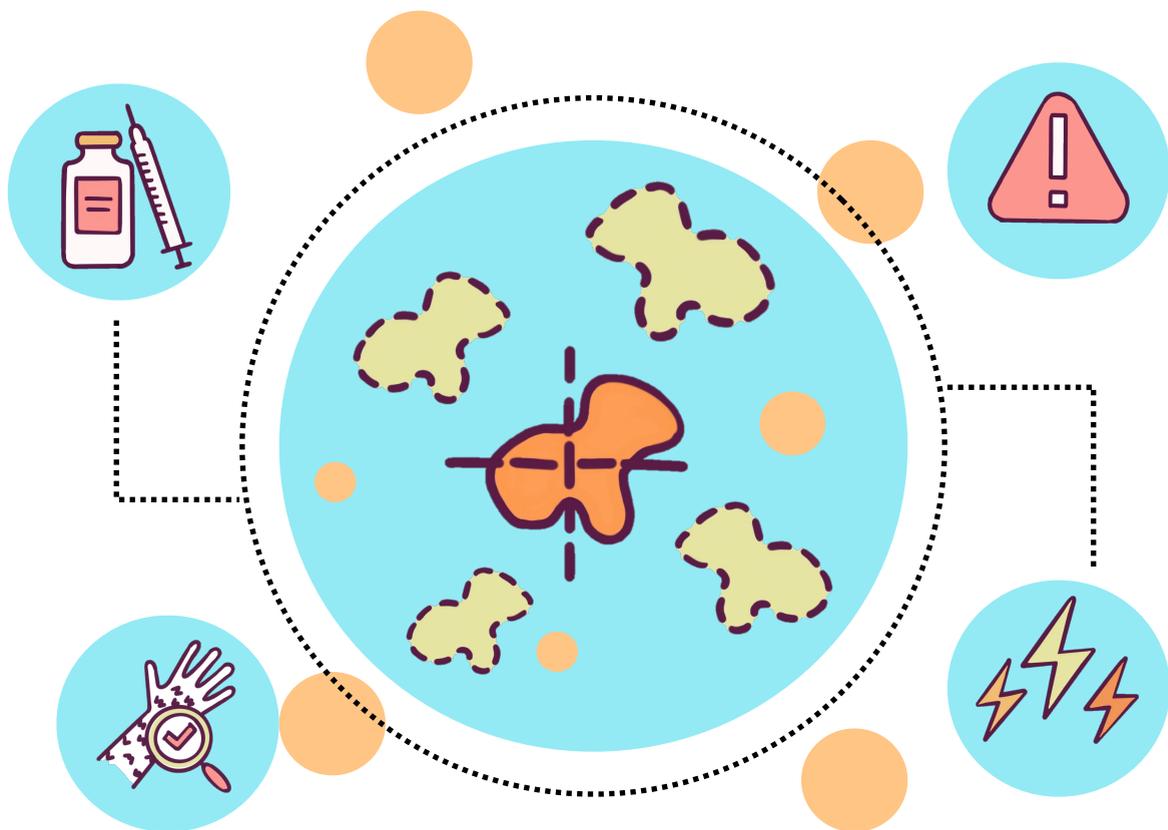




Tesis Doctoral

LA CHALCONA HÍBRIDA HY-CHAL ES UN POTENTE INDUCTOR DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO



IRENE RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,
Fisiología, Genética e Inmunología

*Todo mi agradecimiento al Dr. Francisco Estévez Rosas y al Dr. José Quintana Aguiar
por todo cuanto me han enseñado a nivel científico y humano
y a todos mis compañeros de laboratorio, por su ayuda y dedicación.*

*Gracias a Josep Domingo Domenech y a Verónica Rodríguez Bravo,
por animarme a empezar esta aventura y por ser un modelo a seguir.*

A mi familia y amigos, por apoyarme siempre.

*A mis padres por su cariño incondicional
y a Álvaro por sus macarrones a las 3 de la madrugada.*

*También quiero darle las gracias a Mercedes Ramírez,
sin cuyas frutas, verduras y plantas mi vida habría sido menos verde.*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Abreviaturas	1
2. Introducción	
2.1. Cáncer	
2.1.1. Definición	12
2.1.2. Histopatología	13
2.1.3. Epidemiología	16
2.1.4. Etiología	17
2.1.5. Características Distintivas de las Células Cancerosas	18
2.2. Melanoma	
2.2.1. La Piel	26
2.2.2. Características Generales del Melanoma	27
2.2.3. Epidemiología del Melanoma	28
2.2.4. Etiología	29
2.2.5. Genética y Genómica del Melanoma	31
2.3. Tratamientos	
2.3.1. Perspectiva General	36
2.3.2. Fitoquímicos	37
2.4. Flavonoides	
2.4.1. Propiedades	39
2.4.2. Interacción con las Vías de la Apoptosis	39
2.4.3. Interacción con la Maquinaria del Ciclo Celular	41
2.4.4. Interacción con los Mecanismos de Autofagia	42
2.4.5. Interacción con el Metabolismo Redox	44
2.4.6. Interacción con Factores de Inflamación e Inmunidad	45
2.5. Chalconas	
2.5.1. Características Generales de las Chalconas	49
2.5.2. Chalconas Naturales	50
2.5.3. Derivados de las Chalconas	50
3. Objetivos	52

4. Material y Métodos

4.1. Productos y Materiales	
4.1.1. Compuesto Híbrido Indol-Chalcona	53
4.1.2. Cultivos Celulares	54
4.1.3. Microscopía de Fluorescencia (Bisbencimida)	54
4.1.4. Citometría de Flujo	54
4.1.5. Determinación de la Actividad Caspasa	54
4.1.6. Determinación de Proteínas (Western Blot)	55
4.1.7. Reactivos Generales de Laboratorio	56
4.2. Modelo Experimental	
4.2.1. Cultivo de Células SK-MEL-1 y MEL-HO	57
4.2.2. Tratamientos con la Chalcona Híbrida	57
4.3. Métodos	
4.3.1. Evaluación de la Citotoxicidad <i>in vitro</i> y la Proliferación Celular	58
4.3.2. Estudio de la Apoptosis por Tinción con Bisbenzimidida	58
4.3.3. Estudio de la Apoptosis por Cuantificación de Células Hipodiploides	59
4.3.4. Determinación de la Actividad Caspasa	60
4.3.5. Determinación de la Externalización de Fosfatidilserina	61
4.3.6. Inmunodetección de Proteínas (Western Blot)	62
4.3.7. Detección de ROS Intracelular	63
4.3.8. Análisis del Potencial de la Membrana Mitocondrial	63
4.4. Métodos Estadísticos	65

5. Resultados

5.1. Disminución de la Viabilidad	
5.1.1. Ensayo del MTT	66
5.1.2. Microscopía Óptica de Contraste de Fases	67
5.2. Inducción de Apoptosis	
5.2.1. Evaluación Morfológica por Tinción con Hoechst 33258	69
5.2.2. Detección de la Externalización de la Fosfatidilserina	69
5.2.3. Detección de Células Hipodiploides	71

5.3. Activación de la Ruta de las Caspasas	
5.3.1. Detección de la Activación de las Caspasas	72
5.3.2. Análisis de la Proteólisis de PARP	73
5.3.3. Análisis de la Actividad Caspasa	75
5.3.4. Efecto de la Exposición a Inhibidores de Caspasas	75
5.4. Cambios en las Proteínas BCL-2	
5.4.1. Proteínas BCL-2 Anti-Apoptóticas	78
5.4.2. Proteínas BCL-2 Pro-Apoptóticas Multidominio	80
5.4.3. Proteínas BCL-2 Pro-Apoptóticas Solo BH3	80
5.5. Cambios en TRAIL, DR4 Y DR5	82
5.6. Alteraciones Mitocondriales	
5.6.1. Liberación de Citocromo c	83
5.6.2. Disminución del Potencial de Membrana Mitocondrial	84
5.7. Alteraciones de las Vías de Señalización	
5.7.1. Aumento de ROS y Efecto del Glutatión	85
5.7.2. Activación de la vía MAPK	87
5.7.3. Inhibición de la Vía del AKT	87
5.7.4. Efecto de los Inhibidores de las rutas MAPK y PI3K sobre la Muerte Celular	90
5.7.5. Regulación Negativa de β -Catenina	91
5.7.6. Regulación Negativa de NF- κ B	93
5.7.7. Regulación Negativa de c-Myc y p21	94
6. Discusión	97
7. Conclusiones	110
8. Bibliografía	111
9. Anexo	132

1. ABREVIATURAS

A

ACD: Gen homólogo de la displasia adrenocortical. Gen de gran importancia durante la melanogénesis.

AKT: Este gen codifica para tres proteínas pertenecientes a la familia de las quinasas de serina/treonina que son susceptibles de ser fosforiladas por PI3K.

AXIN: proteína citoplasmática que es capaz de inhibir la señalización de la vía del WNT e interviene en la regulación de la β -catenina.

APC: La proteína APC actúa como supresor tumoral. Su función es regular la segregación de cromosomas durante la mitosis y también está relacionada con los procesos de migración y adhesión celular y la regulación de la β -catenina y la ruta del WNT.

APAF1: Factor activador de la proteasa apoptótica. La proteína APAF-1, que es una de las principales moléculas señalizadoras en la apoptosis intrínseca, tiene la capacidad de responder a la liberación de citocromo c desde la mitocondria, favoreciendo la formación del apoptosoma.

ATG: Genes relacionados con la autofagia. Es una familia de genes cuyas proteínas intervienen en los procesos de autofagia.

AP-1: Proteína activadora-1. Factor de transcripción dimérico compuesto por proteínas pertenecientes a la familia JUN, FOS o ATF (factores activadores de la transcripción).

B

BAP1: Proteína 1 asociada a BRCA1. Es un gen con actividad supresora de tumores y su producto, la BAP1, es una hidrolasa ubiquitina carboxi-terminal que regula un gran número de procesos celulares, como la reparación del ADN, el control de la progresión del ciclo celular, la modificación de la cromatina, la apoptosis o la respuesta inmune.

BRCA1: Gen del cáncer de mama 1. Su producto es una fosfoproteína nuclear con un papel fundamental en la estabilidad genética y actividad supresora tumoral.

BRCA2: Gen del cáncer de mama 2. La proteína codificada por este gen interviene en el mantenimiento de la integridad genética de la célula y la respuesta de la misma ante el daño a su ADN.

BRAF: Homólogo B1 del oncogen viral V-Raf del sarcoma murino. Se trata de un proto-oncogén que codifica para la proteína B-RAF, que pertenece a la familia RAF y posee actividad serina/treonina quinasa.

BRAF V600E: Mutación V600E del proto-oncogén B-RAF. Esta mutación específica del gen B-RAF suele ir ligada a un aumento en la proliferación celular y la agresividad de las células neoplásicas.

C

CMT: Célula madre tumoral.

CDK: Quinasas dependientes de ciclinas. Familia de proteínas que se unen a ciclinas específicas para formar complejos activos capaces de fosforilar dianas moleculares específicas.

CDKN2A: Inhibidor de la quinasa dependiente de la ciclina 2A. Este gen codifica para distintas proteínas, siendo las más estudiadas p16 (INK4A) y p14 (ARF). Participa en el control de la diferenciación, división y muerte celular.

CK1: Caseína quinasa 1. Se caracteriza por su tendencia a utilizar proteínas ácidas (como la caseína) como sustrato. Puede fosforilar una gran cantidad de moléculas y participa en la señalización de WNT y en la segregación cromosómica durante la mitosis.

C-FLIP: Proteína inhibidora de la enzima convertidora de IL-1 similar al dominio de muerte asociado a FAS. Se trata de un regulador maestro anti-apoptótico que también interviene en la regulación de la necrosis y la autofagia.

CAT: Catalasa. Es una enzima que cataliza la degradación extracelular e intracelular del peróxido de hidrógeno.

COX-2: Ciclooxygenasa 2. Es la forma inducible de la prostaglandina-endoperoxidasa sintasa (PTGS) y participa en la generación de prostanooides y prostaglandinas a partir de ácido araquidónico libre (no asociado a la bicapa lipídica de la membrana plasmática).

D

DVL-1: Homólogo humano del gen desordenado de *Drosophila*. Codifica para una fosfoproteína citoplasmática (DVL) que regula la proliferación y actúa como molécula transdutora de señales durante el desarrollo

embrionario. Participa tanto en la vía canónica como en la no canónica de la señalización de WNT.

DR4: Receptor de muerte 4. Proteína que actúa como receptor tipo TNF y cuyo ligando es TRAIL (APO2), que induce la apoptosis. Capaz de unir FADD y TRADD.

DR5: Receptor de muerte 5. Proteína que actúa como receptor tipo TNF y cuyo ligando es TRAIL (APO2), que induce la apoptosis. Capaz de unir FADD y TRADD.

DISC: Complejo de señalización inductor de muerte. Es un complejo formado por distintas proteínas pro-apoptóticas. Se compone de un receptor de muerte celular, FADD y caspasa 8. La activación del receptor comienza el proceso de formación de DISC, que desembocará en la apoptosis.

E

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico. Se trata de una proteína transmembrana que sirve de receptor para ligandos de la familia de los factores de crecimiento. Pertenece a la familia ErbB.

ErbB: Homólogo del oncogén viral de la leucemia eritroblástica. Es un receptor de superficie celular tipo tirosina-quinasa estructuralmente emparentado con EGFR y que interviene en las rutas de señalización de PI3K/AKT y RAS/RAF/MAPK. Promueve la proliferación e inhibe la apoptosis.

ERCC: Proteína de reparación por escisión. El producto de este gen es necesario para la reparación de lesiones del ADN por acción de la luz ultravioleta o productos químicos como el cisplatino.

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares. Es una de las principales moléculas señalizadoras de la ruta de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK).

F

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos. Se trata de una familia de proteínas con capacidades mitogénicas y de supervivencia. Intervienen en los procesos de migración y metástasis de las células cancerosas.

FADD: Proteína adaptadora del dominio de muerte asociada a FAS. La proteína codificada por este gen es una molécula adaptadora que

interactúa con distintos receptores de superficie y actúa como intermediaria en la apoptosis.

FLIP: Inhibidor celular proteico de FLICE, también llamado CFLAR. Es un gen clave en la regulación de la apoptosis y su producto es estructuralmente similar a la caspasa 8.

FOXO: Proteína O de caja de cabeza de tenedor. Grupo de genes que codifican para una familia de factores de transcripción llamada de cabeza de tenedor, que se caracterizan por contar con un dominio de este tipo en su estructura. Juega un papel en el proliferación y diferenciación de las células.

G

GLOBOCAN: Observatorio Global del Cáncer. Web desarrollada por el Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer.

GNAQ: Subunidad α de la proteína de unión a nucleótidos de guanina. La proteína para la que codifica este gen es la subunidad α de clase Gq, que se une al dominio transmembrana de su receptor para activar a la fosfolipasa c- β .

GAP: Genes que intervienen el establecimiento de los distintos segmentos embrionarios durante el desarrollo de la larva de *Drosophila*.

GTP: Guanosín trifosfato. Nucleótido compuesto por ribosa, guanina y un grupo trifosfato que se utiliza como fuente de energía. Se genera en el ciclo de Krebs. Hay proteínas cuya conformación cambia hacia una forma activa cuando se encuentran unidas a GTP.

GDP: Guanosín difosfato. Suele encontrarse unido a proteínas G en su forma inactiva.

GSK-3 β : Glucógeno sintasa quinasa 3 β . El producto de este gen es una proteína con actividad serina-treonina quinasa que pertenece a la familia de las glucógeno-sintasas quinasas. Es un regulador negativo de la homeostasis de la glucosa e interviene en procesos de metabolismo energético, inflamación, disfunción mitocondrial y apoptosis.

GPX: Glutatión peroxidasa. Las proteínas derivadas de este grupo de genes catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno por el glutatión, protegiendo a la célula del estrés oxidativo.

GSH: Forma reducida del glutatión. Actúa como donante de electrones y actúa como antioxidante endógeno no enzimático.

GST: Glutatión S-transferasa. Enzima multifuncional implicada en procesos de detoxificación que principalmente se encarga de canalizar la oxidación del glutatión reducido.

I

IGFR: Receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina. Receptor transmembrana con actividad tirosina-quinasa que se activa al unir IGF (Factor de Crecimiento Similar a la Insulina). Interviene en procesos de proliferación y supervivencia en células tanto normales como neoplásicas.

IL-1: Interleuquina-1. Citoquina que juegan un papel esencial en los procesos de respuesta inmune e inflamación.

IKK- β : También llamada IKK2 o IKBKB. Esta proteína fosforila a la molécula inhibidora de NF- κ B cuando ambos factores se encuentran unidos formando un complejo.

J

JNKK1: Conocido alternativamente como MKK4, MAPK2K4, SERK1 o MEK4. Su proteína asociada pertenece a la familia de las MAPK y participa en una amplia variedad de procesos como la proliferación, la diferenciación celular y la regulación de la transcripción.

JNK1: También llamado MAPK8. Proteína que pertenece a la familia de las MAPK y participa en una amplia variedad de procesos como la proliferación, la diferenciación celular y la regulación de la transcripción.

K

KIT: Igualmente denominado proto-oncogén c-Kit, codifica para una proteína que actúa como receptor tirosina-quinasa capaz de fosforilar numerosas proteínas intracelulares implicadas en procesos como la melanogénesis, la proliferación, la migración celular o la apoptosis.

L

LKB1: También conocido como gen STK11, codifica para la proteína serina-treonina quinasa 11, que controla la polaridad celular y puede actuar como supresor tumoral.

LDH: Lactato deshidrogenasa. Esta proteína cataliza la conversión de L-lactato a piruvato como paso final en la glicolisis anaerobia.

M

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos. Estas proteínas forman una familia que puede dividirse en distintos grupos, entre los que se puede encontrar ERK, JNK/SAPK o p38/SAPK. Forman parte de cascadas de señalización que regulan una amplia variedad de funciones biológicas.

MEK1: También llamado MAP2K1. Proteína que forma parte de la familia de las MAPK y es capaz de activar a ERK1 y ERK2.

MEKK: También llamada MAPKKK1 o MAP3K1. Proteína quinasa de serina/treonina que participa en la señalización por ERK y JNK, así como en la ruta del NF- κ B.

MITF: Factor de transcripción asociado con microftalmia. Este factor de transcripción regula el desarrollo de los melanocitos y es responsable de la transcripción de distintas moléculas implicadas en la melanogénesis.

MTOR: Pertenece a la familia de las quinasas relacionadas con la fosfatidilinositol quinasa y actúa como mediadora celular en la respuesta al estrés provocado por el daño al material genético, la ausencia de nutrientes, etc.

MDM2: Doble minuto murino 2. Es un proto-oncogén cuya proteína asociada puede promover la formación de tumores mediante la inhibición de moléculas supresoras de tumores, como p53.

MYC: Homólogo del oncogén viral de la mielocitomatosis aviar. También llamado c-Myc, es un proto-oncogén que codifica para una fosfoproteína nuclear que juega un papel fundamental en la progresión del ciclo celular y la apoptosis. La amplificación este gen puede encontrarse en numerosos cánceres humanos.

N

NF1: Neurofibromina 1. Esta proteína actúa como regulador negativo en la ruta de señalización de RAS.

NF2: Neurofibromina 2. Gen que codifica para la proteína merlina, también llamada schwannomina, que funciona como molécula de anclaje del citoesqueleto a la membrana plasmática.

NRAS: Homólogo del oncogén viral RAS del neuroblastoma que codifica para una proteína de membrana que se mueve entre el aparato de Golgi y la membrana plasmática y que posee actividad GTPasa intrínseca.

NOX: Grupo de genes que codifican distintas NADPH-oxidasas. Generalmente transfieren electrones a través de distintas membranas biológicas.

NIK: También llamado MAP3K14. Codifica para la proteína activada por mitógenos quinasa quinasa quinasa 14, que es una quinasa de serina/treonina. Al unirse a TRAF2 se estimula la vía de NF- κ B.

MMP: Metaloproteinasas de la matriz extracelular. Funcionan degradando proteínas que se encuentran fuera de la célula y juegan un papel esencial en los fenómenos de morfogénesis, remodelado tisular en respuesta al daño, etc.

NF- κ B: Factor Nuclear κ B. Se trata de un grupo de proteínas que actúan como mediadores fundamentales en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria y también interviene en la apoptosis.

P

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas. Es una de las proteínas que regulan el crecimiento y la división celular.

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno. También llamado SERPINE1, este gen codifica para un miembro de la familia de los inhibidores de proteasas de serina. Es la proteína principal en la inhibición del activador del plasminógeno tisular y la uroquinasa, por lo que actúa inhibiendo de manera general la fibrinólisis.

PTEN: Homólogo de fosfatasa y tensina. Es un gen supresor de tumores que se encuentra mutado con mucha frecuencia en una amplia variedad de tipos tumorales. Codifica para la fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa y regula negativamente la vía del AKT.

P53: Proteína con actividad supresora tumoral que actúa respondiendo a diversos tipos de estrés celular, induciendo la parada del ciclo celular, la senescencia, apoptosis, reparación del ADN u otros cambios en el metabolismo.

