D. & Grossniklaus, H. E. A new technique for implantation of tissue culture melanoma cells in a murine model of metastatic ocular melanoma. *Melanoma Res.* **10**, 2–8 (2000).
166. Yücel, Y. H. *et al.* Identification of lymphatics in the ciliary body of the human eye: A novel ‘uveolymphatic’ outflow pathway. *Exp. Eye Res.* **89**, 810–819 (2009).
167. Hans E. Grossniklaus, M. Progression of Ocular Melanoma Metastasis to the Liver: The 2012 Zimmerman Lecture. *JAMA Ophthalmol.* **131**, 462–469 (2013).
168. Diener-West, M. *et al.* Development of metastatic disease after enrollment in the COMS trials for treatment of choroidal melanoma: Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report No. 26. *Arch. Ophthalmol.* **123**, 1639–1643 (2005).
169. Hendrix, M. J. *et al.* Regulation of uveal melanoma interconverted phenotype by hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF). *Am. J. Pathol.* **152**, 855–863 (1998).
170. Clarke, M. F. *et al.* Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Infect. Immun.* **66**, 9339–9344 (2006).
171. Vermeulen, L. *et al.* Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 13427–13432 (2009).
172. Al-hajj, M., Wicha, M. S., Benito-hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 3983–3988 (2003).
173. Peitzsch, C., Tyutyunnykova, A., Pantel, K. & Dubrovskaya, A. Cancer stem cells: The root of tumor recurrence and metastases. *Semin. Cancer Biol.* **44**, 10–24 (2017).
174. Fessler, E., Dijkgraaf, F. E., De Sousa E Melo, F. & Medema, J. P.



## BIBLIOGRAFIA

- Cancer stem cell dynamics in tumor progression and metastasis: Is the microenvironment to blame? *Cancer Lett.* **341**, 97–104 (2013).
175. Tura, A. *et al.* Identification of circulating melanoma cells in uveal melanoma patients by dual-marker immunoenrichment. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 4395–4404 (2014).
176. Kim, M. S. *et al.* Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **12**, 655–664 (2016).
177. Doherty, R. E., Sisley, K., Hammond, D. W., Rennie, I. G. & Cross, N. A. Phenotypic plasticity in uveal melanoma is not restricted to a tumor subpopulation and is unrelated to cancer stem cell characteristics. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **58**, 5387–5395 (2017).
178. Hadjimichael, C. *et al.* Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. *World J. Stem Cells* **7**, 1150–84 (2015).
179. Mima, K. *et al.* CD44s regulates the TGF- $\beta$ -mediated mesenchymal phenotype and is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **72**, 3414–3423 (2012).
180. Brown, R. L. *et al.* CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* **121**, 1064–1074 (2011).
181. Fabregat, I., Malfettone, A. & Soukupova, J. New Insights into the Crossroads between EMT and Stemness in the Context of Cancer. *J. Clin. Med.* **5**, 37 (2016).
182. Thakur, R., Trivedi, R., Rastogi, N., Singh, M. & Mishra, D. P. Inhibition of STAT3, FAK and Src mediated signaling reduces cancer stem cell load, tumorigenic potential and metastasis in breast cancer. *Sci. Rep.* **5**, 1–16 (2015).
183. Hoek, K. S. *et al.* Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy. *Pigment Cell Melanoma Res.* **21**, 665–676 (2008).

184. Caporarello, N. *et al.* Melanogenesis in uveal melanoma cells: Effect of argan oil. *Int. J. Mol. Med.* **40**, 1277–1284 (2017).
185. Hoek, K. S. & Goding, C. R. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 746–759 (2010).
186. Mani, S. A. *et al.* The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* **133**, 704–715 (2008).
187. Ocaña, O. H. *et al.* Metastatic Colonization Requires the Repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prrx1. *Cancer Cell* **22**, 709–724 (2012).
188. Dou, J. *et al.* Effect of downregulation of ZEB1 on vimentin expression, tumour migration and tumourigenicity of melanoma B16F10 cells and CSCs. *Cell Biol. Int.* **38**, 452–461 (2014).
189. Fenouille, N. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion. *PLoS One* **7**, e40378 (2012).
190. Puisieux, A., Brabletz, T. & Caramel, J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat. Cell Biol.* **16**, 488–494 (2014).
191. Moon, Y. H., Kim, D., Sohn, H. M. & Lim, W. Effect of CD133 overexpression on the epithelial-to-mesenchymal transition in oral cancer cell lines. *Clin. Exp. Metastasis* **33**, 487–496 (2016).
192. Mcconnell, a. T. *et al.* The prognostic significance and impact of the CXCR4-CXCR7-CXCL12 axis in primary cutaneous melanoma. *Br. J. Dermatol.* **175**, 1210–1220 (2016).
193. Topcu-Yilmaz, P., Kiratli, H., Saglam, A., Söylemezoglu, F. & Hascelik, G. Correlation of clinicopathological parameters with HGF, c-Met, EGFR, and IGF-1R expression in uveal melanoma. *Melanoma Res.* **20**, 126–132 (2010).
194. Ding, S. *et al.* MRC-5 fibroblast-conditioned medium influences multiple pathways regulating invasion, migration, proliferation, and apoptosis in hepatocellular carcinoma. *J. Transl. Med.* **13**, 1–