POT1: Protección de los Telómeros 1. Es un gen miembro de la familia de la telomina y codifica para una proteína nuclear implicada en el mantenimiento de los telómeros.

PI3K: Fosfatidil inositol 3-quinasa. Forma parte de una de las rutas de señalización de crecimiento y supervivencia más importantes (PI3K/AKT/mTOR). Las PI3K son un grupo de quinasas asociadas a los lípidos de la membrana plasmática.

P38: Proteína codificada miembro de la familia de las MAPK que actúa integrando distintas señales bioquímicas para generar efectos en la regulación de la proliferación, la diferenciación, la transcripción de genes y la regulación del desarrollo. Para activarse requiere la fosforilación por una MKK.

PDK1: Isoforma 1 de la piruvato deshidrogenasa (PDH) mitocondrial. Las PDH son complejos multienzimáticos que catalizan la descarboxilación oxidativa del piruvato.

PARP: Poli-(ADP-ribosa)-polimerasa. Grupo de proteínas encargadas de utilizar NAD⁺ como sustrato para la modificación con ADP-ribosa de proteínas receptoras. La mayoría de las PARP son citoplasmáticas y poseen diversas funciones, como la regulación de la viabilidad y división celular o la modificación del citoesqueleto.

PLA-2: Fosfolipasa A2. Familia de fosfolipasas que libera ácidos grasos y lisofosfolípidos a partir de fosfoglicéridos. Participan en la regulación de los fosfolípidos de las biomembranas.

PGH₂: Prostaglandina H₂. Sirve como sustrato para la isomerización de PGE₂ y es precursora de otras muchas moléculas. Se sintetiza a partir del ácido araquidónico por acción de enzimas ciclooxigenasas.

PGE₂: Prostaglandina E₂. Una de las principales moléculas mediadoras en enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide. Se genera por la conversión de ácido araquidónico mediante la acción de la ciclooxigenasa 2 (COX2).

R

RAS: Proteínas pequeñas con actividad GTPasa que participan en la regulación del crecimiento, diferenciación y proliferación celular.

RALGDS: Estimulador de la disociación de GDP en la proteína RAL. Son moléculas efectoras en la vía de las GTPasas relacionadas con RAS.

RAF1: Homólogo del oncogén viral de la leucemia murina V-RAF. Codifica para proteínas de la familia de las MAPK3. Actúan en la ruta de RAS activando a MEK1 y MEK2.

S

SMAC: También llamada DIABLO, es una proteína inhibidora de los inhibidores de caspasas (IAPs). Esta proteína se encuentra normalmente en la mitocondria pero se libera al citosol cuando la célula comienza a entrar en apoptosis. Es entonces cuando se une a IAPs, favoreciendo la activación de la cascada de caspasas.

SOD: Superóxido dismutasa. Familia de proteínas que actúan como antioxidantes endógenos enzimáticos.

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3. Esta proteína pertenece a la familia de las STAT, que son fosforiladas por las quinasas asociadas a su receptor en presencia de citoquinas o factores de crecimiento. Entonces dimerizan y se traslocan al núcleo de la célula, donde actúan como factores de transcripción.

T

TGF- α : Factor de crecimiento transformante α . Proteína que forma parte de la familia de citoquinas del factor de crecimiento epidérmico (EGF).

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β . Proteína citoquina que forma parte de la superfamilia de los factores de crecimiento. Son capaces de unirse a distintos receptores y favorecen tanto el reclutamiento como la activación de la familia de factores de transcripción SMAD, que regulan la expresión de distintos genes.

TIMP-1: Inhibidor tisular de la metaloproteasa 1. Este gen pertenece a la superfamilia TIMP, que codifica para distintas proteínas con capacidad inhibidora de metaloproteasas de la matriz (MMP) y promotora de la proliferación.

TERT: Telomerasa transcriptasa inversa. Es una polimerasa de ADN dependiente de ARN cuya desregulación podría jugar un papel importante en la oncogénesis y procesos de transformación neoplásica.

TRAIL: También llamado TNFSF10, APO2L o CD253, este gen codifica para una citoquina que forma parte del grupo de ligandos para el factor de necrosis tumoral (TNF). Esta proteína parece inducir apoptosis en células tumorales pero no en células sanas.

TRADD: Dominio de muerte asociado a TNRF. Proteína que actúa como intermediaria en los procesos de muerte celular programada y la activación de NF- κ B.

TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral. Familia de proteínas que actúan bien activando rutas de señalización apoptóticas o induciendo la expresión de genes implicados en la diferenciación y supervivencia celular.

U

UV: Radiación ultravioleta. Forma de radiación electromagnética emitida principalmente por el Sol.

ULK: Quinasa activadora de la autofagia similar a Unc. Es una proteína quinasa de serina/treonina implicada en la autofagia.

V

VEGF-A: Factor de crecimiento endotelial vascular. El factor de crecimiento sintetizado a partir de este gen tiene la capacidad de inducir la proliferación y migración de células endoteliales vasculares y es esencial en procesos angiogénicos normales y patológicos.

VEGF-R2: También llamado KDR, FLK1 o CD309. Este gen codifica uno de los dos tipos distintos de receptores de VEGF.

W

WNT: Esta familia de moléculas señalizadoras influye sobre diversos procesos biológicos como la apoptosis o la movilidad celular. Es especialmente importante durante la embriogénesis y se cree que está estrechamente ligada a la oncogénesis.

X

XIAP: Inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X. Proteína que pertenece a la familia de inhibidores de la apoptosis y que también interviene en la modulación de los procesos inflamatorios e inmunitarios, participa en la homeostasis del cobre, la proliferación y la capacidad de invasión y metástasis.

XO: Xantina oxidasa. Proteína que pertenece a una familia de hidroxilasas que intervienen en el metabolismo oxidativo de las purinas.

Z

ZAP-70: Proteína 70 Asociada a Z. También llamado SRK o STD, este gen tiene como producto una proteína tirosina quinasa con un papel importante en el desarrollo de las células T y la activación linfocitaria.

2. INTRODUCCIÓN

2. 1. CÁNCER

2. 1. 1. Definición

La Organización Mundial de la Salud define el cáncer como un grupo de enfermedades cuya característica definitoria es la multiplicación rápida de células anormales y con capacidad para invadir tejidos circundantes, pudiendo dispersarse así a otras partes del cuerpo (1).

El cáncer no es una única enfermedad sino una agrupación heterogénea de dolencias de naturaleza neoplásica con características comunes. Su origen se considera genético, ya que su aparición está causada por mutaciones en el ADN y cambios en el epigenoma, que alteran la expresión genética normal aumentando la capacidad de multiplicación y división celular (2).

Existen más de 100 tipos distintos de cáncer, la mayoría de ellos obtienen su nombre a partir del órgano o tejido en el que se forman y cada uno de ellos puede considerarse como una enfermedad independiente, con un origen, evolución y tratamiento que puede ser totalmente diferente (3).

A nivel experimental y durante los cultivos celulares, se considera que una célula expresa un genotipo maligno cuando se cumplen una serie de requisitos: las células del cultivo han evolucionado a partir de una única célula original, son capaces de crecer en ausencia de factores de crecimiento, tienen la capacidad de cruzar membranas artificiales introducidas en los sistemas de cultivo y pueden generar tumores si son inyectadas en ratones inmunodeprimidos.

Más recientemente se ha establecido un criterio molecular que permite identificar las células cancerígenas en función de las siguientes características exclusivas de este tipo de célula maligna: inmortalidad replicativa, independencia de señales de crecimiento, insensibilidad a inhibidores del crecimiento, evasión de la apoptosis, capacidad de invasión y metástasis, reprogramación del metabolismo energético, evasión del

sistema inmune, contribución al mantenimiento de un microambiente inflamatorio e inestabilidad y mutación en su genoma.

Cabe destacar que las células que se encuentran formando parte de una masa tumoral no son generalmente de una única clase, siendo por tanto los tumores un tejido complejo y heterogéneo, con células con diferente morfología y características biológicas. Una de las principales propiedades de las células cancerosas es su exagerada capacidad de división, que favorece la aparición de nuevas mutaciones en las subsecuentes generaciones. Esta heterogeneidad dificulta el establecimiento de un tratamiento óptimo y se relaciona con un pronóstico menos favorable (4).

Para explicar esta variabilidad celular contamos con dos modelos: el modelo de la célula madre tumoral (CMT) y el modelo de evolución clonal. El modelo de las células madre tumorales se basa en la hipótesis que establece que son estas células madre las que son capaces de originar, mantener y expandir los tumores, así como de dar lugar a la heterogeneidad celular. Por otra parte, el modelo de evolución clonal sugiere que son los cambios genéticos y/o epigenéticos que ocurren en la división de las células tumorales los que favorecen la acumulación de mutaciones beneficiosas en sus clones, que competirían con otros con mutaciones distintas por el microambiente. Esta competitividad excluyente sería por tanto el origen de la pluralidad celular dentro de una masa neoplásica (5).

2. 1. 2. Histopatología

A nivel histopatológico, el cáncer se define y clasifica en función de las características que exhibe el tejido analizado mediante distintas técnicas de microscopía que permiten la distinción entre células normales y neoplásicas. Las células tumorales se podrán diferenciar del tejido sano al observar su morfología, la arquitectura tisular que las rodea, la forma y color del núcleo celular y las estructuras mitóticas formadas durante su división (6).

Las neoplasias benignas son tumores cuyas células tienden a estar relativamente bien diferenciadas, por lo que no han perdido totalmente su función original, permitiendo que el tejido tumoral se asemeje al original. Se trata de neoplasias raramente letales pero que pueden causar

problemas de salud dependiendo de su localización al obstruir o presionar estructuras orgánicas (7).

Las neoplasias malignas pueden invadir y destruir la arquitectura tisular normal y dispersarse a otras partes del organismo. Están compuestas por células que han perdido tanto la capacidad de auto-controlar su proliferación como la diferenciación propia del tejido al que pertenecen. Se trata de tumores potencialmente mortales, que causan isquemia y lesiones tisulares mientras se desarrollan.

La histopatología permite clasificar los tumores (Figura 1) en función del tejido u órgano de origen, el tipo de células que lo conforman, el tamaño general de la masa neoplásica, si el tumor se ha diseminado hacia los ganglios linfáticos cercanos y el potencial expresado por las células para seguir creciendo y metastatizar (8).

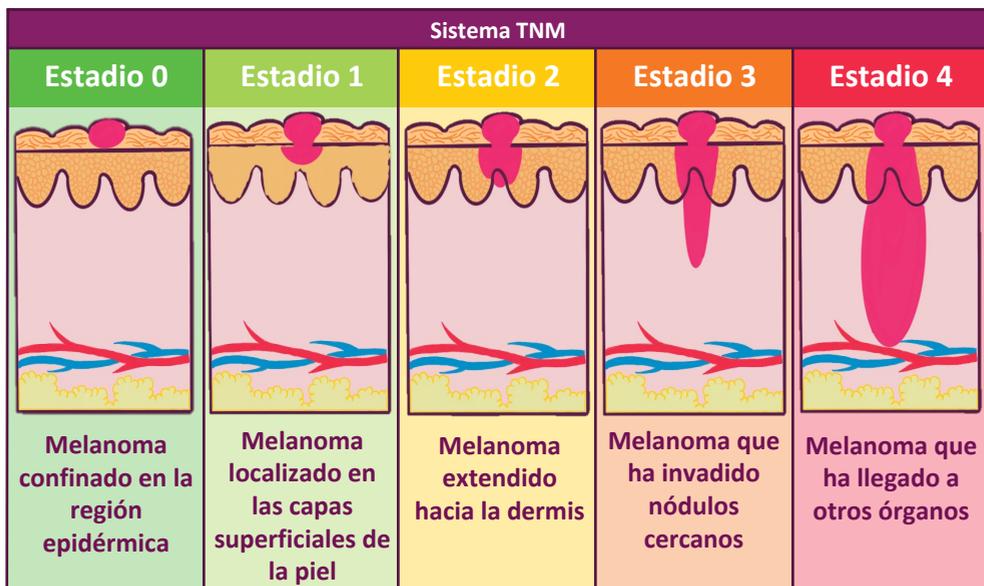


Figura 1. Estadios del Melanoma. Actualmente el sistema más extendido para determinar el grado de un tumor es el TNM (origen del Tumor, extensión hacia Nódulos adyacentes, Metástasis hacia otros órganos). Se considera que los tumores de grado 0 y 1 son benignos o de bajo riesgo, mientras que los del grado 2 pueden variar de riesgo intermedio a alto y los tumores de grados 3 y 4 siempre se consideran tumores avanzados y de alto riesgo.

Atendiendo a la célula originaria del tumor, los principales tipos de cáncer suelen adscribirse a una de las siguientes familias (9-11):

- **Carcinomas:** Tumores que se inician en la piel o en la superficie de los órganos internos (epitelios). Es el tipo tumoral más frecuente (85 de cada 100 nuevos casos son carcinomas).
- **Sarcomas:** Pueden originarse en tejido óseo, muscular, graso, cartilaginoso o en vasos sanguíneos (tejidos conectivos). Es muy poco común y conforma sólo un 1% de los cánceres diagnosticados.
- **Leucemias:** En este tipo de cáncer no se forman tumores. La médula ósea sintetiza un número anormalmente alto de células blancas que son inmaduras y no funcionan adecuadamente. Esto dificulta la capacidad del organismo para mantener el suministro de oxígeno constante en todos los órganos y tejidos así como para distribuir adecuadamente los nutrientes.
- **Linfomas:** Son neoplasias propias del sistema linfático y en este grupo cabe distinguir entre linfoma de Hodgkin (LH) y linfoma no-Hodgkin (LNH). En ambos casos se ve afectada la capacidad del organismo para combatir infecciones.
- **Mielomas:** Constituyen un tipo de cáncer que afecta a aquellas células plasmáticas que forman parte del sistema inmune. Estas células plasmáticas neoplásicas se dividen de manera descontrolada y acumulan en la médula ósea, donde generan anticuerpos aberrantes.
- **Cánceres de Piel:** Los melanocitos son un tipo celular que se encuentra en la epidermis y cuya función principal es producir melanina, un pigmento que da color a la piel, los ojos y el pelo. Los cánceres de piel suelen dividirse en dos grandes sub-grupos: melanoma y no-melanoma. El melanoma es el cáncer de piel más agresivo, debido a que puede extenderse a otras partes del cuerpo originando metástasis.
- **Cánceres del Sistema Nervioso Central:** Se trata de tumores de cerebro o médula espinal. La clase más común de cáncer del sistema nervioso central es el glioma, que es un tumor generalmente benigno y de crecimiento muy lento.

2. 1. 3. Epidemiología

El cáncer es un trastorno de incidencia global que constituye una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todas las regiones del mundo (Figura 2). Durante los últimos años, el número de casos de esta dolencia se ha visto significativamente incrementado, sobre todo en los países desarrollados, donde se posiciona como la principal causa de muerte. Se estima que en 2020 fueron diagnosticados unos 19,3 millones de nuevos casos y se contabilizaron casi 10 millones de muertes asociadas (12). En cuanto a las previsiones para 2021, la American Cancer Society esperaba que la cifra de nuevos diagnósticos ascendiera a los 1,89 millones sólo en Estados Unidos, de los cuales 106.110 se corresponderían con tumores de tipo melanoma (13). Así mismo, GLOBOCAN ha estimado que se diagnosticarán aproximadamente 30,2 millones de nuevos casos de esta enfermedad para 2040 (14).

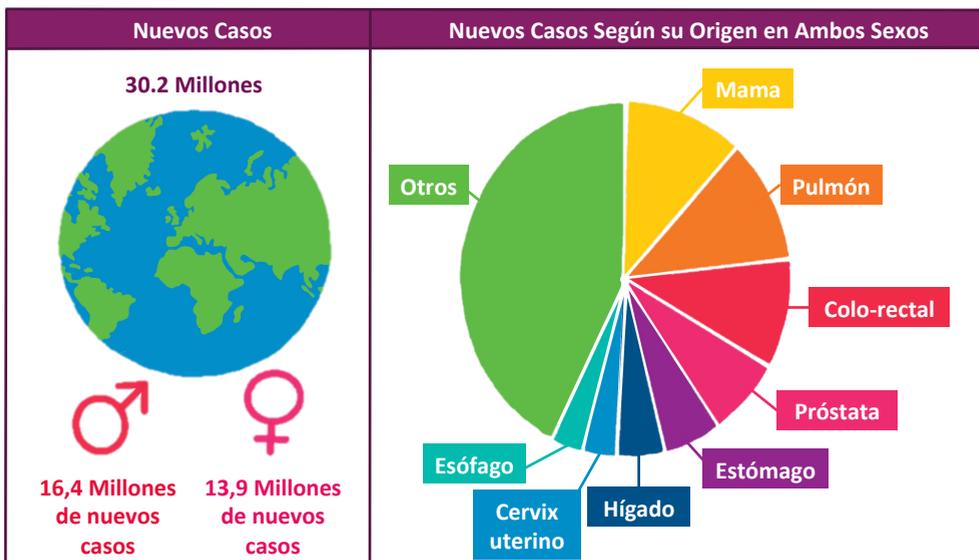


Figura 2. Proyección Estimada de la Incidencia y Mortalidad de los Nuevos Casos de Cáncer a Nivel Mundial para el 2025. La Organización Mundial de la Salud estima una media de 19,3 millones de nuevos casos de cáncer, con 9,95 millones de muertes asociadas. Los tipos tumorales más comunes serán: cáncer de pulmón, colon y próstata en el caso de los hombres, y de pulmón, colon y mama en el de las mujeres.

En España se estimó que habría más de 276.000 nuevos casos diagnosticados durante 2021, de los cuales 159.000 aparecerían en hombres y 117.000 en mujeres. El cáncer de colon sería, según este

modelo, el tipo tumoral que presentaría una mayor incidencia (43.000 nuevos casos) seguido por el cáncer de próstata (35.800 nuevos casos) y el de mama (33.400 nuevos casos) (15).

Gracias a los avances efectuados durante las últimas décadas en el conocimiento de la etiología del cáncer y el progreso en la detección temprana, el tratamiento y la prevención de esta enfermedad, se ha conseguido disminuir notablemente la mortalidad (especialmente en países industrializados). Sin embargo, y a pesar de estos notables adelantos, la incidencia continúa aumentando. Se considera que este fenómeno se encuentra íntimamente relacionado tanto con el aumento en la esperanza de vida como al impacto de los cambios en los hábitos de vida.

2. 1. 4. Etiología

Una célula tumoral se origina por la acumulación de cambios o mutaciones en su ADN. Por consiguiente, cualquier agente que provoque daño al material genético puede considerarse cancerígeno. A ello se añade que también se han encontrado evidencias de mutaciones genéticas que pueden transmitirse a la descendencia y que predisponen a padecer ciertos tipos de cáncer (Tabla 1).

Desde la primera mitad del siglo XX la comunidad científica se ha esforzado en establecer y categorizar los principales factores que intervienen en el desarrollo de un tumor. Actualmente estos factores de riesgo se dividen en función de su naturaleza biológica y de su inevitabilidad (16). Así nos encontramos con la siguiente clasificación:

- **Factores Intrínsecos:** Alteraciones durante la replicación del ADN. A mayor esperanza de vida, mayor probabilidad de que en algún momento de la existencia del individuo se produzca un error de este tipo.
- **Factores Extrínsecos:** En esta categoría encontramos factores exógenos (agentes carcinógenos y oncovirus), hábitos de vida (dieta, actividad física, tratamientos hormonales, tabaco) y factores endógenos parcialmente modificables (sistema inmune, metabolismo, niveles hormonales, etc.).

Por su naturaleza, los factores de tipo intrínseco deberían asociarse a una incidencia constante entre las distintas poblaciones, ya que las tasas de mutación no varían dentro de los individuos de una misma especie, mientras que los factores extrínsecos están ligados al ambiente y forma de vida de cada sujeto.

Tabla 1. Tipos de Factores de Riesgo para el Desarrollo del Cáncer.

Factores de Riesgo Intrínsecos	Factores de Riesgo Extrínsecos	
	Endógenos	Exógenos
Errores aleatorios durante la replicación del ADN	Envejecimiento celular	Radiación
	Susceptibilidad genética	Carcinógenos
	Reparación del ADN	Oncovirus
	Hormonas	Malos hábitos de vida
	Factores de crecimiento	
	Inflamación	
No modificables	Parcialmente modificables	Modificables

Los factores de riesgo para el desarrollo de un tumor pueden dividirse en dos grandes categorías: factores intrínsecos (no modificables) y factores extrínsecos (modificables o parcialmente modificables). Los primeros derivan de los errores aleatorios en la replicación del ADN dentro del propio individuo, mientras que los segundos pueden tener naturaleza exógena o endógena y se relacionan con los cambios epigenéticos derivados de las condiciones ambientales y los hábitos de vida.

Actualmente existe un debate a cerca de la importancia de cada uno de estos factores en el desarrollo de cáncer. Diversos estudios sugieren que los factores ambientales, como el humo del tabaco, la exposición a la luz ultravioleta o una dieta rica en grasas, contribuyen hasta un 90% en el cómputo de las probabilidades que tiene un individuo de desarrollar cáncer a lo largo de su vida (17). Sin embargo otras investigaciones sugieren que solo puede atribuirse hasta un tercio la influencia de este tipo de factores en la incidencia de esta enfermedad, estableciendo que la mayoría de casos se deben a las mutaciones aleatorias durante la replicación del ADN (18).

2. 1. 5. Características Distintivas de las Células Cancerosas

En una investigación publicada en el año 2000, Hanahan y Weinberg propusieron un modelo que definía las seis características principales de una célula tumoral: potencial replicativo ilimitado, independencia de

señales de crecimiento, insensibilidad a inhibidores del crecimiento, evasión de la apoptosis, angiogénesis mantenida y capacidad de invasión y metástasis (19). Una década más tarde (Figura 3), los mismos autores añadieron cuatro nuevas características: reprogramación del metabolismo energético, evasión del sistema inmune, inflamación e inestabilidad genómica y mutación (20).

- 1. Inmortalidad Replicativa:** La propiedad más esencial para que una célula sea considerada tumoral es su potencial ilimitado de replicación. Las células humanas no patogénicas tienen una media de 50 duplicaciones antes de entrar en senescencia. En contraste, las células cancerosas se dividen un número infinito de veces, por lo que se las considera inmortales. Los telómeros son secuencias de nucleótidos repetitivos en las extremidades más distales de los cromosomas y se acortan con cada división celular. Cuando la longitud del telómeros llega a un punto lo suficientemente bajo, la célula no se dividirá más. La célula tumoral consigue evitar el acortamiento de los telómeros manteniendo unas concentraciones altas de telomerasa, una enzima clave en el mantenimiento de los telómeros y cuya función es evitar este envejecimiento celular (21).
- 2. Independencia de Señales de Crecimiento:** Las maquinaria para que una célula crezca y se divida se pone en marcha mediante la unión específica de factores de crecimiento a sus receptores en la superficie celular. Esto normalmente conlleva una unión reversible mediante la fosforilación de residuos de serina, treonina o algún tipo de aminoácido del receptor. Este cambio molecular actúa como interruptor para la señalización *downstream* de distintas enzimas efectoras y segundos mensajeros, que finalmente provocan la activación de factores de transcripción en un proceso denominado transducción de la señal. Esta cascada de señalización permite amplificar el estímulo inicial. Las células cancerígenas son autosuficientes en este sentido, ya que no dependen de la presencia de estos factores de crecimiento extracelulares para crecer y multiplicarse (22). Se sabe que algunos oncogenes actúan modificando este proceso de transducción de la señal, bien generando sus propios factores de crecimiento (por ejemplo, el glioblastoma produce PDGF), aumentando la cantidad de receptores de superficie para ellos (los tumores mamarios pueden sobreexpresar EGFR/erbB) o por la mutación de alguno de los componentes moleculares implicados en la cascada de señalización,

que provoca la activación constitutiva de la vía (mutaciones de Ras en cáncer de pulmón)

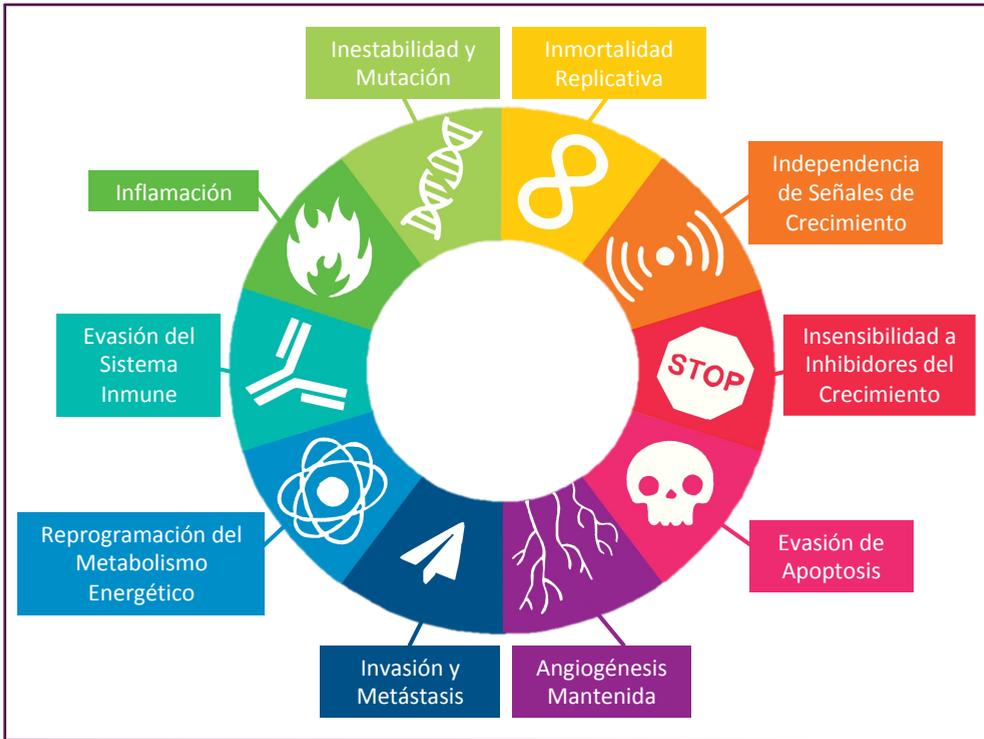


Figura 3. Características del Cáncer. Este gráfico ilustra las 10 características esenciales de las células cancerígenas, que se establecieron para intentar estructurar y clasificar las propiedades tumorales y mejorar así la comprensión del cáncer.

3. Insensibilidad a Inhibidores del Crecimiento: Los procesos de crecimiento, diferenciación, senescencia y muerte están controlados por el ciclo celular. Las señales antiproliferativas pueden encontrarse en forma de inhibidores del crecimiento solubles o fijados en la matriz extracelular y son especialmente importantes en la transición de la fase G_1 hacia la S. Las células cancerosas tienen la capacidad de ignorar a este tipo de molécula inhibidora, lo que les permite avanzar por el ciclo celular y replicarse indefinidamente. Las moléculas con actividad quinasa son un pilar esencial para esta maquinaria, junto con la activación/desactivación de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y la acción de los inhibidores del sistema CDK o CKIs (Figura 4) (23). Los genes supresores de tumores son esenciales para la correcta reparación del ADN, ralentizar la división celular e inducir la muerte celular por apoptosis. Se han identificado docenas de este tipo de genes y se

conoce que su expresión deficiente o inexistente puede causar cáncer. Un ejemplo de esta clase de gen es el TP53, localizado en el cromosoma 17 y que codifica la proteína p53, con diversas funciones anti-tumorales: prevenir la progresión del ciclo celular de la fase G₁ a la S, puede aumentar la transcripción de genes que codifican para proteínas reparadoras del ADN o inducir la apoptosis cuando el ADN se encuentra demasiado dañado para su reparación. Otro tipo importante de inhibición del crecimiento en células eucariotas es la derivada del contacto célula-célula, que en situación normal previene la división en áreas con una densidad celular alta. Los principales genes implicados en este mecanismo son NF2 y LKB1, que suelen encontrarse silenciados o se expresan ineficientemente en tumores (24).

- 4. Evasión de Apoptosis:** Kerr, Wyllie y Curie utilizaron en 1972 el término apoptosis por primera vez en una publicación científica y desde entonces se ha utilizado para describir un tipo concreto de mecanismo de muerte celular (25). La apoptosis es una secuencia preprogramada de suicidio celular que comienza con la condensación de orgánulos y la hinchazón del retículo endoplásmico. La membrana celular se mantiene intacta excepto en aquellos lugares donde se formarán los cuerpos apoptóticos que serán fagocitados. Es un tipo de muerte que no va asociada a niveles elevados de respuesta autoinmune o inflamación. Entre las moléculas que regulan la apoptosis, la familia de las BCL-2 es una de las más importantes y contiene tanto miembros con actividad pro-apoptótica (como BAX) como anti-apoptótica (como BCL-2). En las células de los mamíferos hay dos formas principales distintas por las que puede comenzar el proceso apoptótico: por estímulos intracelulares o por estímulos extracelulares. En los primeros, el ADN dañado provoca que p53 comience la activación de miembros pro-apoptóticos de la familia de BCL-2, esto conduce a la liberación de citocromo c desde la mitocondria que activará la vía de las caspasas. En el caso de los estímulos extracelulares, la unión de un ligando extracelular con su receptor de muerte celular asociado, localizado en la superficie de la célula, conduce a la formación y activación de un complejo citoplasmático capaz de activar por sí mismo la cascada de activación de las caspasas. La apoptosis es un proceso fisiológico fundamental que, desde las primeras fases del desarrollo embrionario, permite la renovación y remodelación de tejidos y la eliminación de células anormales, manteniendo un equilibrio homeostático entre la proliferación y la muerte. Las células neoplásicas tienen la capacidad de

evadir procesos apoptóticos, gracias a que presentan mutaciones en genes relacionados con las vías de señalización de las caspasas, BCL-2 y p53, entre otras (26,27).

- 5. Angiogénesis Mantenido:** Tanto los tejidos sanos como los neoplásicos requieren de un suministro constante de nutrientes y oxígeno. Para que un tumor crezca más de 0,4 mm de diámetro necesitará la formación de nuevos vasos sanguíneos. Los tumores poseen la capacidad de favorecer esta formación de vasos sanguíneos mediante la producción de factores angiogénicos. La angiogénesis en tejidos normales está regulada por el equilibrio entre factores angiogénicos promotores (como VEGF-A, FGF o TGF- α y TGF- β) e inhibidores (TIMP-1 o PAI-1). Los tumores presentan con frecuencia mutaciones que aumentan la producción de factores angiogénicos, la cantidad de receptores de membrana para ellos y/o alteraciones del ADN que favorecen la insensibilidad hacia señales inhibidores de la angiogénesis (28, 29).
- 6. Capacidad de invasión y metástasis:** la capacidad que exhibe un tejido neoplásico para invadir otros tejidos y metastatizar constituye la característica histopatológica fundamental para discernir entre un tumor benigno y uno maligno. Es sabido que este proceso invasivo consta de diferentes pasos secuenciales, también denominados "cascada metastásica". Estas fases comprenderían las siguientes etapas: invasión a través de la matriz extracelular (MEC), llegada de células tumorales a la circulación sanguínea o linfática, supervivencia al transporte, penetración hacia el tejido parenquimático del nuevo órgano, supervivencia en el nuevo nicho celular, cambios oncogénicos en el nuevo microambiente y formación de nuevos tumores y metástasis clínicamente relevantes (colonización). Las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular juegan un papel fundamental en este tipo de procesos de migración celular, que están regulados de manera principal por moléculas de adhesión como las cadherinas, las inmunoglobulinas y las integrinas. Alteraciones en estas moléculas o en sus vías de señalización son comunes en células tumorales con capacidad metastásica (30, 31).

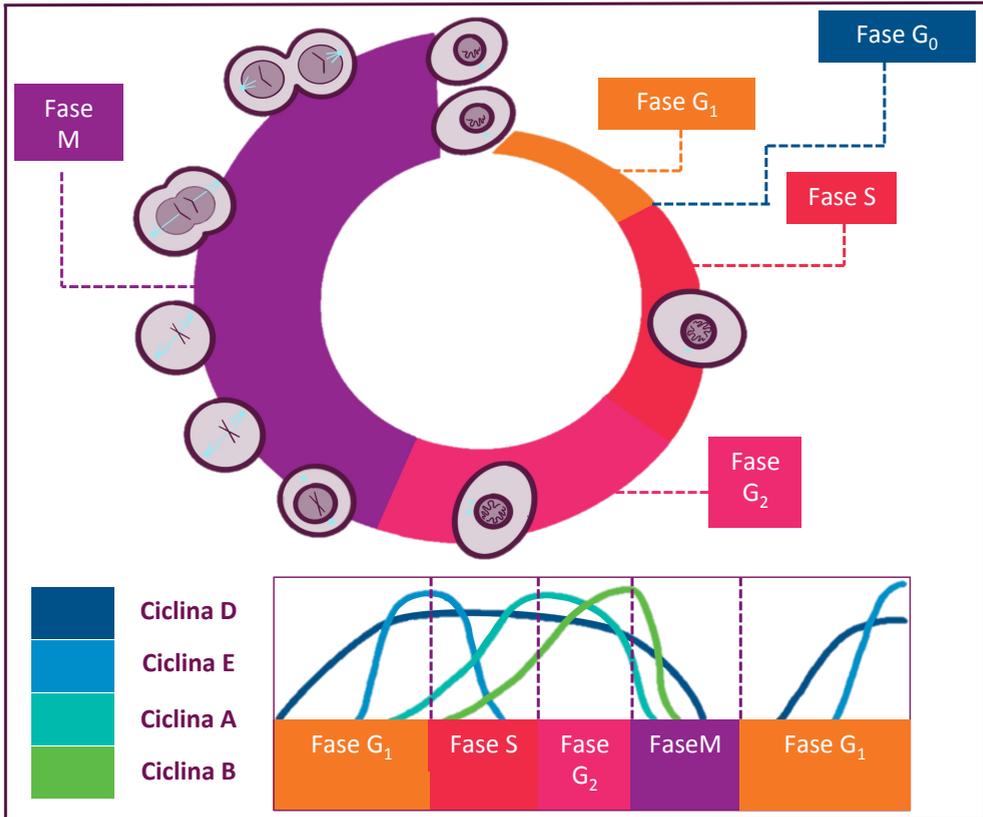


Figura 4. Fases del Ciclo Celular. Dentro del ciclo celular se distinguen cinco fases distintas. (I) Fase G₀, también llamada fase de Quiescencia: las células normales dejan de dividirse cuando se dan demasiados contactos célula-célula o cuando no hay factores de crecimiento en el medio. La mayoría de células de los tejidos adultos se encuentran en esta fase inactiva del ciclo. (II) Fase G₁: dura de 10 a 14 horas y es la fase previa a la síntesis de ADN. Tanto las células en fase G₀ como G₁ son sensibles a la presencia de factores de crecimiento, pero una vez comienza la fase S, la célula se centrará únicamente en sintetizar ADN. (III) Fase S: dura entre 3 y 6 horas y es en esta fase en la que la célula pasa a ser diploide. (IV) Fase G₂: dura entre 2 y 4 horas y es la fase que se encuentra entre la síntesis de ADN y la mitosis. (V) Fase M: dura aproximadamente una hora y en ella se producen los últimos cambios para poder completar el ciclo celular.

7. Reprogramación del metabolismo energético: Las células cancerosas han sufrido un proceso de selección natural que facilita la aparición de mutaciones que favorecen la adaptación del metabolismo energético para compensar su alta tasa de multiplicación. Normalmente, las células sanas emplean la fosforilación oxidativa (formación de ATP a partir de la fosforilación del ADP, utilizando la energía obtenida de la cadena de transporte electrónico) que permite generar la energía necesaria para la realización de sus funciones. En contraste, las células

neoplásicas tienden a depender mayoritariamente de la glicólisis aeróbica (mucho menos efectiva en cuanto a la cantidad de moléculas totales de ATP que puede producir). Este cambio fundamental del metabolismo se conoce como efecto Warburg (32).

8. **Evasión del sistema inmune:** La “inmunoedición del cáncer” es la manera que tienen las células tumorales de escapar del sistema inmune para no ser eliminadas. En tejidos normales, además de responder a infecciones, el sistema inmune monitoriza el estado general de las células del organismo y es capaz de reconocer y eliminar una gran cantidad de células cancerígenas. Por esta razón, las células neoplásicas que se desarrollan hasta formar un tumor se considera que poseen algún tipo de ventaja evolutiva que les ha permitido evitar su detección y consecuente erradicación (33).
9. **Inflamación:** La inflamación puede definirse como la respuesta natural del cuerpo ante estímulos potencialmente dañinos y su objetivo es neutralizar y eliminar amenazas externas (patógenos, agentes tóxicos, etc) e internas (células anormales), así como favorecer el proceso de recuperación o regeneración tisular. Esta respuesta al daño está caracterizada por provocar hinchazón, aumento de temperatura, dolor, pérdida de la función del tejido afectado y actividad inmune a nivel local. Desde hace mucho tiempo se conoce que el microambiente tumoral constituye un medio rico en componentes inflamatorios, emulando el entorno de tejidos sanos inflamados. Hoy en día se reconoce que aproximadamente un 25% de los tumores diagnosticados están ligados a una inflamación crónica o infecciones de tipo viral o bacterianas y que existe una relación directa entre la inflamación sostenida de un órgano o tejido con el desarrollo de varias patologías, entre las que encontramos la fibrosis o el cáncer (34).
10. **Inestabilidad genómica y mutación:** Los daños en el ADN o la aparición de mutaciones provocan la detención de la progresión del ciclo celular, seguida de la reparación del material genético o la apoptosis. Se trata de un suceso aleatorio cuya probabilidad de ocurrir aumenta con cada división celular. Igualmente, la exposición a factores genotóxicos endógenos (como las especies reactivas del oxígeno) o exógenos (luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, etc) aumentan el riesgo de que aparezcan anomalías durante la replicación del ADN. Las células cancerígenas presentan interferencias en este proceso de reparación o

muerte, ya sea por deficiencias en el reconocimiento del ADN alterado, en su capacidad para repararlo, en los procesos implicados en la ejecución de la apoptosis o en la propia maquinaria de regulación del ciclo celular. Esta falta de mecanismos de control en la acumulación de errores genéticos y anormalidades en el ADN se denomina “inestabilidad genética” (35) y permite en última instancia la adquisición de las demás características propias de una célula neoplásica. En los cánceres hereditarios, la inestabilidad genómica es el resultado de una o más mutaciones en genes con funciones relacionadas con la reparación del ADN o con potencial para convertirse en oncogenes (proto-oncogenes). Por otra parte, en el caso de los cánceres esporádicos o no hereditarios, el mecanismo subyacente que deriva en la aparición de un genotipo cancerígeno no está todavía claro, pero existen dos hipótesis principales sobre el evento iniciador: por la pérdida de la función de un gen anti-oncogénico o por la generación de oncogenes debido al estrés replicativo (36).

2. 2. MELANOMA

2. 2. 1. La Piel

El órgano de mayor extensión del cuerpo humano es la piel y supone un 15% del peso total de un adulto. Su función principal es la de actuar como barrera contra agentes físicos, biológicos o químicos potencialmente nocivos, pero también previene la pérdida excesiva de agua y ayuda en la termo-regulación. La piel se compone de tres capas: epidermis, dermis y tejido subcutáneo.

La capa más externa es la epidermis, que contiene tres tipos principales de células:

- **Células escamosas:** Son células planas que se agrupan formando una capa compacta, constituyendo la primera barrera de la piel y el estrato más grueso de la epidermis. Debido a su desgaste por la exposición al medio ambiente, se trata de células que se desprenden constantemente al morir para dejar paso a una nueva generación de células escamosas.
- **Células basales:** Estas tienen forma de bloque, se multiplican constantemente y se encuentran en la zona inferior de la epidermis. A medida que maduran, ascienden por la epidermis mientras van adquiriendo una forma aplanada, hasta que se transforman en células escamosas.
- **Melanocitos:** Se localizan entre las células basales y su función principal es la de producir melanina, un pigmento oscuro responsable de la coloración de la piel. Cuando se exponen a la radiación UV, los melanocitos sintetizan una mayor cantidad de melanina como mecanismo de protección ante este tipo de agresión física, en un intento de evitar que la piel se queme. Los melanocitos pueden formar puntos oscuros en la piel llamados lunares o nevus y la mayoría son de carácter benigno.

La capa intermedia es la dermis, rica en colágeno, que es la molécula principal en el mantenimiento de la arquitectura tisular de la piel. En esta capa encontramos gran cantidad de tejido fibroso y elástico, así como

folículos capilares, glándulas sudoríparas, nervios y vasos sanguíneos y linfáticos.

La hipodermis, también llamada tejido subcutáneo, es la capa más interna de la piel y está compuesta principalmente por células grasas y tejido conjuntivo. Su función esencial es la de proporcionar protección a los órganos internos frente a los cambios de temperatura exterior.

2. 2. 2. Características Generales del Melanoma

El melanoma es un tipo de cáncer de piel que se origina cuando ocurren cambios neoplásicos malignos en los melanocitos. Debido a que los melanocitos derivan de la cresta neural (parte del neuroectodermo), es común que las células del melanoma tiendan a migrar hacia localizaciones propias de estos antecesores celulares, como el tracto gastrointestinal o el cerebro. Se trata por tanto de tumores potencialmente mortales si no se tratan, debido a la facilidad con la que metastatizan. Hay que destacar que la supervivencia relativa a los 5 años para pacientes diagnosticados con melanoma en estadio 0 es del 97%, mientras que sólo llega al 10% cuando se trata de pacientes diagnosticados con melanoma en fase 4 (37). Estos datos remarcan la importancia de un diagnóstico temprano y el impacto de este sobre la supervivencia.