## BIBLIOGRAFIA

- 13 (2015).
195. Luo, Y. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition and migration of prostate cancer stem cells is driven by cancer-associated fibroblasts in an HIF-1 $\alpha$ / $\beta$ -catenin-dependent pathway. *Mol. Cells* **36**, 138–144 (2013).
  196. Gabrielyan, A., Neumann, E., Gelinsky, M. & Rösen-Wolff, A. Metabolically conditioned media derived from bone marrow stromal cells or human skin fibroblasts act as effective chemoattractants for mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 1–10 (2017).
  197. Chattopahdyay, C. *et al.* Uveal Melanoma: From Diagnosis to Treatment and the Science in Between. *Cancer* **122**, 2299–2312 (2017).
  198. Lai, K., Conway, R. M., Crouch, R., Jager, M. J. & Madigan, M. C. Expression and distribution of MMPs and TIMPs in human uveal melanoma. *Exp. Eye Res.* **86**, 936–941 (2008).
  199. Chang, C. W. *et al.* Epigallocatechingallate inhibits migration of human uveal melanoma cells via downregulation of matrix metalloproteinase-2 activity and ERK1/2 pathway. *Biomed Res. Int.* **2014**, 1–9 (2014).
  200. Economou, M. A. *et al.* Receptors for the liver synthesized growth factors IGF-1 and HGF/SF in uveal melanoma: Intercorrelation and prognostic implications. *Acta Ophthalmol.* **46**, 4372–4375 (2005).
  201. Carvajal, R. D. *et al.* Metastatic disease from uveal melanoma: treatment options and future prospects. *Br. J. Ophthalmol.* **0**, 1–7 (2016).
  202. Algazi, A. P. *et al.* Clinical outcomes in metastatic uveal melanoma treated with PD-1 and PD-L1 antibodies. *Cancer* **122**, 3344–3353 (2016).
  203. Radpour, R. Tracing and targeting cancer stem cells: New venture for personalized molecular cancer therapy. *World J. Stem Cells* **9**, 169–178 (2017).
  204. Scatena, R., Bottoni, P., Pontoglio, A. & Giardina, B. Cancer stem cells: the development of new cancer therapeutics. *Expert Opin.*