Existen cuatro tipos principales de melanoma, que se clasifican en función de su patrón de crecimiento:

- **Melanoma superficial:** Aproximadamente un 70% de los melanomas diagnosticados pertenecen a este tipo (38). Normalmente poseen una forma aplanada, que puede volverse irregular y elevada conforme pasa el tiempo. Son lesiones con un promedio de 2 mm de diámetro y de colores muy variados. El melanoma superficial normalmente aparece en el torso (hombres), en las piernas (mujeres) o en la parte superior de la espalda (ambos sexos).
- **Melanoma nodular:** Entre un 15% y un 30% de los casos de melanoma son nodulares (39). Es el segundo tipo más común de melanoma y tiende a crecer más rápidamente que los demás, por lo que es considerado un tumor especialmente agresivo. Suele tener una coloración negro-azulada o rojo-azulada y comúnmente aparece en zonas de la cabeza o el cuello.

- **Melanoma lentigo maligno:** Representa el 4-15% de los casos de melanoma y su aparición es más frecuente en mujeres y en personas de edad media o avanzada (40). Normalmente forma una mácula irregular de tonos parduzcos en zonas dañadas de manera crónica por el sol, como la cabeza o el cuello.
- **Melanoma lentiginoso acral:** Es un tipo de melanoma que afecta principalmente a poblaciones de piel oscura (8% de diagnósticos se vincula a poblaciones de piel clara frente a un 60% que se registra en poblaciones de piel oscura). Este tipo de melanoma se presenta con pigmentaciones pardas, azul-grisáceas o rojizas (41).

2. 2. 3. Epidemiología del Melanoma

La Agencia Internacional para la Investigación contra el Cáncer ha establecido que el melanoma fue el causante de 57.043 muertes en 2020 a nivel global y durante ese mismo año se diagnosticaron 324.635 nuevos casos (42). La mayor tasa de incidencia se da en Europa, con un 46,4% (150.627 casos), seguida por Estados Unidos, con un 32,4% (105.172 casos). La mayor tasa de mortalidad se encuentra en Europa (26.360 muertes), seguida por Asia (11.986 muertes) y Estados Unidos (8.412 muertes).

El cáncer de piel es la neoplasia más común en Estados Unidos, siendo el melanoma el subtipo cuya incidencia ha mostrado un mayor incremento durante los últimos años en poblaciones caucásicas. La Organización Americana contra el Cáncer estimó que en 2021 serían diagnosticados 106.110 nuevos casos sólo en dicho país, con 7.180 muertes asociadas (43).

La Sociedad Española de Oncología Médica estima en nuestro país una media de 6.108 nuevos casos de melanoma, de los cuales 2.430 serán hombres y 3.678 serán mujeres (44). Sólo de enero a mayo en 2020, la cifra de muertes derivadas de tumores de tipo melanoma fue de 473, con 277 defunciones en hombres y 196 en mujeres (45).

En Canarias, un estudio realizado en 2021 sobre la incidencia del melanoma entre 2007 y 2018 mostró que esta comunidad autónoma se encuentra muy por debajo de la media nacional y la media propia del sur de Europa a

pesar de la alta tasa de radiación ultravioleta que incide en este territorio (46).

2. 2. 4. Etiología

Actualmente se considera que el melanoma es una patología multifactorial, que surge por una combinación de factores genéticos y medioambientales. La circunstancia más determinante es la exposición a radiación ultravioleta (UV), que desencadena efectos genotóxicos; pero hay otras como el poseer un fototipo I, II o III (Tabla 2), padecer síndrome de nevus displásico familiar o presentar antecedentes familiares de melanoma (47), que también influyen en la probabilidad de desarrollar este tipo de cáncer de piel.

- **Género y edad:** Globalmente la incidencia del melanoma es mayor en hombres que en mujeres. La localización del tumor también varía en función del género, siendo más frecuente encontrar el melanoma en el tronco del hombre y en las extremidades inferiores de la mujer. Los mecanismos por los que se da esta disparidad en el desarrollo del melanoma en los distintos géneros no están claros, pero se cree que intervienen factores hormonales, inmunológicos y genéticos ligados al cromosoma X. En cuanto a la edad, el riesgo de desarrollar un melanoma se incrementa con el paso del tiempo, siendo la edad media de diagnóstico los 65 años, no obstante este es uno de los tumores más comunes en adultos jóvenes menores de 30 años (48,49).
- **Nevus:** Se considera que los lunares son tumores benignos pigmentados, pero una alta densidad de nevus en la piel de un individuo se relaciona con una mayor probabilidad de padecer melanoma (50). Otros factores importantes a valorar son la presencia de lunares atípicos (más grandes de lo normal o con formas irregulares o colores extraños) o de nacimiento (nevus congénitos melanocíticos).
- **Factores inmunológicos:** Un sistema inmunológico disminuido a causa de enfermedades como el VIH (virus de inmunodeficiencia humano) o tratamientos médicos como la quimioterapia, aumenta el riesgo de padecer cáncer (51).
- **Historial familiar:** La presencia de melanomas de manera recurrente en el historial familiar constituye un factor de riesgo de peso, ya que puede

indicar una causa genética subyacente. Diversos estudios genéticos han permitido conocer una variedad de genes que podrían aumentar la predisposición al desarrollo de melanoma y que también pueden utilizarse para identificar y clasificar las variantes hereditarias del melanoma. Algunos de ellos son: CDK2A, CDK4, TERT, BAP1, BRCA1, BRCA2, MITF, POT1 y ACD (52). Se estima que entre un 5 y un 10% de los nuevos casos diagnosticados de melanoma aparecen en individuos con familiares de primer grado con un diagnóstico histológico previamente confirmado para esta enfermedad (53), por lo que podrían considerarse tumores hereditarios.

Tabla 2. Escala Fitzpatrick.

Tipo de Piel	Quemaduras Solares	Facilidad de Bronceado	Características Típicas
I	Se quema siempre	Nunca se broncea	Ojos azules o verdes Pelo rubio o pelirrojo Pecas
II	Se quema con mucha frecuencia	Se broncea mínimamente	Ojos azules Pelo rubio
III	Se quema fácilmente	Se broncea gradualmente	Ojos oscuros Pelo rubio o castaño
IV	Se quema ocasionalmente	Se broncea con rapidez	Ojos oscuros Pelo castaño o negro
V	Casi nunca se quema	Se broncea rápida e intensamente	Ojos oscuros Pelo negro
VI	Nunca se quema	Siempre se broncea intensamente	Ojos oscuros Pelo negro

Los fototipos de Fitzpatrick conforman un sistema de clasificación numérico de la piel que fue desarrollado en 1972 con el objetivo de permitir seleccionar de manera adecuada la dosis óptima de luz ultravioleta para cada paciente en el tratamiento de la psoriasis. La escala original únicamente contaba con los fototipos del I al IV y fue en 1988 cuando se añadieron los tonos más oscuros (V y VI).

- Pigmentación de la piel:** Los fototipos de Fitzpatrick son una manera muy extendida de clasificar los tipos de piel en función de su reacción a la exposición solar. Puede usarse como herramienta para predecir el riesgo de padecer algún tipo de cáncer de piel, pero hay que tener en cuenta que no fue diseñada con ese propósito. Se trata de un cuestionario que

permite establecer, de manera subjetiva, cinco tipos de piel y que ha probado su utilidad diagnóstica y terapéutica desde 1972 (54-56).

- **Exposición a radiación UV:** Se considera que la exposición a la luz ultravioleta procedente del sol es la principal causa en el desarrollo de los cánceres de piel. Una exposición continuada a este tipo de radiación o el desarrollo de quemaduras solares son factores que aumentan la probabilidad de desarrollar melanoma (57).

2. 2. 5. Genética y Genómica del Melanoma

El melanoma es el causante del 80% de las muertes por cáncer de piel y esto suele deberse a la resistencia que presenta ante la mayoría de los tratamientos actualmente disponibles, razón por la cual es esencial la investigación en los mecanismos y vías de señalización implicados en su origen, desarrollo, metástasis y adquisición de resistencias (58, 59).

El uso del diagnóstico y la terapia molecular han permitido establecer subtipos dentro de este tipo de neoplasia, además de ayudar a descubrir nuevas variantes y facilitar la selección del tratamiento más oportuno para cada individuo (60-63).

La Comisión Conjunta Estadounidense para el Cáncer ha propuesto el sistema TNM, según el cual el melanoma se clasifica, como muchos otros tipos de cáncer, en función de las características histológicas que presenta el tumor. Sin embargo esta forma de clasificación puede considerarse subjetiva, puesto que está basada en la interpretación visual de una muestra. El uso de marcadores moleculares o la detección de ciertas alteraciones del genoma podría ayudar en este sentido a establecer nuevas guías terapéuticas o de decisión diagnóstica en función de características objetivas del tumor.

La tecnología de la secuenciación ha permitido establecer que el melanoma es uno de los cánceres más variables y genéticamente complejos. Este tipo de neoplasia puede contar con cientos de mutaciones, amplificaciones, deleciones, traslocaciones o cambios en la metilación del ADN dentro de un mismo tumor (64). La gran mayoría de estas lesiones genéticas se encuentran dentro de la categoría de mutaciones pasajeras, ya que no conducen de manera directa al desarrollo o progresión de un tumor ni son

indispensables para la supervivencia del mismo. Por otro lado, las mutaciones conductoras son aquellas que confieren una ventaja sobre la capacidad de supervivencia y que conducen a la transformación neoplásica. A nivel somático (Tabla 3) las mutaciones más comunes son las encontradas en BRAF, seguidas por las de NRAS y NF1 respectivamente (65-67).

Tabla 3. Genes con Relevancia Clínica comúnmente mutados en Melanoma.

Gen Mutado	Vía de Señalización Afectada	Incidencia
BRAF (V600E)	MAPK	40-60%
NRAS	MAPK, PI3K, RALGDS	15-30%
KIT	MAPK, PI3K	1-2%
GNAQ GNA11	MAPK	80-90% Melanoma uveal
TERT	Telomerasa	40-50%
CDK2A	Regulación p53	25-40% Melanoma familiar
PTEN	PI3K	4-8%

La mutación en el oncogén BRAF se diagnostica aproximadamente en la mitad de todos los melanomas diagnosticados, otras alteraciones genéticas frecuentes ocurren también en NRAS, CDK2A y NF1. Por otro lado, cambios en KIT son comunes en melanomas que se localizan en zonas no expuestas al sol, mientras que las mutaciones en los genes CDKN2A y ERCC son características de las lesiones de carácter hereditario.

1. **BRAF (Oncogén viral del sarcoma murino):** Codifica para la proteína B-Raf, que es una proteín-quinasa de serina/treonina (fosforila residuos de serina o treonina) esencial para la vía de señalización de MAPK/ERK. BRAF V600E es la mutación más común de BRAF, causa la activación constitutiva de la vía MAPK/ERK así como insensibilidad a los mecanismos de retroalimentación negativa, está implicada en la activación posterior de la vía MEK/ERK y también con procesos oncogénicos como la evasión de la senescencia y la apoptosis (Figura 5). Los tumores con BRAF mutado pueden tratarse con inhibidores específicos (vemurafenib, dabrafenib y encorafenib) en conjunción con inhibidores de MEK, como el trametinib, el cobimetinib o el binimetinib (68, 69).
2. **NRAS (Homólogo del oncogén viral del neuroblastoma RAS):** Fue el primer oncogén descubierto relacionado con el melanoma y aproximadamente un 20% de este tipo tumoral presenta mutaciones conductoras en este gen, siendo las más comunes las alteraciones

genéticas de tipo puntual en el codón 12 o 61 (70). Codifica para la proteína RAS, que forma parte de la familia de las GTPasas y puede encontrarse unida a GTP (isoforma activa) o a GDP (isoforma inactiva). En condiciones normales, las proteínas GAP se encargan de favorecer la transformación del GTP a GDP, con lo que facilitan el paso hacia la isoforma inactiva de Ras. En las formas oncogénicas mutantes, RAS es insensible a la actividad de las GAP, lo que conduce a una activación constitutiva de NRAS, que desencadena a su vez un descontrol en la maquinaria reguladora de la proliferación, facilitando la supervivencia de las células tumorales con este genotipo aberrante.

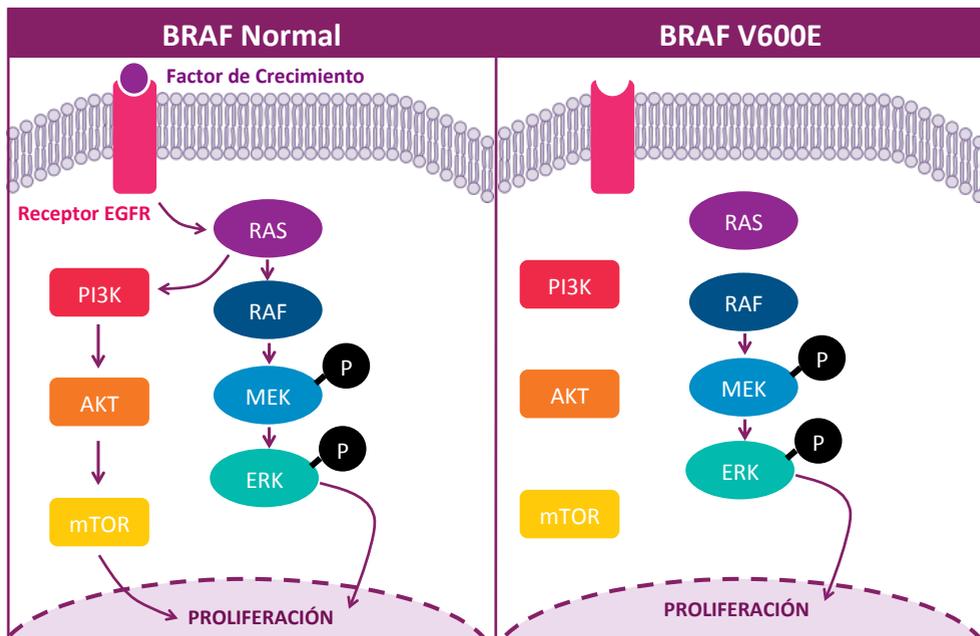


Figura 5. Comparación Entre Ruta de las MAPK en un Genotipo Normal vs el Genotipo BRAF V600E. La señalización de BRAF comienza típicamente con la unión de un factor de crecimiento a su receptor transmembrana correspondiente; seguidamente, RAS es activada por los dominios tirosina/quinasas de dicho receptor, gracias a lo cual será capaz de activar a RAF, que conducirá entonces a la activación de MEK y ERK. El efecto final es el aumento de la proliferación, la progresión del ciclo celular y la inhibición de la apoptosis. En el caso de la mutación V600E del gen BRAF, esta cascada de señalización se encuentra alterada, por lo que RAF no necesita la dimerización para realizar su función.

3. **NF1 (Neurofibromina 1):** Es un gen de la familia de los supresores de tumores que se localiza en el cromosoma 17 y que codifica para la proteína neurofibromina 1. Esta es una GTPasa que regula negativamente la vía de las MAPK, mediante la transformación del GTP unido a Ras en GDP.

En cuanto a las rutas de señalización (Figura 6), se ha comprobado que la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) juegan un papel fundamental en el desarrollo de melanoma (71, 72).

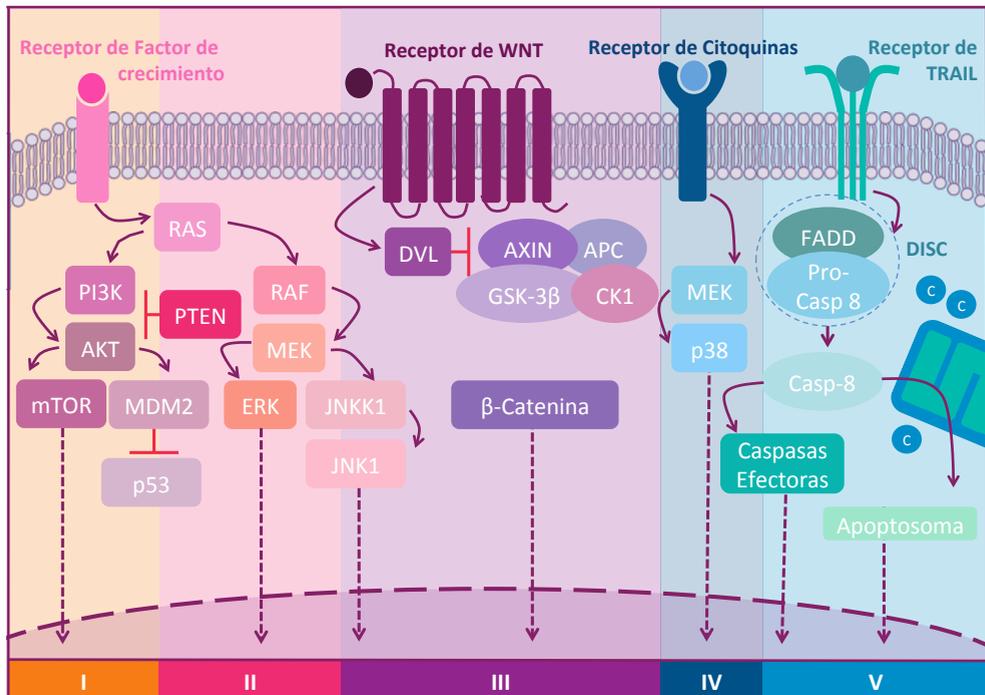


Figura 6. Principales Rutas de Señalización y Moléculas importantes en el Desarrollo del Melanoma. (I) Vía del PI3K: Distintos receptores de factores de crecimiento como c-Met o IGFR pueden activar la ruta de la PI3K. Esta molécula cataliza la transformación del PIP2 en PIP3, que actuará activando a PDK1, capaz de activar a su vez a distintos miembros de la familia de las AKT. AKT favorece la supervivencia celular al inducir la expresión o activación de proteínas relacionadas con la supervivencia (NF-κB, XIAP o mTOR) e inhibir proteínas o factores de transcripción relacionados con la muerte celular (BAD, BAX, BIM, FOXO). AKT también promueve la progresión del ciclo celular bloqueando inhibidores de dicha progresión y potencia la actividad de moléculas señalizadoras como la ciclina D o MYC. Las células del melanoma muestran una activación constitutiva de esta vía. (II) Vía de las MAPK: Los receptores de diversos factores de crecimiento (como c-KIT, IGFR o WNT) generan señales al unir su ligando, que son amplificadas por moléculas adaptadoras como GRB-SOS y reclutan distintos miembros de la familia de las proteínas RAS, que activarán a su vez a otras quinasas como Raf o MEKK. La sub-familia de las B-Raf puede también activar factores como MEK, por lo que la cascada JNKK1-JNK1 se ve favorecida y, junto con ERK, provocará cambios a nivel transcripcional. En el caso del melanoma, la ruta de las MAPK se encuentra comúnmente constitutivamente activada. (III) Vía del WNT: la unión de WNT a su receptor conduce a la inactivación de GSK-3β, lo que impide la degradación de la β-catenina, que se transportará al núcleo y participará en procesos de regulación de la transcripción de genes relacionados con la proliferación, diferenciación y migración celular. Se trata por tanto de una ruta importante y activada en el melanoma. (IV) Citoquinas: diversas citoquinas pro-inflamatorias (como el TNFα o la IL-1) desempeñan un papel

fundamental en los procesos de inflamación y tumorigénesis. Eventualmente estas moléculas son capaces de activar una variedad de receptores moleculares, cuya cascada de señalización asociada converge en la activación de proteínas como MEK, JNK, p38 e I κ B. Estas rutas de señalización también se encuentran activadas por encima de los niveles normales en el caso del melanoma. (V) TRAIL: el ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral es un potente agente inductor de la apoptosis extrínseca que interactúa con receptores de muerte celular como DR4 y DR5. Está íntimamente relacionado con la formación del complejo DISC y la cascada de señalización de las caspasas. Las proteínas antagonistas como c-FLIP actúan como inhibidores competitivos para las caspasas 8 y 10 y pueden también unirse al complejo DISC para evitar la activación de otras caspasas. La mayoría de melanomas presentan una expresión conjunta de ambos tipos de receptores para TRAIL (DR4 y DR5), pero muestran comúnmente una resistencia a TRAIL, por lo que la ruta se encuentra expresada por debajo de los niveles normales.

2. 3. TRATAMIENTOS

2. 3. 1. Perspectiva General

La primera evidencia escrita sobre el melanoma la proporcionó Hipócrates de Cos en el siglo V antes de Cristo, que es considerado uno de los padres de la medicina occidental, junto con Galeno. Desde entonces, el esfuerzo conjunto de la comunidad científica ha permitido ofrecer una amplia variedad de opciones en el tratamiento de esta enfermedad (73-75).

1. **Resección quirúrgica:** Se considera que la primera resección quirúrgica de un melanoma tuvo lugar en 1787 y fue realizada por John Hunter. Actualmente la resección quirúrgica sigue siendo la opción principal de tratamiento para la mayoría de melanomas y generalmente es el único tratamiento necesario para eliminar esta neoplasia en estadios tempranos.
2. **Terapia sistémica:** Se trata de tratamientos que afectan a la totalidad del organismo del individuo. Dentro de estos métodos se encuentra la quimioterapia (forma más común de terapia sistémica), la terapia hormonal, la inmunoterapia y las terapias dirigidas.
3. **Radioterapia:** En pacientes de pronóstico adverso o en aquellos donde la resección quirúrgica no supone una opción plausible, la radioterapia puede servir como opción alternativa ya que puede ser efectiva y relativamente segura tanto para eliminar la enfermedad como para la orientación paliativa.
4. **Terapias adyuvantes:** Son un tipo de tratamiento que suele reservarse para pacientes en grado III o IV y normalmente se aplica de manera posterior a la resección quirúrgica del tumor. Estas terapias pueden incluir uno o más fármacos distintos, algunos de los cuales son: interferón, anticuerpos anti-CLTA o anti-PD1, inhibidores selectivos de la vía de las MAPK o agentes anti-angiogénicos.

2. 3. 2. Fitoquímicos

Los fitoquímicos se definen como nutrientes vegetales bioactivos que se encuentran en frutas, verduras, cereales o plantas y proporcionan efectos beneficiosos para el ser humano. Muchos son polifenoles (compuestos hidrosolubles responsables del color de algunas frutas, flores y vegetales) que se caracterizan por ser potentes antioxidantes (76, 77). Los antioxidantes son a su vez sustancias con la capacidad de prevenir o retrasar el daño celular provocado por los radicales libres. Estas moléculas altamente inestables, derivadas del metabolismo mitocondrial normal, en altas concentraciones pueden desencadenar un proceso llamado estrés oxidativo, que es perjudicial para el buen funcionamiento de la célula. Normalmente los fitoquímicos se dividen en seis familias, en función de su estructura química y sus efectos biológicos.

1. **Terpenos:** Sus capacidades como antiinflamatorios, antioxidantes, antibacterianos, quimiopreventivos y gastroprotectores han favorecido el estudio de los terpenos como moléculas de interés farmacológico (78). Se trata de la familia de fitoquímicos más grande y son compuestos aromáticos responsables de la fragancia de muchas flores, frutas, semillas y raíces. La estructura básica de los terpenos deriva del isopreno y generalmente se encuentran formados por la unión de dos, tres, cuatro o seis unidades isopreno (monoterpenos, sesquiterpenos diterpenos y triterpenos). Los carotenoides forman el grupo de los tetraterpenos (79).
2. **Carotenoides:** Existen más de 1.000 tipos de carotenoides en la naturaleza y son los responsables del color amarillo, naranja y rojo en varios organismos animales y vegetales (80). En las plantas, los carotenoides ayudan a absorber la luz en el aparato fotosintético a la vez que lo protegen frente a la foto-oxidación. Algunos animales tienen la capacidad de sintetizar *de novo* sus propios carotenoides, pero la mayoría dependen de su absorción mediante la dieta (81). En humanos, diversos estudios sobre los carotenoides han demostrado su potencial terapéutico como antioxidantes, anticancerígenos, antidiabéticos, antiinflamatorios y de protección frente a la degeneración neuronal (82). Se descubrieron durante el siglo XIX y su estructura química general está formada por una cadena de 40 carbonos con enlaces dobles conjugados (83).

- 3. Alcaloides:** Su nombre deriva de la capacidad natural que poseen estos compuestos nitrogenados para reaccionar como bases. Los alcaloides conforman un grupo heterogéneo sin estructura definida y con una elevada diversidad de efectos a nivel biológico. De esta forma encontramos alcaloides tóxicos para el ser humano, como la muscarina producida por el hongo *Amanita muscaria*, y otros con aplicaciones sanitarias, como la morfina (84).
- 4. Fitoesteroles:** Son esteroides que únicamente las plantas pueden sintetizar y su función es análoga a la del colesterol en el ser humano. Los que consumimos con mayor frecuencia son el sitosterol, el campesterol y el estigmasterol. Algunos de los miembros de este grupo presentan propiedades beneficiosas para la salud, entre las que cabe destacar las siguientes: ayudar a reducir los niveles de colesterol en sangre, propiciar una relativa protección frente al desarrollo de cáncer, y mejorar el estado general de la piel (85).
- 5. Saponinas:** Su nombre se debe a la capacidad que tienen este tipo de fitoquímicos para generar espuma, similar a la de los compuestos jabonosos. Son moléculas glicosídicas que presentan un esqueleto triterpénico o de tipo esteroide (86). Tienen un interés principalmente industrial y cosmético, aunque algunas saponinas manifiestan también propiedades que tienen aplicaciones para el ámbito sanitario y farmacológico, formando parte de la medicina tradicional de diversas culturas (87).
- 6. Fenoles:** Es uno de los grupos más variados de fitoquímicos en la naturaleza y su estructura común consiste en un anillo bencénico con un grupo hidroxilo sustituyendo a uno de sus átomos de hidrógeno (88). Dentro de este grupo encontramos, por ejemplo, a las antocianinas, los taninos, los polifenoles o los flavonoides. Actualmente se conocen más de 8.000 compuestos fenólicos, de los cuales alrededor de 4.000 son flavonoides (89, 90).

2. 4. FLAVONOIDES

2. 4.1. Propiedades

Los flavonoides son metabolitos secundarios bioactivos de tipo polifenólico y de origen vegetal con propiedades potencialmente aplicables a la prevención y tratamiento del cáncer (91). Estos han demostrado ser capaces de modular las enzimas implicadas en la neutralización de las especies reactivas del oxígeno, asimismo ayudan a mantener una correcta progresión del ciclo celular favoreciendo una regulación negativa del mismo, también inducen mecanismos de muerte celular como la apoptosis y la autofagia y además obstaculizan la proliferación y la capacidad de metástasis de las células neoplásicas (92).

Los flavonoides se suelen administrar de manera oral, bien en la dieta o mediante suplementos alimenticios (Figura 7), por lo que pueden ser susceptibles a cambios en su eficacia, actividad y absorción a causa de los procesos digestivos normales (93-95).

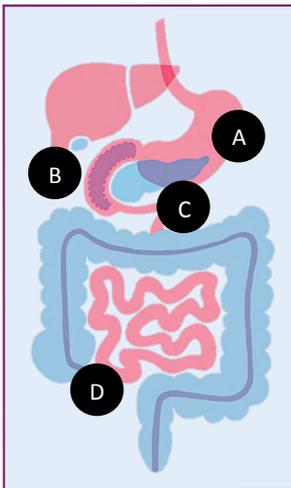


Figura 7. Biodisponibilidad de Flavonoides e Interacción con el Sistema Digestivo. (A) La presencia de un alto contenido en proteínas disminuye la digestibilidad de los flavonoides, lo que disminuye a su vez su capacidad como antioxidantes y dificulta su posterior absorción. (B) La ingestión combinada de flavonoides y grasas ayuda a incrementar la biodisponibilidad de este tipo de compuesto fitoquímico mediante la estimulación de la secreción de sales biliares. (C) Las escasas bacterias del intestino delgado son esenciales en la metabolización de los flavonoides debido a que son capaces de hidrolizar los flavonoides glicosilados, facilitando su absorción y metabolización. (D) Los flavonoides no absorbidos por el intestino delgado alcanzan el intestino grueso, donde la microflora descompone su estructura en fragmentos capaces de pasar al torrente sanguíneo.

2. 4. 2. Interacción con las Vías de la Apoptosis

Las células cancerígenas son resistentes a la apoptosis, que es un tipo de muerte celular programada inducida por un conjunto de moléculas

señalizadoras, siendo las más importantes las caspasas y la familia de las proteínas BCL-2 (Figura 8).

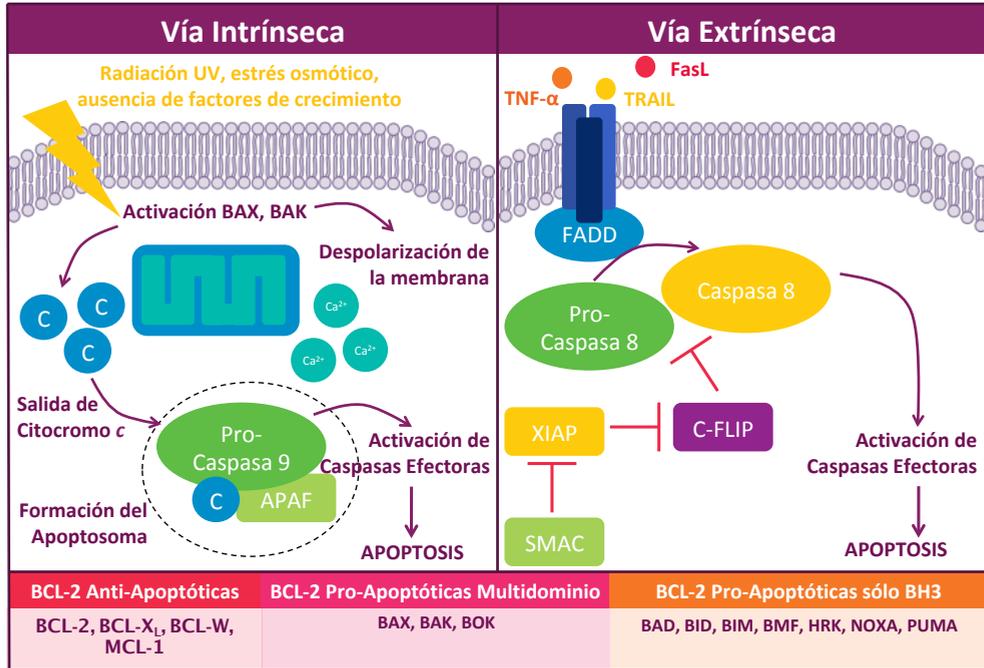


Figura 8. Vías de Activación de la Apoptosis. La vía extrínseca está regulada por factores de señalización que interaccionan con receptores de tipo TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor). La unión ligando-receptor activa proteínas adaptadoras que contienen dominios de muerte, como FADD o TRADD, y que promueven la dimerización y consecuente activación de las caspasas iniciadoras, que formarán a su vez parte del complejo DISC. Por otro lado, la vía intrínseca responde a estímulos celulares negativos, como la hipoxia, la presencia de ADN dañado y ausencia de factores de crecimiento, hormonas o citoquinas. Esto conduce a la activación de ciertas moléculas señalizadoras (como BAX, BAK y BAD) que favorecen el incremento en la permeabilidad de la mitocondria, con lo que se libera citocromo c. Este factor proteico se une a APAF1, que junto con la caspasa 9 conformará el apoptosoma. La vía intrínseca también puede activarse por la acción de BID, una proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia de BCL-2, activada a su vez por la caspasa 8.

Las caspasas son un grupo de enzimas esenciales para la correcta activación de la apoptosis y su nombre proviene de su actividad como cisteín-aspártico proteasas; es decir, que son enzimas con una cisteína en su centro catalítico y que actúan rompiendo proteínas a nivel de un residuo de aspartato. Se sintetizan en forma de zimógenos (precursor inactivo) y se activan por ruptura proteolítica (96). En cuanto a su clasificación, encontramos caspasas pro-apoptóticas (caspasa 3, 6, 7, 8 y 9) e inflamatorias (1, 4, 5 y 12). Dentro de las caspasas pro-apoptóticas se han establecido a su vez sub-categorías que las clasifican en función de su papel

dentro de este proceso de suicidio celular. De esta forma podemos encontrar caspasas pro-apoptóticas iniciadoras (8 y 9) y ejecutoras (3, 6 y 7) (97-100).

La familia de proteínas BCL-2 puede dividirse en tres grupos: proteínas anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-X_L, BCL-W y MCL-1), pro-apoptóticas multidominio (BAX, BAX, BOK) y pro-apoptóticas sólo BH3 (BAD, BID, BIM, BMF, HRK, NOXA, PUMA) (101, 102). Las proteínas de la familia de las BCL-2 controlan el proceso de muerte celular mediante la regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, que conduce a la liberación irreversible de proteínas señalizadoras que provocan la subsecuente activación de las caspasas y el proceso apoptótico, especialmente el de tipo intrínseco (103). Las proteínas BID, BIM, NOXA y PUMA actúan como activadoras e interaccionan de forma directa con miembros efectores como BAX/BAK, que al activarse favorecen la formación de poros en la mitocondria lo que podría concluir con su despolarización. Las proteínas HRK, BAD y NOXA se consideran moléculas sensibilizadoras, ya que actúan uniéndose a factores anti-apoptóticos, interrumpiendo su señalización. Por otro lado, las proteínas de esta familia que conforman el grupo anti-apoptótico se encargan de secuestrar factores activadores de BAX y BAK (104-107).

Diferentes estudios han demostrado la capacidad de algunos flavonoides para actuar como mediadores pro-apoptóticos, a través de la activación de la caspasa 3, en distintas estirpes de células oncológicas: el kaempferol en células cancerosas pancreáticas, (108) la quercetina y las cianidinas en cáncer de células cervicales, la genisteína en células HT29 de cáncer de colon, la luteolina en células MDA-MB-231 de cáncer de mama, la vitexina en células neoplásicas renales y la naringenina en células HepG2 de carcinoma hepatocelular. Otras proteínas pro-apoptóticas, como la caspasa 9, BAK, BID o BAX, también pueden activarse por acción de los flavonoides (109-112).

2 4. 3. Interacción con la Maquinaria del Ciclo Celular

El ciclo celular está formado por un conjunto de fases cuya finalidad es la de preparar a la célula para su división, generando células hijas óptimas. Estas fases se denominan G₁, S, G₂, y M y en ellas la célula aumenta de tamaño, se duplica el material genético, se preparan los orgánulos para la división y se divide la célula, respectivamente. Cada etapa dentro de este

proceso se da de forma ordenada y se verifica molecularmente, de manera que se establecen puntos de control para asegurar una correcta producción de células hijas. Las ciclinas y las CDKs son las principales moléculas señalizadoras que promueven la progresión de la célula a lo largo de su ciclo vital. De manera análoga, p53 juega también un rol fundamental, ya que interviene en procesos como la reparación del ADN, el metabolismo de los telómeros o la prevención de la división en células con material genético aberrante y cuya reparación no es posible (113, 114).

Los flavonoides han demostrado poseer la capacidad de regular la expresión de ciclinas y CDKs, por lo que se les considera capaces de influir positivamente en la progresión del ciclo celular. En células cancerosas, el tratamiento con algunos flavonoides reduce los niveles de estas proteínas, ralentizando o deteniendo su ciclo. Así mismo, en muchos tipos de cáncer, el gen p53 se encuentra mutado, lo que conduce a su inactivación y pérdida de función. Cuando esto ocurre, la apoptosis se bloquea y la progresión del ciclo celular se activa, por lo que se desregula la maquinaria replicativa y la célula se divide de manera incontrolada. Diversos estudios han demostrado también la capacidad de los flavonoides como potenciadores de los efectos de p53, ayudando a que la apoptosis se produzca en caso de ser necesaria (115-119).

2. 4. 4. Interacción con los Mecanismos de Autofagia

La autofagia es un proceso celular de auto-degradación de importancia crítica en el desarrollo embrionario pero también en la vida adulta de un individuo, ya que es este proceso el encargado de eliminar proteínas con una estructura de plegamiento incorrecta, descartar orgánulos dañados y destruir patógenos intracelulares (120). Existen tres clases distintas de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. El mecanismo general por el que actúan estas modalidades se basa en la encapsulación de la partícula extraña por parte de una célula para formar autofagosomas, entonces la membrana celular externa se fusiona con las membranas de los lisosomas para dar lugar a los fagolisosomas, que finalmente degradarán el contenido celular mediante enzimas hidrolíticas. Son las particularidades en la forma de la degradación lisosomal lo que diferencia las tres clases de autofagia (121-123).

La macroautofagia es una ruta metabólica que se encuentra comúnmente mutada en células neoplásicas y por ello es una de las vías de señalización más estudiadas en el campo de la oncología. Las alteraciones genéticas que derivan en la modificación de este tipo de autofagia suelen implicar la alteración patológica de genes implicados en la proliferación (mTOR y ERK), la capacidad de supervivencia y la reparación del ADN (BCL-2, p53) (Figura 9).

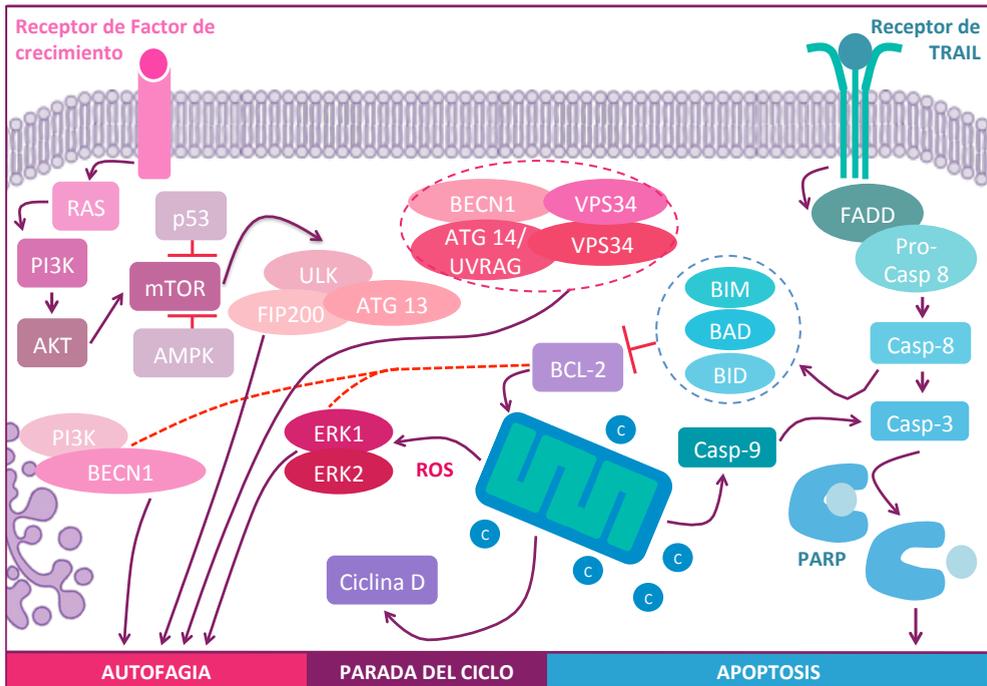


Figura 9. Apoptosis y Autofagia. La quinasa mTOR es una de las principales moléculas de la vía de señalización de la autofagia y regula negativamente la activación del complejo ULK, lo que conlleva la inhibición de la autofagia. En ausencia de mTOR, la actividad del complejo ULK se incrementa y, junto con la acción conjunta del complejo PI3K, favorece el inicio del proceso autofagocítico. Los genes implicados en la formación de autofagosomas se agrupan dentro de la familia de los ATG, que codifican para las proteínas del mismo nombre. Las quinasas citoplasmáticas de la familia ULK se encuentran en todas las células eucariotas y están implicadas en la autofagia, la citoquinesis y la ruta de señalización de sonic hedgehog. La proteína BECN1 es el homólogo en mamíferos de la ATG-6 y es una molécula clave en la regulación de la autofagia. Las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) forman parte de la maquinaria de regulación de la proliferación celular y la autofagia. El complejo ERK1/2 interviene en la formación de autofagosomas y regula la expresión de genes relacionados con el control de la autofagia.

Algunos flavonoides son capaces de modular los procesos de autofagia, mostrando una especial eficacia cuando se administran asociados a quimioterapia. No obstante hay que tener en cuenta los posibles efectos

citotóxicos causados por una sobreactivación de esta vía de degradación celular (124-127).

2. 4. 5. Interacción con el Metabolismo Redox

El estrés oxidativo se define como la disrupción del equilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y los antioxidantes que las contrarrestan. En condiciones de estrés oxidativo, los radicales libres no neutralizados pueden dañar el material genético de la célula y los tejidos adyacentes a la misma, así como favorecer la aparición de proteínas oxidadas. Tanto el daño tisular como la aparición de proteínas oxidadas provocan una respuesta de tipo inflamatorio, que junto con la capacidad de ROS para provocar alteraciones en el ADN, puede suponer la degeneración hacia un genotipo maligno (Figura 10). Los flavonoides, al poseer capacidades antioxidantes pueden actuar como anti-inflamatorios y ayudar a reducir los niveles de ROS (128-133).

La actividad antioxidante de los flavonoides depende de los grupos funcionales presentes en la molécula. El número total de grupos hidroxilo se relaciona positivamente con este tipo de capacidad, además de incrementar su capacidad para capturar radicales libres y como quelante de iones metálicos. En células con un metabolismo normal, los flavonoides inhiben la formación de ROS mediante la inactivación de la enzima glutatión S-transferasa, quelando los iones metálicos implicados en la formación de radicales libres, neutralizando de manera directa estas especies reactivas o potenciando la protección antioxidante del propio organismo (134-139).

Diversos estudios sugieren que los flavonoides afectan al equilibrio redox a través del metabolismo de la glucosa, ya que las enzimas sobre las que actúan o influyen intervienen en el metabolismo aeróbico de la glicólisis, en el transporte de la glucosa y/o en los mecanismos afectados por el efecto Warburg, que consiste en una modificación del metabolismo energético celular normal que hace que la mayoría de células cancerígenas recurran a la glicólisis anaeróbica en vez de a la fosforilación oxidativa mitocondrial (Figura 11). De esta forma los flavonoides actúan favorablemente tanto en la reducción o neutralización de especies reactivas como en la reversión hacia un metabolismo mitocondrial normal (140-143).