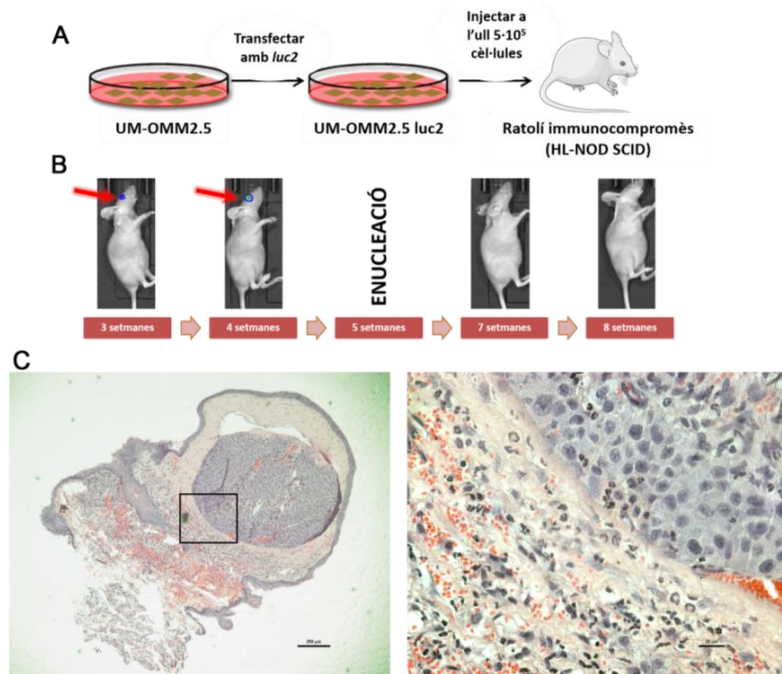
- Biol. Ther.* **11**, 875–892 (2011).
205. Chen, Z., Forman, L. W., Williams, R. M. & Faller, D. V. Protein kinase C- $\delta$  inactivation inhibits the proliferation and survival of cancer stem cells in culture and in vivo. *BMC Cancer* **14**, (2014).
  206. Khalili, J. S. *et al.* Combination small molecule MEK and PI3K inhibition enhances uveal melanoma cell death in a mutant GNAQ- and GNA11-dependent manner. *Clin. Cancer Res.* **18**, 435–455 (2012).
  207. Beckwith, H. & Yee, D. Minireview: Were the IGF Signaling Inhibitors All Bad? *Mol. Endocrinol.* **29**, 1549–1557 (2015).
  208. Yang, H. *et al.* In-vivo xenograft murine human uveal melanoma model develops hepatic micrometastases. *Melanoma Res Wolters Kluwer Heal. Melanoma Res.* **18**, 95–103 (2008).
  209. Yang, H., Cao, J. & Grossniklaus, H. E. Uveal Melanoma Metastasis Models. **30322**, 151–160 (2015).
  210. Sharma, A. Role of stem cell derived exosomes in tumor biology. *Int. J. Cancer* **142**, 1086–1092 (2017).
  211. Somasundaram, R. & Herlyn, M. Melanoma exosomes: Messengers of metastasis. *Nat. Med.* **18**, 853–854 (2012).
  212. Huang, R. & Rofstad, E. K. Integrins as therapeutic targets in the organ-specific metastasis of human malignant melanoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**, 1–14 (2018).



# ANNEX

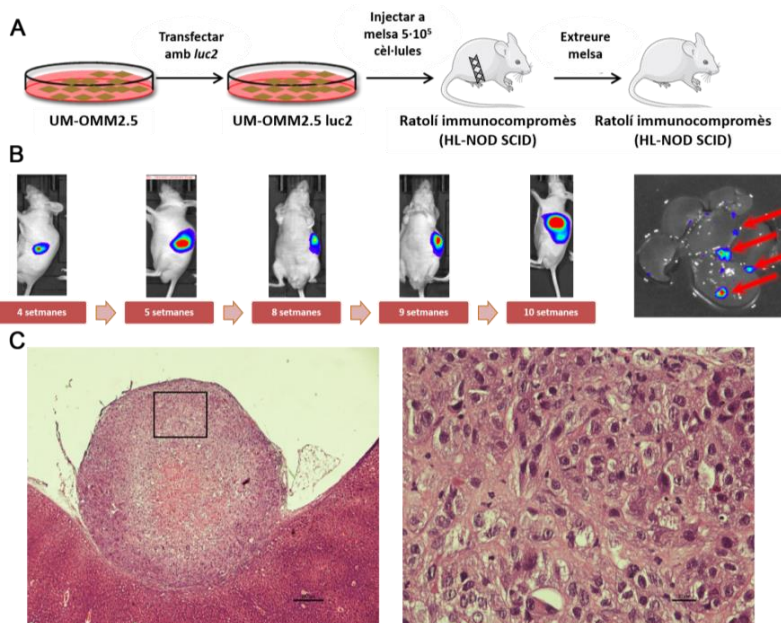
**Bases Moleculars i Estratègies Terapèutiques contra les Metàstasis  
del Melanoma Uveal**