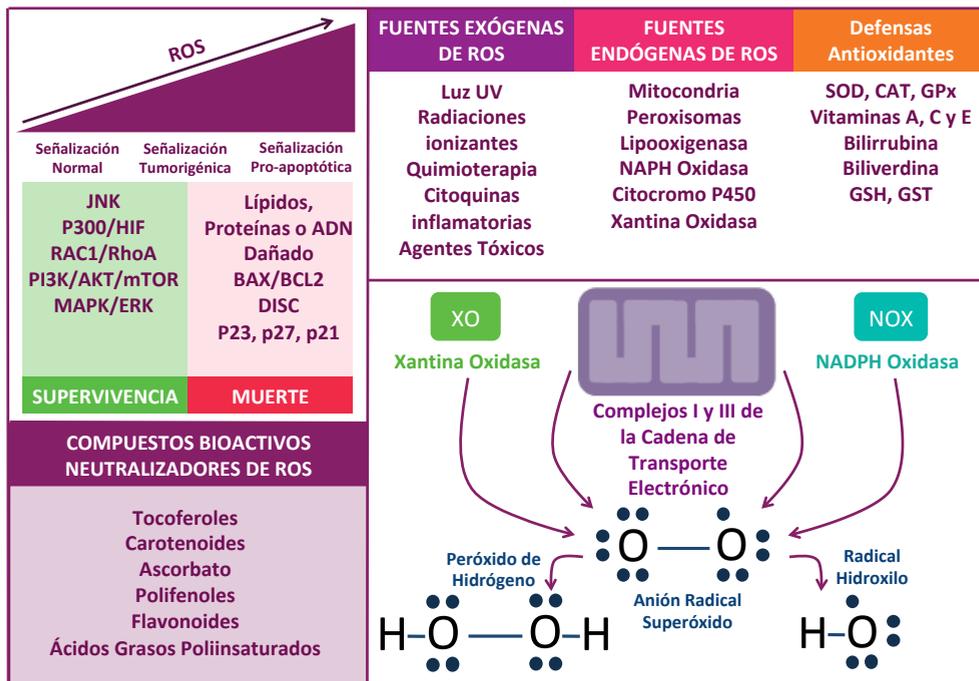


Figura 10. Neutralización de ROS y Señalización. El cuerpo humano cuenta con antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para neutralizar y eliminar los radicales libres. Algunos antioxidantes son producidos por el propio organismo mientras que otros se encuentran formando parte de la dieta o suplementos alimenticios. Varios de estos últimos no poseen propiamente la capacidad de neutralizar radicales libres, pero son capaces de incrementar la actividad antioxidante de la maquinaria endógena. La mayoría de las ROS se generan como consecuencia de las funciones orgánicas normales pero la exposición a ciertos estímulos externos, como la luz ultravioleta o determinados agentes químicos, puede aumentar su producción. La actividad del citocromo P450, que se encuentra formando parte de la cadena de transporte electrónico de la mitocondria, junto con la de las enzimas XO y NOX constituyen las principales fuentes de ROS a nivel endógeno.

2. 4. 6. Interacción con Factores de Inflamación e Inmunidad

La inflamación es un proceso fisiológico normal con un papel importante en la regeneración y remodelación de tejidos así como para la defensa ante agentes infecciosos o perjudiciales para el organismo. Se trata de un mecanismo evolutivo destinado a incrementar la supervivencia y que implica la activación, reclutamiento y acción de diversas células y moléculas de la inmunidad innata y adaptativa. La inflamación aparece por tanto como una respuesta ante un estímulo potencialmente dañino y su función es resolver, junto con el sistema inmune, estas amenazas contra la integridad orgánica del individuo (144-146).

En el caso del cáncer, la inflamación se considera perjudicial e improductiva, ya que no conduce a la eliminación de la patología. Al no neutralizar el agente causante, la inflamación se cronifica y favorece a su vez el desarrollo tumoral, fomentando la transformación neoplásica así como la supervivencia, proliferación, capacidad de metástasis y activación de vías de señalización relacionadas con la angiogénesis. Por esta razón los mecanismos implicados en la inflamación sostenida y la respuesta inmune infructuosa asociada a ella se han establecido como una importante diana terapéutica (147-149).

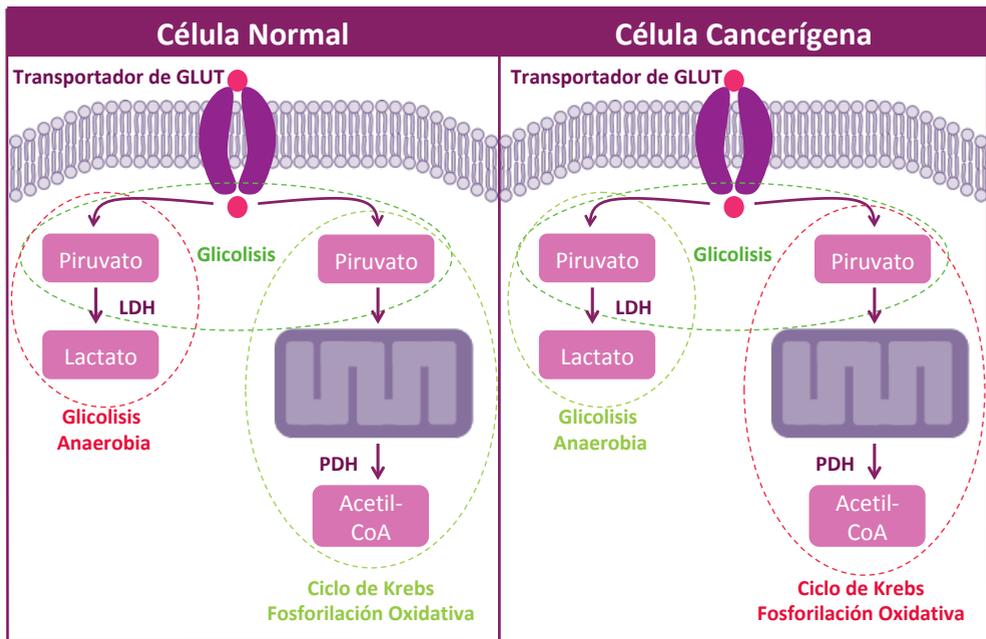


Figura 11. Efecto Warburg y Mecanismos Moleculares. Las células neoplásicas muestran una singular afinidad por la glicólisis aeróbica sobre la fosforilación oxidativa, que teóricamente supone una ruta metabólicamente más beneficiosa a nivel energético para la célula. Las razones sobre la selección natural de clones cancerígenos que exhiben este comportamiento metabólico anormal permanecen poco claras a pesar del número creciente de hipótesis al respecto. LDH: Lactato deshidrogenasa. PDH: Piruvato deshidrogenasa.

Los flavonoides pueden actuar sobre distintas dianas esenciales en el proceso inflamatorio (Figura 12):

- **Supresión de citoquinas pro-inflamatorias:** Este tipo de molécula es sintetizada mayoritariamente por los macrófagos activados y su función es la de regular positivamente la respuesta inflamatoria. Dentro de este grupo encontramos por ejemplo al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleuquina 1 beta (IL-1 β) o las interleuquinas 6 y 8 (150-154).

- **Supresión de factores de transcripción:** NF- κ B, STAT3 y AP-1 son algunos de los factores de transcripción más importantes de la inflamación y su activación o sobreexpresión resulta en un incremento en la producción de citoquinas y quimioquinas. Diversos oncogenes, como MYC o RAS, favorecen la activación de la cascada de expresión génica de estas moléculas (155-157).
- **Inhibición de enzimas:** La actividad oxidativa de ciertas enzimas como la NADPH oxidasa (NOX), la xantina oxidasa, la lipooxigenasa (LOX) o la ciclo-oxigenasa (COX) puede ser reducida mediante el empleo de flavonoides, lo que conlleva a una disminución de ROS y por tanto también a una reducción de la inflamación (158-160).

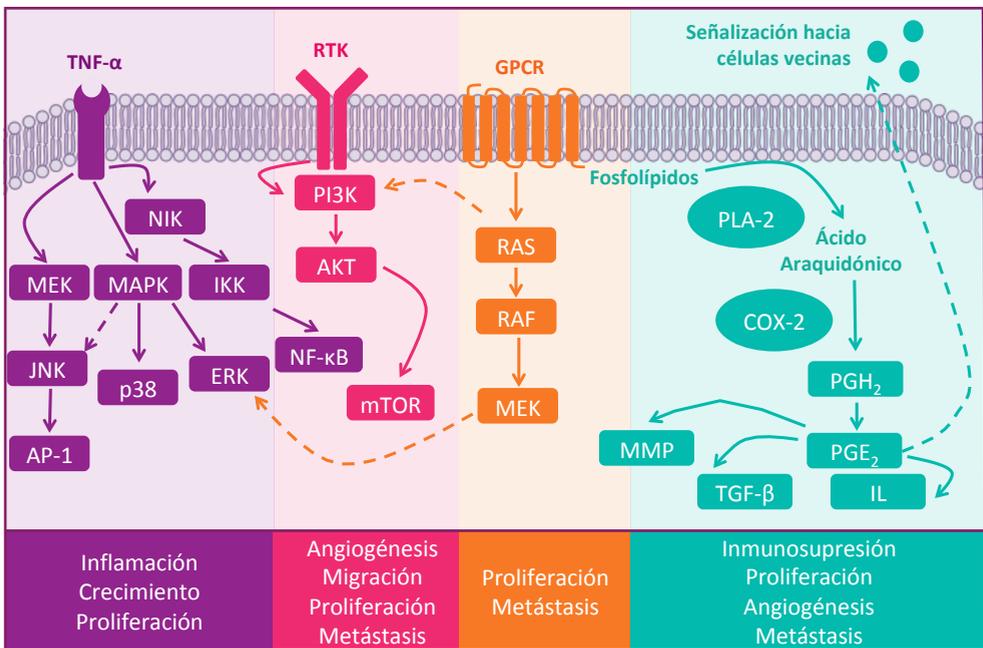


Figura 12. Rutas de Señalización Sensibles a Apoptosis. Los flavonoides han demostrado ser capaces de actuar como anti-inflamatorios al exhibir capacidades inmunomoduladoras, de supresión de quimioquinas, citoquinas relacionadas con COX-2 y factores de transcripción pro-inflamatorios, inhibición de la vía del PI3K/AKT y de IKK/JNK y modulación de la ruta de NF- κ B.

- **Inhibición de quinasas:** Las quinasas son enzimas capaces de fosforilar a sus sustratos y participan en una amplia variedad de rutas de señalización. Algunos estudios han demostrado la capacidad de ciertos flavonoides para unirse de manera directa a proteínas-quinasas específicas,

como AKT/PKB, Fyn, JAK1, MEK1, PI3K, MAP, MKK4, RAF1 o ZAP-70 (161-165).

2. 5. CHALCONAS

2. 5. 1. Características Generales de las Chalconas

Las chalconas son una sub-familia dentro de los polifenoles naturales y provienen del (*E*)-1,3-difenil-2-propen-1-ona. Se trata de un grupo de fitoquímicos conocidos por exhibir características potencialmente terapéuticas como anti-diabéticos, anti-microbianos, antioxidantes o anti-inflamatorios. Las chalconas y sus análogos son candidatos ideales por su potencial aplicación clínica (166-178) gracias a su bajo peso molecular, lo económicamente viable que es su síntesis y la facilidad con la que pueden modificarse para aumentar su biodisponibilidad y eficacia (Figura 13).

Base	Ruta de la β -catenina	Ruta de mTOR	Ruta del NF- κ B
Cardamomina	Metoxichalcona WJ9708011	Buteína	
Interacción con p53/MDM	Interacción con BRAF V600E	Interacción con STAT3	
Chalcona borónica	Bencilsulfonil-chalcona	Licochalcona A	

Figura 13. Estructura General de las Chalconas y Ejemplos de Chalconas con Propiedades Anticancerígenas. La estructura básica de las chalconas consiste en dos anillos aromáticos unidos por un grupo carbonilo α , β -insaturado. Su citotoxicidad es atribuible al grupo cetona y a los grupos funcionales que pueden presentar los anillos aromáticos y que aumentan su eficacia. Poseen una tonalidad amarillenta que contribuye a la pigmentación de flores, como las de la *Coreopsis lanceolata* o la *Dahlia variabilis*. Diversos estudios han demostrado que las chalconas tienen la capacidad de unirse a distintas dianas moleculares y afectar a numerosas rutas de señalización (como NF- κ B, β -catenina, la vía de mTOR, BRAF V600E, las aurora-quinasas, STAT3, el receptor de andrógenos, VEGF-R, p53 o la polimerización de tubulina), exhibiendo efectos anticancerígenos.

Las chalconas también pueden emplearse como precursores para el desarrollo de nuevos fármacos, hibridizándolas con otros compuestos para aumentar su especificidad, actividad biológica o potencia terapéutica (169, 170).

3. 5. 2. Chalconas Naturales

Las plantas son una abundante fuente de metabolitos secundarios con capacidades farmacológicas. Las chalconas forman parte de este tipo de fitoquímicos con valor medicinal y son consideradas intermediarias en la biosíntesis de flavonoides e isoflavonoides. Dentro del metabolismo vegetal, las chalconas actúan contrarrestando las especies reactivas del oxígeno, previniendo los daños moleculares asociados. Muchas chalconas de origen natural exhiben de manera inherente una potente eficacia anticancerígena, como la buteína o la isoliquiritigenina (171-173).

3. 5. 3. Derivados de las Chalconas

La actividad biológica de las chalconas se correlaciona de manera directa con su estructura, la cual determina sus características lipofílicas, electrónicas, estéricas, etc. Es por esto que tanto su bio-actividad como su potencia terapéutica pueden verse afectadas por cambios en sus grupos funcionales, lo que a su vez permite establecer patrones moleculares con potencial clínico (174, 175).

Dentro de los derivados de las chalconas, encontramos una sub-categoría denominada chalconas híbridas (Figura 14). Este tipo de moléculas están formadas por la combinación complementaria de distintos farmacóforos, por lo que se trata de una estructura con una arquitectura híbrida capaz de mantener ciertas características biológicas (previamente seleccionadas) de las agrupamientos que la conforman. En el contexto del cáncer, este tipo de derivado puede aumentar la eficacia en el tratamiento de dicha enfermedad al permitir unir moléculas con cuya actividad se complementa de manera sinérgica o con dianas biológicas distintas (176-180).

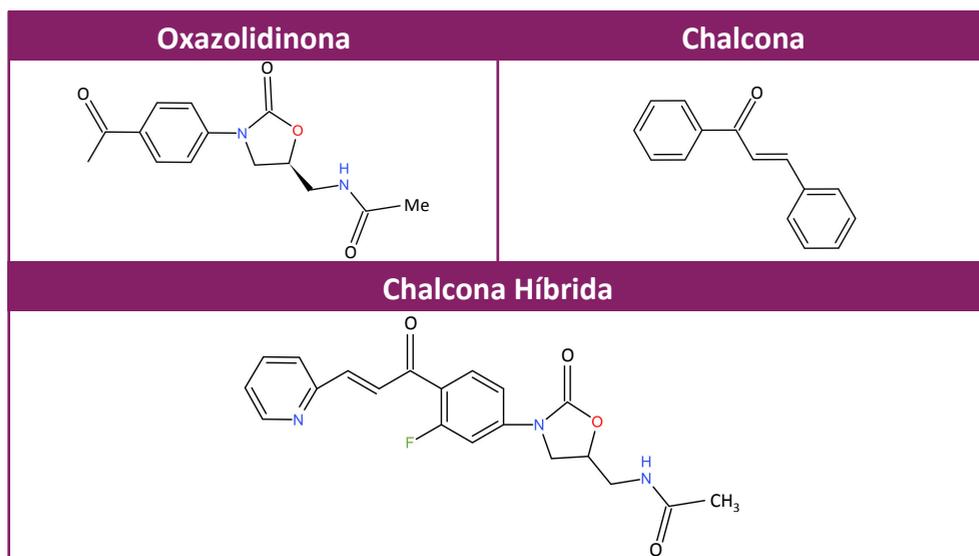


Figura 14. Compuesto Híbrido Oxazolidinona-Chalcona. La forma esencial de las chalconas consiste en dos anillos aromáticos unidos por un sistema carbonilo α, β -insaturado. Su citotoxicidad es atribuible al grupo cetona y a los grupos funcionales. La oxazolidinona-chalcona fue una de las primeras chalconas híbridas en ser sintetizada y fue creada con el objetivo de unir la actividad anti-bacteriana de ambas moléculas en 2007.

3. OBJETIVOS

Las chalconas son precursores biosintéticos de los flavonoides, presentan una amplia variedad de estructuras y su potencial anti-neoplásico ha sido demostrado.

El objetivo principal del presente estudio ha sido investigar la citotoxicidad producida por una chalcona híbrida α -bromoacrilamido-indolil-piridil propenona (Figura 15), así como la respuesta antiproliferativa y proapoptótica desencadenada en células de melanoma humano del tipo SK-MEL-1 y MEL-HO. De manera complementaria y para comprender mejor la interacción de esta chalcona con las células neoplásicas empleadas, también se investigaron los posibles mecanismos de muerte implicados, la formación de especies reactivas del oxígeno, la escisión de poli-(ADP-ribosa)-polimerasa, la activación de la apoptosis intrínseca y/o extrínseca y vías de señalización y factores proteicos de especial importancia en células cancerosas, como la vía de las MAPK o NF- κ B o la expresión de TRAIL, DR4, DR5 Y p21^{Cip1/WAF}.

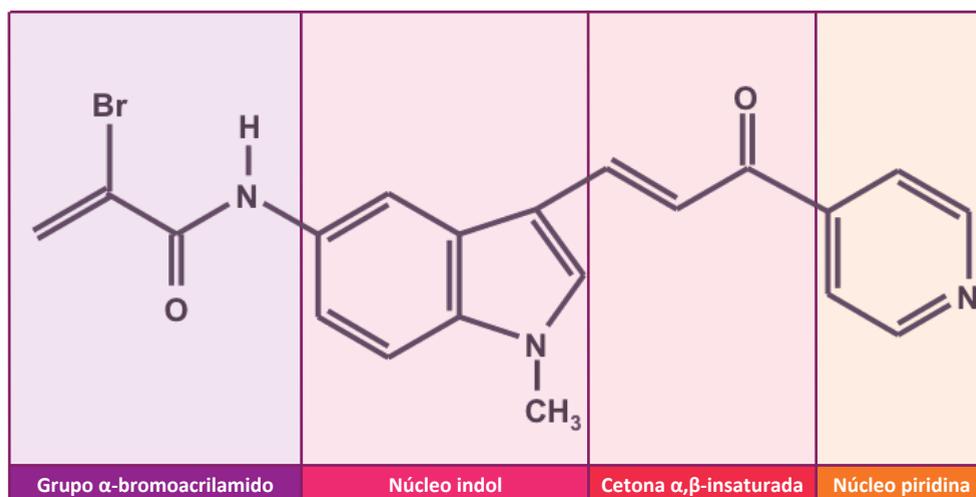


Figura 15. Compuesto Híbrido Indol-Chalcona. El compuesto empleado para este estudio ha sido una chalcona híbrida constituida por dos anillos aromáticos heterocíclicos (de tipo indol y piridina) y un grupo α -bromoacrilamida en posición 5' con respecto al núcleo indol.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. 1. PRODUCTOS Y MATERIALES

4. 1. 1. Compuesto Híbrido Indol-Chalcona

Los estudios y procedimientos correspondientes a la síntesis del compuesto fueron llevados a cabo en el Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Ferrara siguiendo una metodología establecida en trabajos previos y cuyo esquema general se muestra en la Figura 16.

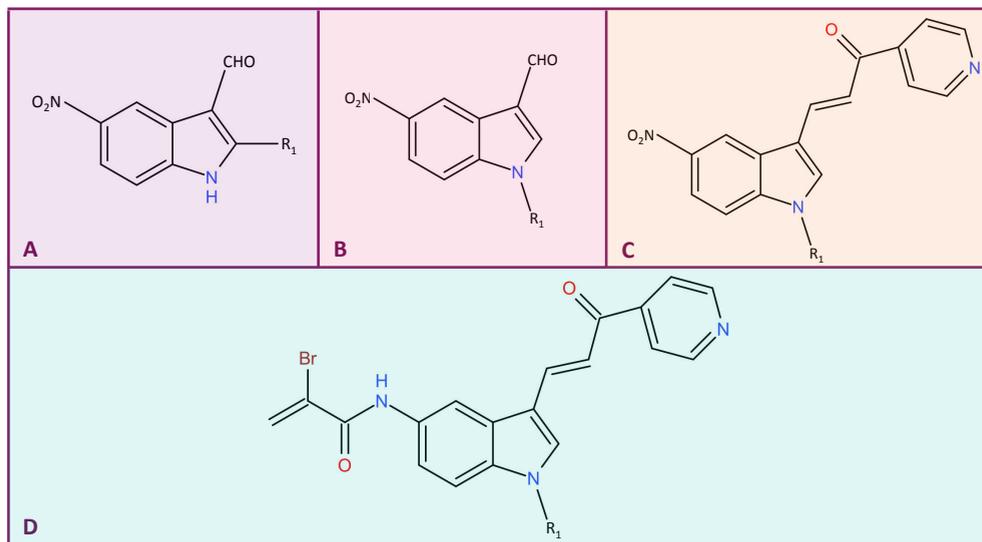


Figura 16. Proceso de Síntesis de la Indol-Chalcona Híbrida. Diversos productos naturales con demostrada actividad anti-neoplásica (como la cúrcuma o el celastrol) contienen grupos que actúan como aceptores de Michael. La chalcona híbrida utilizada para este estudio (HY-CHAL) contiene un grupo carbonilo α,β -insaturado de piridinil propenona y también cuenta con un grupo α -bromoacrilamida, ambos con capacidad para actuar como aceptores de Michael. El producto de partida (A) fue modificado (B y C) hasta conseguir sintetizar la chalcona híbrida deseada (D).

Los experimentos previos realizados por nuestro grupo de investigación establecieron el potencial de HY-CHAL como agente biológico anti-cancerígeno empleando líneas celulares de leucemia humana.

4. 1. 2. Cultivos Celulares

El medio de cultivo RPMI 1640, el suero fetal bovino, el HEPES (N-[2-hidroxietil] piperazino N'-[2-etanosulfanílico]), la L-glutamina, el azul de tripán, el bicarbonato sódico y los antibióticos (estreptomina, gentamicina y penicilina G), fueron adquiridos a Sigma (St. Louise, MO, EE.UU). Becton-Dickinson proporcionó el resto del resto del material estéril utilizado, junto con las botellas de cultivo de 75 cm² y las placas de 48 y 96 pocillos estériles.

4. 1. 3. Microscopía de Fluorescencia (Bisbencimida)

El paraformaldehído y el trihidrocloruro de bisbencimida (Hoechst nº 33258) fueron proporcionados por Sigma (St. Luis, MO, EE.UU). El microscopio invertido de contraste de fases (Axiovert 135), los objetivos Plan-NEOFULAR 20X y 63X y la lámpara de Fluorescencia (HBO 50) habían sido adquiridos a Zeiss (Alemania).

4. 1. 4. Citometría de Flujo

El yoduro de propidio se obtuvo de Sigma/Aldrich (España). Se empleó la anexina V de BD Pharmigen (Anexin V-FITC Apoptosis Detection Kit). Las sondas fluorescentes H₂DCF-DA (dihidro-diclorofluoresceína-diacetato) y JC-1 (yoduro de 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3' -tetraetil-benzimidazol-carbocianina) se obtuvieron de Molecular Probes (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA). Los inhibidores de caspasas fueron proporcionados por Sigma/Aldrich (España).

4. 1. 5. Determinación de la Actividad Caspasa

Sigma suministró los sustratos colorimétricos específicos utilizados en el ensayo para determinar la actividad de las caspasa 3, 8 y 9 (DEVD-pNA, IETD-pNA y LEHD-pNA).

4. 1. 6. Determinación de Proteínas (Western Blot)

Las membranas (PVDF) y el sustrato de quimioluminiscencia provinieron de Millipore (Billerica, MA, EE.UU). La acrilamida (bis *N,N*'-metilen-bis-acrilamida), el persulfato amónico, el TEMED (*N,N,N,N*,-tetrametil-etilendiamina), dodecil sulfato sódico (SDS) y los marcadores de pesos moleculares se obtuvieron en Bio-Rad. El azul de bromofenol, la albúmina de suero bovino (BSA) y el β -mercaptoetanol fueron de Sigma.

Los anticuerpos primarios empleados para la realización de los distintos western blots se adquirieron de las siguientes compañías: anti-PARP [poli(ADP-ribosa) polimerasa, #551024], BD Pharmingen (San Diego, CA, EE.UU), anti-caspasa 3 (#ADI-AAP-113) de Enzo (Ann Arbor, MI, EE.UU); anti-caspasa-7 (#9494), anti-caspasa 8 (#9746, Cell Signaling Technology) y anti-caspasa 9 (#9502S) Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EE.UU); anti-citocromo *c* (556433) a BD Pharmingen (San Diego, CA, EE.UU); anti-BCL-2 (#4223), anti-BAX (#2772), anti-BCL-XL (#2764), anti-BAK (#12105), anti-Mcl-1 (#4572), anti-BID (#2002), anti-BIM (#2933), anti-JNK/SAPK (#9252), anti-fosfo-JNK/SAPK (phosphor T183 + Y185) (#9251), anti-p44/42 MAP quinasa (ERK1/2) (#9102), anti-fosfo-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (#9101), anti-p38 MAPK (#9212), anti-fosfo-p38 MAPK (T180/Y182) (#9211); GSK-3 (#9315), anti-fosfo-GSK-3 β (Ser9) (#9322), anti-fosfo-AKT (Ser473) (#9271), anti- β -actina (#4967); anti-P-p65 fosfo-NF- κ B p65 (ser536) (#3033); anti-NF- κ B p65 (#8242); anti-p21 anticuerpos de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EE.UU). Anti-AKT (SC-1618) anti-c-Myc (SC-40) de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU). TRAIL, DR4 y DR5 de Abcam (Cambridge, Reino Unido). Anti- β -actina (clone AC-74, A2228) de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE.UU). Por otra parte, los anticuerpos secundarios (NA9310 y NA9340) provinieron de GE Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido).

Los productos utilizados para la obtención de lisados celulares fueron: aprotinina (inhibidor de serinproteasas que inhibe tripsina, quimiotripsina y plasmina), leupeptina (inhibidor de cisteín y serínproteasas que inhibe plasmina, tripsina, papaína y catepsina B), pepstatina A (potente inhibidor de proteasas ácidas), PMSF (inhibidor de cisteín y serínproteasas junto con acetilcolinesterasas), ditioneitol (DTT: agente reductor estereoselectivo para puentes disulfuro en complejos moleculares), ortovanadato sódico (inhibidor de fosfatasa alcalinas) y detergente tritón X-100. Todos ellos de Sigma.

4. 1. 7. Reactivos Generales de Laboratorio

El agua desionizada y bidestilada se obtuvo con un equipo Milli-Q (Water Purification System, Millipore Ibérica, Madrid, España). El dimetilsulfóxido (DMSO), EDTA, EGTA, NaCl, glicerol, tris base, MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), la sacarosa, tween 20, hidróxido de sodio y ácido clorhídrico se obtuvieron de Sigma. Trolox, *N*-acetil-*L*-cisteína (NAC), Catalasa (CAT) y el resto de inhibidores fueron obtenidos de Sigma. Otros compuestos utilizados en la preparación de reactivos y tampones también se compraron a Sigma.

4. 2. MODELOS EXPERIMENTALES

4. 2. 1. Cultivo de Células SK-MEL-1 y MEL-HO

Las células de melanoma humano SK-MEL-1 y MEL-HO se obtuvieron de DMSZ (Braunschweig, Alemania) y se cultivaron en medio RPMI suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor y antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina) en una atmósfera humidificada (37°C y 5% CO₂) y a una densidad no superior a 0,5 x 10⁶ células/ml. Las SK-MEL-1, al ser células que provocan una rápida acidificación del medio, se cambiaron entre tres y cuatro veces por semana. La tasa de duplicación aproximada para las SK-MEL-1 fue de unas 48 horas, mientras que para las MEL-HO fue de 24 horas. Esto que resultó equivalente a la información proporcionada por la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (Braunschweig, Alemania). Las células se contaron en una cámara de Neubauer y la viabilidad siempre fue superior al 95%, utilizando el método de exclusión de azul de tripán.

4. 2. 2. Tratamientos con la Chalcona Híbrida

Los productos se prepararon a una concentración de 10-100 mM en dimetil-sulfóxido (DMSO) y las alícuotas se mantuvieron a -20°C. Las diluciones necesarias se hicieron en medio de cultivo justo antes de los respectivos experimentos. En todos los experimentos la concentración de DMSO no excedió nunca el 0,3%, para asegurar que no resultase tóxico para las células. La misma concentración de DMSO fue añadida a las células control.

4. 3. MÉTODOS

4. 3. 1. Evaluación de la Citotoxicidad *In Vitro* y la Proliferación Celular

Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos por triplicado, a una densidad de 5.000 células por pocillo en 200 µl de medio de cultivo por pocillo y en presencia de diferentes concentraciones de HY-CHAL durante los tiempos indicados en cada experimento. Una vez transcurrido el tiempo de experimentación, las placas se centrifugaron (500 g, 10 min) a temperatura ambiente y se eliminó el medio de cultivo mediante aspiración.

A cada pocillo se le añadió 100 µl de MTT (0,5 mg/ml en medio de cultivo con antibiótico pero sin suero) y las placas se incubaron durante 4 horas a 37°C. Una vez transcurrido dicho tiempo, se paró la reacción añadiendo 100 µl de SDS (20%) con HCl 0,02N e incubó la mezcla hasta la mañana siguiente. La cuantificación de la conversión del MTT (color amarillo) en su forma reducida (color púrpura) debido a la actividad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial se determinó en un lector de microplacas (modelo 680 de Bio-Rad) a una longitud de onda de 570 nm, usando como blanco tres pocillos en los que no se cultivaron células y a los que se les añadió el medio con MTT (Figura 17). Los datos se analizaron con el programa informático Prism 5.0 (GraphPad). Además, el número de células se determinó por el método de exclusión de azul-tripán.

4. 3. 2. Estudio de la Apoptosis por Tinción con Bisbencimida

Se trata de un método basado en la capacidad del fluorocromo bisbenzimidida (Hoechst 33258) para unirse al ADN, permitiendo visualizar por microscopía de fluorescencia cambios morfológicos del núcleo, como son la condensación de la cromatina y su compactación a lo largo de la periferia del núcleo y la segmentación del núcleo. Una vez finalizados los tratamientos, las células ($\sim 5 \times 10^5$) se lavaron con PBS (10 mM fosfato sódico, 150 mM NaCl, pH 7,4) y se fijaron con 70 µl de paraformaldehído (3% en PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación

se centrifugaron (12.000 g, 1 minuto), se eliminó el paraformaldehído y las células se tiñeron con 20 μ l de una disolución que contenía 20 μ g/ml de bisbenzimidida en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Seguidamente se fijó una alícuota (10 μ l) en un porta y se analizó la morfología nuclear de 500 células con un microscopio de fluorescencia (Zeiss-Axiovert). En general, se consideran células apoptóticas aquellas cuyos núcleos presentan condensación de la cromatina, compactación a lo largo de la periferia y/o la fragmentación nuclear en tres o más cuerpos apoptóticos.

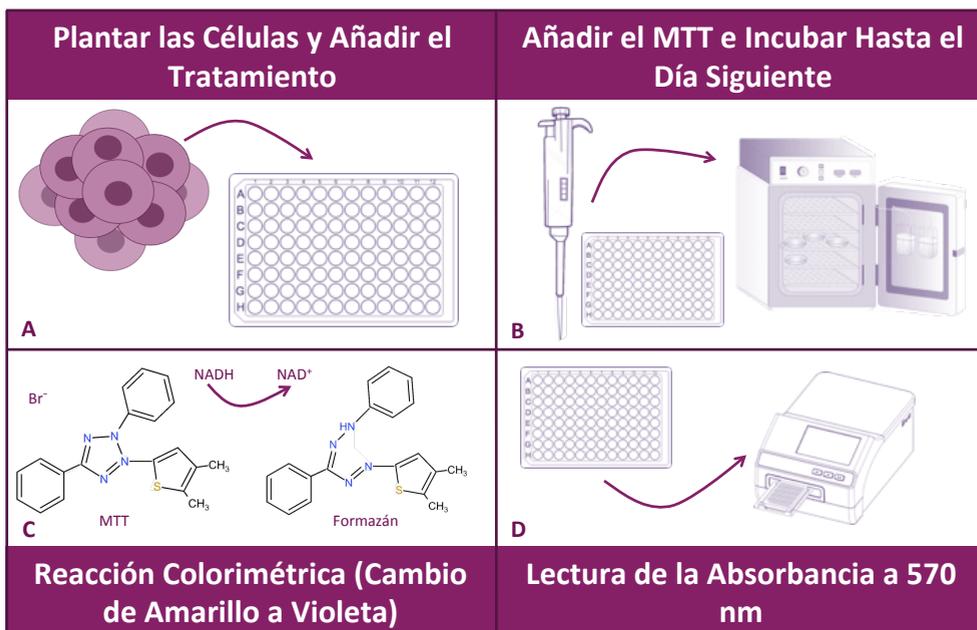


Figura 17. Ensayo de Citotoxicidad por MTT. Se trata de un método colorimétrico que permite medir la actividad metabólica celular. Se basa en la capacidad que poseen las enzimas oxidorreductasas dependientes de NADH para reducir las sales de tetrazolio (MTT), que son solubles y de color amarillo, a formazán, que es un producto insoluble y de color azul-violáceo. La secuencia general de pasos seguidos para realizar esta técnica consiste en: (A) Plantar las células y añadir el tratamiento. (B) Añadir el MTT e incubar hasta el día siguiente, (C) Reacción Colorimétrica (cambio de amarillo a violeta). (D) Lectura de la absorbancia a 570 nm.

4. 3. 3. Estudio de la Apoptosis por Cuantificación de Células Hipodiploides

Es un método cuantitativo basado en la fluorescencia emitida por diferentes fluorocromos capaces de unirse al ADN (yoduro de propidio en

este caso). Se puede detectar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en función de su contenido en ADN. Las células en la fase G_1 forman el primer pico, en la fase S las células están sintetizando ADN y en la fase G_2/M las células presentan el doble de ADN que una célula normal y aparecerán como un segundo pico (Figura 18). Las células que contienen ADN hipodiploide (menor contenido en ADN que el contenido diploide de las células normales) son consideradas como células apoptóticas y se localizan a la izquierda del pico G_1 , constituyendo la fracción $SubG_1$. Una vez finalizados los correspondientes tratamientos, las células se lavaron con PBS frío y se fijaron durante al menos una hora en etanol al 70% a -20°C . A continuación se lavaron dos veces con PBS, se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos y se incubaron con 1 ml de una mezcla de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNasa A y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de yoduro de propidio en PBS durante 1 hora a 37°C en oscuridad. Una vez transcurrido el periodo de incubación, las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo BD FACSVerse (Becton-Dickinson), siendo excitadas con una longitud de onda de 488 nm y detectándose la fluorescencia emitida por el complejo propidio-ADN a una longitud de onda de 617 nm. Se analizaron 10^4 células en cada muestra.

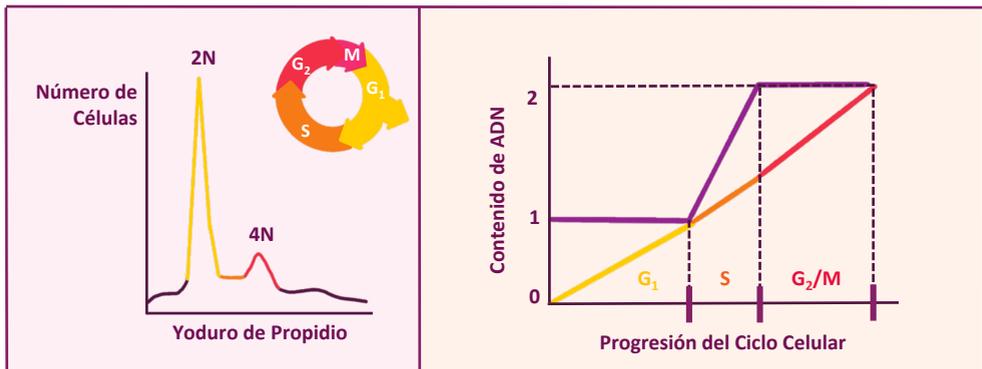


Figura 18. Análisis del Ciclo Celular por Citometría de Flujo. La citometría de flujo puede emplearse para estimar el porcentaje de células que se encuentran en cada una de las fases de su ciclo de división. La distribución del contenido de ADN celular formará un histograma donde la fase G_0/G_1 está separada de la G_2/M por la fase S.

4. 3. 4. Determinación de la Actividad Caspasa

Una vez que las células fueron tratadas, se centrifugaron a 1.000 g durante 10 minutos a 4°C , se lavaron con PBS y se incubaron en hielo. A continuación se resuspendieron en tampón de lisis [50 mM HEPES (pH 7,4), 1 mM de ditiotreitól, 0,1 mM EDTA, 0,1% CHAPS] y se dejaron 5 minutos en

hielo. Seguidamente se centrifugaron durante 10 minutos a 16.000 g y 4 °C y posteriormente se determinó la concentración de proteínas en los sobrenadantes mediante el método de Bradford. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta que fueron usadas para el estudio de la actividad enzimática de las caspasas. Fueron utilizadas cantidades equivalentes de proteínas (~20 μ g). El incremento de la absorbancia a 405 nm después de la incubación a 37 °C durante 1 hora fue indicativo de la actividad enzimática de las caspasas. Los sustratos colorimétricos utilizados en el ensayo para las actividades caspasa 3/7, caspasa 8 y caspasa 9 fueron DEVD- ρ NA, IETD- ρ NA y LEHD- ρ NA, respectivamente.

4. 3. 5. Determinación de la Externalización de la Fosfatidilserina

La fosfatidilserina es un fosfolípido que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y se transloca a la cara externa en los estadios tempranos del proceso apoptótico. La proteína anexina V tiene afinidad por la fosfatidilserina en presencia de Ca^{2+} y permite detectar las células apoptóticas por citometría de flujo, previa incubación de las células con anexina V unida al fluorocromo fluoresceína 5-isotiocianato (FITC). De esta manera distinguimos:

-Células viables: no unen anexina V al tener la membrana plasmática intacta y por este mismo motivo no permiten la entrada de yoduro de propidio (anexina V negativas / yoduro de propidio negativas)

-Células en apoptosis temprana: permiten la unión de anexina V al tener parte de la fosfatidilserina localizada en el espacio extracelular, pero sin embargo no permiten la entrada de yoduro de propidio puesto que la membrana plasmática no llega a ser permeable aún a dicho compuesto (anexina V positivas / yoduro de propidio negativas)

-Células necróticas o en apoptosis tardía: unen anexina V e incorporan yoduro de propidio (anexina V positivas / yoduro de propidio positivas).

Una vez tratadas las células (1 x 10⁶ por muestra) se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en tampón 10 mM HEPES/NaOH (pH 7,4), conteniendo 140 mM NaCl y 2,5 mM de CaCl₂. Se transfirió 100 μ l de la suspensión (10⁵ células) a un tubo de cultivo de 5 ml y se le añadieron 5 μ l de anexina V-FITC y 5 μ l de yoduro de propidio. Se mezclaron suavemente las células y se

incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente (25°C) en oscuridad. Posteriormente se añadieron 400 µl del tampón anterior a cada tubo y se analizó cada muestra mediante citometría de flujo.

4. 3. 6. Inmunodetección de Proteínas (Western Blot)

Después de los correspondientes tratamientos, las células (1-10 x 10⁶) fueron recolectadas, centrifugadas (500 g, 10 minutos, 4 °C) y lavadas dos veces con PBS. En función de los objetivos experimentales, las muestras se procesaron de diferente forma.

- Obtención de lisados celulares: el precipitado celular se resuspendió en 100 µl de tampón de lisis [Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM EDTA, 137 mM NaCl, 10% glicerol, 1% Tritón X-100, 2 mM de pirofosfato de sodio, 20 mM de glicerofosfato de sodio, 10 mM de fluoruro sódico, 2 mM de ortovanadato sódico, 1 mM PMSF, 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml pepstatina A, 5 µg/ml aprotinina] y se incubó durante 15 minutos a 4°C. Los lisados se centrifugaron a 11.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se guardó a -20 °C hasta su utilización.
- Obtención de fracciones subcelulares: el precipitado celular se resuspendió en 100 µl de tampón de homogeneización [20 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 250 mM sacarosa] con inhibidores de proteasas (0,1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml pepstatina A), y se incubó durante 15 minutos a 4°C. Las células se lisaron usando una aguja de 21 G y el extracto resultante se centrifugó a 1.000 g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado (fracción nuclear) se resuspendió en 100 µl de tampón de homogeneización. El sobrenadante resultante se centrifugó a 22.000 g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado (fracción mitocondrial) se resuspendió en 50 µl de tampón de homogeneización mientras que el sobrenadante fue utilizado como fracción citosólica. Las diferentes fracciones se congelaron a -20 °C hasta su utilización.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford y todas las muestras se ajustaron a la misma concentración utilizando el tampón anterior. Los lisados celulares se hirvieron en tampón de electroforesis [50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 15% sacarosa, 2 mM EDTA, 3% SDS, 5 mM β-mercaptoetanol y 0,01% azul de bromofenol] a 100 °C durante 10

minutos. Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida con porcentajes de la misma que van desde 7,5% hasta 15% dependiendo del peso molecular de la proteína a estudiar, conteniendo 0,1% SDS y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 10% en tampón TBST [20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 137 mM NaCl, 0,1 % Tween-20] durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de una incubación con el anticuerpo específico (1:1.000). Los anticuerpos utilizados en este estudio se diluyeron en TBST que contenía un 3% de leche desnatada y las membranas se incubaron en presencia del anticuerpo de interés con agitación suave a 4°C durante toda la noche. Para asegurar que se cargó la misma cantidad de proteína en todas las muestras, se analizó la expresión de la proteína β -actina con su anticuerpo específico. Las membranas se lavaron con TBST tres veces durante 15 minutos cada vez y se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente las membranas se lavaron de nuevo con TBST bajo las condiciones anteriores y la detección de las proteínas específicas se determinó por emisión de quimioluminiscencia utilizando el kit comercial Immobilon Western de Millipore y el equipo ChemiDoc de Bio-Rad.