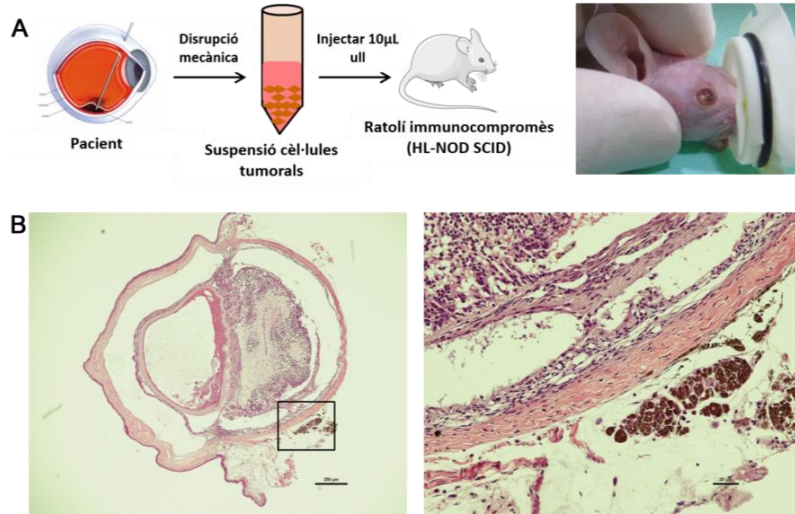


**Figura A1: Model ortotòpic de UM en ratolí. A)** Esquema del procés experimental utilitzat per al desenvolupament de tumors ortotòpics de UM *in vivo*. Es van transfectar cèl·lules OMM-2.5 amb el gen *luc2* i es van seleccionar les cèl·lules positives a través de la resistència a la puromicina. Després es van tripsinitzar les cèl·lules en cultiu i es van resuspendre amb DMEM sense sèrum a una concentració de  $5 \cdot 10^7$  cèl·lules/mL per injectar-ne  $10 \mu\text{L}$  a cada ratolí immunocompromès. La injecció es va realitzar a la part anterior de la coroides amb una agulla de 30 calibres mitjançant un túnel per evitar el reflux. **B)** Desenvolupament tumoral local. El seguiment del creixement tumoral es va realitzar amb el luminòmetre IVIS-200 després d'administrar 0,15 mg del substrat de luciferina en cada ratolí abans de la observació. En vermell es mostra la senyal lumínica provocada per les cèl·lules de OMM-2.5 *luc2*. **C)** Immunohistoquímica amb H&E d'un ull de ratolí amb desenvolupament tumoral. Es mostra la presència de melanòcits tumorals irregulars i amb nucleòls tènys de violeta.





**Figura A2: Model metastàtic experimental de UM en ratolí. A)** Esquema del procés experimental utilitzat per al desenvolupament de metàstasis experimentals de UM *in vivo*. Es van transfectar cèl·lules OMM-2.5 amb el gen *luc2* i es van seleccionar les cèl·lules positives a través de la resistència a la puromicina. Després es van tripsinitzar les cèl·lules en cultiu i es van resuspendre amb DMEM sense sèrum a una concentració de  $1 \cdot 10^7$  cèl·lules/mL per injectar-ne 50  $\mu$ L a cada ratolí immunocompromès. 48 hores després de la injecció es va retirar la melsa per evitar el creixement tumoral local. **B)** Creixement de nòduls tumorals de UM desenvolupats a través de la disseminació sanguínia. El seguiment del creixement tumoral es va realitzar amb el luminòmetre IVIS-200 després d'administrar 0,15 mg del substrat de luciferina en cada ratolí abans de la observació. En vermell es mostra la senyal lumínica provocada per les cèl·lules de OMM-2.5 *luc2* en el fetge. **C)** Immunohistoquímica amb H&E d'un fetge de ratolí amb desenvolupament tumoral. Es mostra la presència de melanòcits tumorals irregulars i amb nuclèols tenyits de violeta.



**Figura A3: Model ortotòpic de PDX de UM en ratolí. A)** Esquema del procés experimental utilitzat per al desenvolupament de PDX ortotòpics de UM *in vivo*. Es van extraure una biòpsia de UM per endoressecció i es van separar les cèl·lules per disgregació mecànica. Després es va resuspendre la massa tumoral amb 10 mL de DMEM sense sèrum i es van injectar 10 µL de solució a cada ratolí immunocompromès. La injecció es va realitzar a la part anterior de la coroides amb una agulla de 30 calibres mitjançant un túnel per evitar el reflux. **B)** Immunohistoquímica amb H&E d'un ull de ratolí després de 3 mesos de desenvolupament tumoral. Es mostra la presència de melanòfags però no s'observen melanòcits tumorals.