4. 3. 7. Detección de ROS Intracelular

La generación de especies reactivas de oxígeno intracelular (ROS) se midió fluorimétricamente usando la sonda diacetato 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína (H_2 -DCF-DA). Las células fueron expuestas a los tratamientos correspondientes y se incubaron con 10 μ M de la sonda (durante los últimos 30 minutos a 37°C en oscuridad). Inmediatamente después las muestras se analizaron mediante citometría de flujo con el equipo BD FACSVersé (Becton-Dickinson), excitando la sonda con un láser de argón a 488 nm y recogiendo la emisión fluorescente de la diclorofluoresceína (529 nm). La distinta intensidad de la fluorescencia emitida indica la mayor o menor presencia de ROS en el interior de la célula.

4. 3. 8. Análisis del Potencial de la Membrana Mitocondrial

Las células (1 x 10⁶ por muestra) se incubaron con la sonda JC-1 (3 μ M) a 37°C durante los últimos 30 minutos de tratamiento y se analizaron mediante citometría de flujo, detectándose la fluorescencia emitida por los

monómeros de JC-1 y la fluorescencia emitida por los agregados a 527 nm y 590 nm, respectivamente. La cuantificación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) se obtuvo a partir de la representación gráfica de la fluorescencia emitida por los monómeros frente a la fluorescencia procedente de los agregados del fluorocromo. Esto permite estimar el porcentaje de células con potencial de membrana intacto (cuadrante superior) de aquellas que sufren despolarización mitocondrial (cuadrante inferior). El ionóforo de protones carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona (CCCP) se utilizó como control positivo de la disipación del potencial. La disipación del potencial de membrana mitocondrial inducida por CCCP (50 μM) se ve reflejada por un incremento del número de células que emiten mayor fluorescencia verde y menos roja respecto a las células control y que se sitúan en el cuadrante inferior derecho. Para el análisis se usó el citómetro BD FACSVersé (Becton-Dickinson).

4. 4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

En todos los casos las determinaciones para cada grupo experimental se realizaron por triplicado o cuadruplicado, y los valores representados se corresponden a datos de tres experimentos como mínimo (media \pm S.E.M.). La comparación entre los distintos tratamientos se realizó por el método de la t de Student o análisis de la varianza, considerando significativos los valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5. 1. DISMINUCIÓN DE LA VIABILIDAD

Debido a la probada eficacia de HY-CHAL como agente anti-proliferativo en células de leucemia humana (179), en este trabajo se decidió evaluar la citotoxicidad de esta chalcona en dos tipos distintos de células de melanoma humano: SK-MEL-1 (células redondeadas que crecen en suspensión y que se originaron en un melanoma primario de un varón caucásico) y MEL-HO (células adherentes de forma larga y delgada obtenidas a partir del tumor primario de una paciente de melanoma de etnia caucásica), ambas portadoras de la mutación BRAF V600E.

El estudio de la viabilidad celular se emplea en prácticamente la totalidad de los ensayos de cribado farmacológico y permite determinar si la molécula estudiada afecta a la capacidad proliferativa y/o desencadena un efecto citotóxico capaz de inducir la muerte celular. Para este trabajo se decidió emplear la evaluación visual de las células mediante microscopía óptica de contraste de fases y la técnica colorimétrica de la reducción del MTT como métodos de análisis de la viabilidad celular.

5. 1. 1. Ensayo del MTT

El MTT es una sal de tetrazolio capaz de atravesar la membrana celular y que puede ser reducida por la mitocondria o enzimas plasmáticas (oxidorreductasas, peroxidasas, deshidrogenasas u oxidasas), resultando en la conversión del MTT en formazán, una molécula coloreada insoluble en agua.

La realización de este ensayo posibilitó la detección de una reducción en la actividad metabólica de manera dependiente de la concentración de HY-CHAL y permitió determinar la IC_{50} (concentración que inhibe en un 50% la proliferación celular) para ambos tipos celulares, con valores de IC_{50} de $0,15 \pm 0,04 \mu M$ para SK-MEL-1 y $0,3 \pm 0,1 \mu M$ para MEL-HO (Figura 19A).

Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de HY-CHAL y posteriormente se evaluó la actividad respiratoria mitocondrial utilizando el ensayo colorimétrico del MTT, empleado como indicador del estado metabólico de las células.

5. 1. 2. Microscopía Óptica de Contraste de Fases

La microscopía óptica de contraste de fases permite estudiar la capacidad proliferativa y las características morfológicas de una población celular de forma no invasiva, ya que no requiere de un proceso de fijación, tinción o la adición de ningún agente externo que pueda dañar las células. Por esta razón, decidimos emplear la microscopía óptica de contraste de fases como método para la detección de los cambios en la morfología celular característicos de la apoptosis. Además, esta técnica nos permitió a su vez validar los resultados obtenidos a partir del ensayo con MTT.

Al emplear este procedimiento, se pudo observar el efecto a nivel fenotípico que HY-CHAL ejerce sobre las células de melanoma humano y que consistió en la visualización de la reducción del número total de las poblaciones analizadas así como cambios en el tamaño, la forma y la capacidad para formar agregados.

Las células SK-MEL-1 no tratadas con la chalcona híbrida mostraron una forma redondeada y sana, mientras que aquellas incubadas en presencia de HY-CHAL adquirieron varias de las características físicas típicas de la apoptosis y su número total se vio drásticamente reducido (Figura 19B y 19C). Esta disminución en el número de células totales también se apreció en células MEL-HO cultivadas bajo las mismas condiciones experimentales.

La suma de todos estos datos sugiere que HY-CHAL es una chalcona híbrida que cuenta con la capacidad citotóxica necesaria para disminuir de manera significativa la viabilidad de las células de melanoma humano.

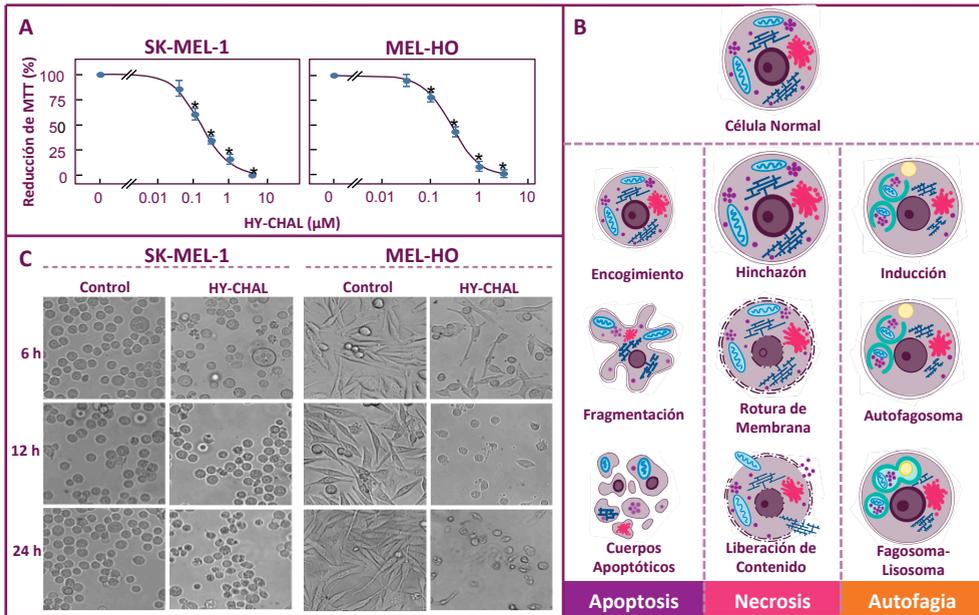


Figura 19. Resultados del Ensayo con MTT. La chalcona híbrida HY-CHAL reduce la viabilidad de las células de melanoma humano SK-MEL-1 y MEL-HO. (A) Estudio de la curva de dosis-respuesta para la indol-chalcona híbrida en células SK-MEL-1 y MEL-HO mediante la técnica del MTT, basada en la reducción de este compuesto a formazan (paso de color amarillo a azul-violeta). Las células se incubaron con concentraciones crecientes de HY-CHAL durante 72 horas, tras las cuales se determinó la actividad respiratoria mitocondrial mediante el uso de la técnica colorimétrica del MTT (media \pm error estándar, * indica una diferencia significativa con respecto al control, con un nivel de significación de 0,05). (B) Ilustración que muestra los principales tipos de muerte celular, con las diferencias morfo-celulares correspondientes a cada una de ellas. (C) Fotografías que ponen de manifiesto las diferencias morfológicas surgidas entre las células (SK-MEL-1 y MEL-HO) tratadas y las de los grupos control. Las células fueron incubadas con una concentración de 3 μM de HY-CHAL durante 6, 12 y 24 horas. Al acabar cada uno de los correspondientes tratamientos, las células fueron observadas empleando un microscopio invertido de contraste de fases con una lente de magnificación 20X.

5. 2. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

La apoptosis es una forma de muerte celular ampliamente estudiada y que juega un papel fundamental en la regulación dinámica de las poblaciones celulares sanas. Las células tumorales poseen mecanismos moleculares que les permiten inhibir este fenómeno de muerte programada, por lo que forman poblaciones aberrantes que crecen con rapidez y que son capaces de extenderse hacia otros órganos o tejidos en los que no podrían sobrevivir normalmente. Por esta razón, la apoptosis conforma una diana farmacológica esencial para la identificación de compuestos químicos o productos naturales con actividad farmacológica y potencial anti-tumoral.

Actualmente existen muchas técnicas que permiten detectar, cuantificar y estudiar los diferentes procesos del metabolismo celular que ocurren durante la apoptosis, como la condensación y fragmentación de la cromatina, la externalización de la fosfatidilserina o un contenido de ADN inferior al encontrado en células en fase G₁.

5. 2. 1. Evaluación Morfológica por Tinción con Hoechst 33258

El Hoechst 33258 (bisbencimida) es un fluorocromo capaz de introducirse en el interior de las células, donde tiende a unirse al surco menor del ADN. Al ser un colorante nuclear, permite visualizar el estado de la cromatina, que tiende a condensarse y fragmentarse en células apoptóticas. Este experimento confirmó que en presencia de HY-CHAL las células de melanoma humano adquieren esta característica morfológica típica de la apoptosis (Figura 20A).

5. 2. 2. Detección de la Externalización de la Fosfatidilserina

Durante la apoptosis, la fosfatidilserina (un fosfolípido que normalmente se localiza en la capa interna de la membrana citoplasmática) queda expuesta hacia el exterior de la célula, por lo que su detección permite establecer si una célula ha entrado en este tipo de proceso de muerte o no. El cambio en la ubicación de la fosfatidilserina puede detectarse utilizando la tinción combinada de Anexina V-FITC con el marcador catiónico yoduro de propidio

(IP) y permite diferenciar entre células no apoptóticas (Anexina V-FITC $-/IP^-$), células en apoptosis temprana (Anexina V-FITC $+/IP^-$) y células necróticas (Anexina V-FITC $+/IP^+$). La señal de las moléculas empleadas como marcadores se detecta, procesa y analiza mediante citometría de flujo. Esta es una de las técnicas más utilizadas en la cuantificación y caracterización de los distintos tipos de muerte celular y constituye una técnica eficaz, fiable y de alta reproducibilidad experimental.

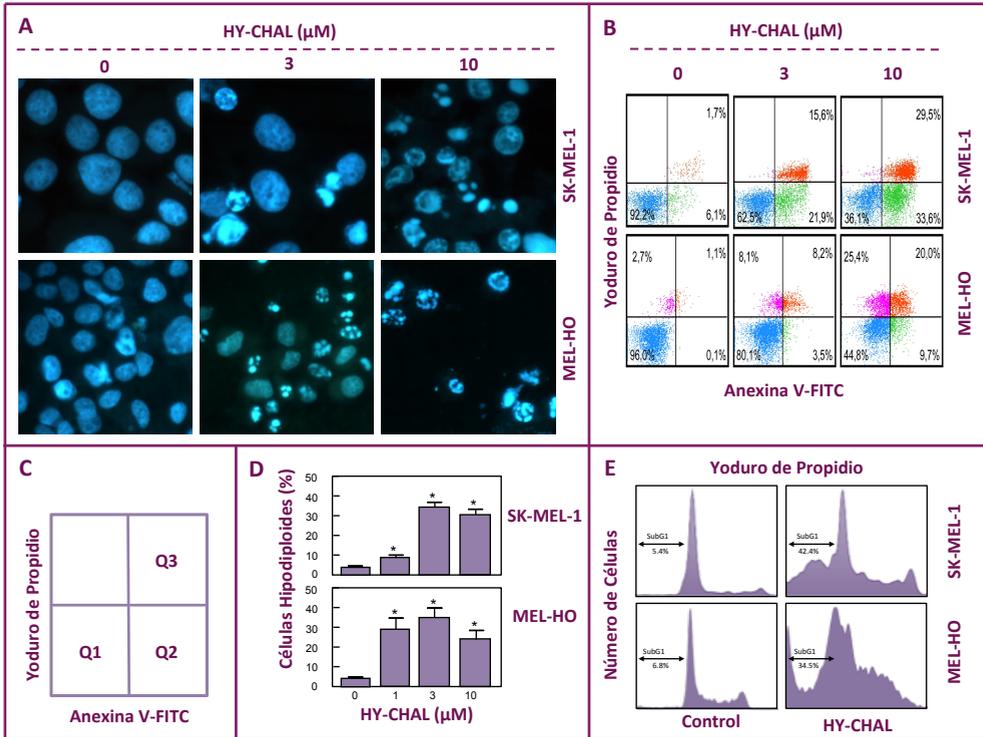


Figura 20. Inducción de Apoptosis. (A) Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de HY-CHAL durante un periodo de tiempo de 24 horas, posteriormente se tiñeron con bisbenzimidá y se obtuvieron imágenes de campos representativos, empleando para ello un microscopio de fluorescencia con cámara acoplada. (B) Las células se trataron con concentraciones crecientes de HY-CHAL (0, 3 y 10 μM) durante 24 horas, se tiñeron con Anexina V-FITC y yoduro de propidio, y fueron posteriormente analizadas mediante citometría de flujo. (C) Ilustración que representa los distintos cuadrantes en los que se clasifican las poblaciones celulares analizadas con la tinción de Anexina V-FITC y IP. El cuadrante 1 (Q1) representa a las células viables Anexina V-FITC $-/IP^-$, el cuadrante 2 (Q2) muestra las células apoptóticas Anexina V-FITC $+/IP^-$, por último, el cuadrante 3 (Q3) señala aquellas células Anexina V-FITC $+/IP^+$, consideradas necróticas. (D) Las células SK-MEL-1 y MEL-HO fueron incubadas con concentraciones crecientes de la chalcona híbrida y el porcentaje de células hipodiploides se determinó mediante citometría de flujo. Las barras representan las distintas medias obtenidas a partir de experimentos independientes realizados por triplicado bajo las mismas condiciones. Las barras representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes realizados por triplicado. El símbolo * destaca aquellos resultados que mostraron una $p < 0,05$ con respecto al grupo control. (E)

Histogramas representativos de los resultados obtenidos mediante citometría de flujo. Las células fueron incubadas con una concentración de HY-CHAL de 3 μM , seguidamente fueron fijadas, teñidas con yoduro de propidio y analizadas empleando la técnica de la citometría de flujo. Las células apoptóticas se encuentran en la región comprendida por la recta delimitada por flechas.

Al tratar a las SK-MEL-1 y las MEL-HO con concentraciones crecientes de HY-CHAL y analizar posteriormente los cambios en la localización de la fosfatidilserina, se pudo establecer una relación causal entre el aumento de la concentración del tratamiento y el incremento en el número de células apoptóticas (Figura 20B). Este hecho se vio reflejado en el aumento de células presentes en el cuadrante superior derecho (Q3), que se corresponde con aquellas células Anexina V-FITC⁺/IP⁻ (Figura 20C).

5. 2. 3. Detección de Células Hipodiploides

La pérdida de material genético puede utilizarse como método para la detección de células apoptóticas, cuyo ADN tiende a fragmentarse y perderse durante este proceso de muerte celular programada. El material genético que conserva su localización nuclear puede teñirse mediante el empleo de agentes intercalantes, como el IP, que podrán detectarse mediante citometría de flujo. Las células con una cantidad de ADN inferior a la encontrada en la fase G₁, llamadas células hipodiploides, se consideran apoptóticas.

Gracias a esta técnica, se reveló un un incremento en el número de células hipodiploides (apoptóticas) en respuesta al tratamiento con HY-CHAL (Figura 20D y 20E).

5. 3. ACTIVACIÓN DE LA RUTA DE LAS CASPASAS

Las caspasas son las moléculas ejecutoras más importantes en el proceso apoptótico y los mediadores principales en la iniciación, regulación y ejecución de la muerte celular por apoptosis. Se trata de una familia de proteínas con actividad proteasa y cuyos miembros se dividen en 3 categorías (Figura 21A): caspasas inflamatorias (caspasas 1, 4, 5 y 14), caspasas iniciadoras de la apoptosis (caspasas 2, 8, 9 y 10) y caspasas ejecutoras de la apoptosis (caspasas 3, 6 y 7). Todas las caspasas se sintetizan en forma de precursores inactivos (pro-caspasas), que se activan mediante escisión proteolítica en respuesta a señales inductoras de la apoptosis. Las caspasas iniciadoras 8 (apoptosis extrínseca) y 9 (apoptosis intrínseca) son las principales encargadas de iniciar la cascada proteolítica y facilitan la activación y la función de las caspasas ejecutoras, que a su vez actuarán sobre diversas dianas moleculares para inducir la muerte celular. Las caspasas se activan de manera secuencial, dando lugar al proceso conocido como cascada de las caspasas.

5. 3. 1. Detección de la Activación de las Caspasas

El análisis de las caspasas mediante la técnica del Western Blot es uno de los protocolos mejor establecidos para la determinación de la activación de las caspasas. Al emplear anticuerpos específicos para la detección de la isoforma inactiva, la activación de la caspasa se observará como la disminución o ausencia de la banda correspondiente con la longitud completa de la pro-caspasa y aparecerán fragmentos más pequeños que representan los productos de la escisión activadora.

El procedimiento experimental realizado con el objetivo de detectar la activación de la cascada de las caspasas consistió en la adición de concentraciones crecientes de HY-CHAL a las células de melanoma humano y exponerlas durante distintos tiempos a la chalcona híbrida. Posteriormente se obtuvieron los lisados correspondientes a cada grupo y se realizaron distintos Western Blots (Figura 21B) con el objetivo de detectar la presencia de los fragmentos específicos para las caspasas 3, 7, 8 y 9 (cuyos niveles aumentaron de manera directamente proporcional a la concentración de HY-CHAL y al tiempo del tratamiento), así como para

analizar los niveles de pro-caspasas (que disminuyeron tanto con el aumento de la concentración de la chalcona, como con el incremento de tiempo de exposición al tratamiento) de las caspasas 3, 7 y 9. Para asegurar una carga proteica similar en cada una de las calles del gel, en todos los experimentos se realizó una tinción con el colorante rojo Ponceau de manera previa a la detección con los anticuerpos específicos.

En el caso del estudio de la activación de las caspasas en la línea MEL-HO, las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de HY-CHAL, para ser posteriormente recogidas y procesadas tras 24 horas de exposición a la chalcona híbrida. Los lisados totales se analizaron mediante Western Blot. La β -actina se empleó como molécula indicadora de una carga proteica equivalente para todas las muestras analizadas. La Figura suplementaria S1A (Anexo) muestra el resultado de los ensayos dosis-respuesta y pone de manifiesto que una baja concentración de la chalcona (3 μ M) activa tanto a las caspasas ejecutoras 3/7 como a las iniciadoras 8 y 9.

5. 3. 2. Análisis de la Proteólisis de PARP

La poli (ADP-ribosa) polimerasa (también denominada PARP) es una enzima nuclear implicada en la reparación del ADN y es fragmentada principalmente por las caspasas 3 y 7. Este proceso genera un fragmento proteico característico que puede ser detectado mediante electroforesis y cuya presencia se considera un indicador claro de apoptosis. El análisis de la proteólisis de PARP constituye por tanto una forma indirecta para el estudio de la actividad de las caspasas.

El procedimiento realizado en este trabajo consistió en incubar las células con concentraciones crecientes de HY-CHAL durante distintos intervalos de tiempo, tras los cuales las muestras fueron recogidas, procesadas y lisadas para su posterior análisis mediante inmunoblot. De esta forma se confirmó la presencia de un fragmento de ~ 85 kDa al emplear anticuerpos anti-PARP (Figura 21B). Este tipo de fragmento proteico es el resultado típicamente característico de la acción de las caspasas sobre PARP y fue a partir de las 6 horas de tratamiento, utilizando una concentración de 3 μ M de HY-CHAL, cuando la presencia de este fragmento de ~ 85 kDa se hizo evidente.

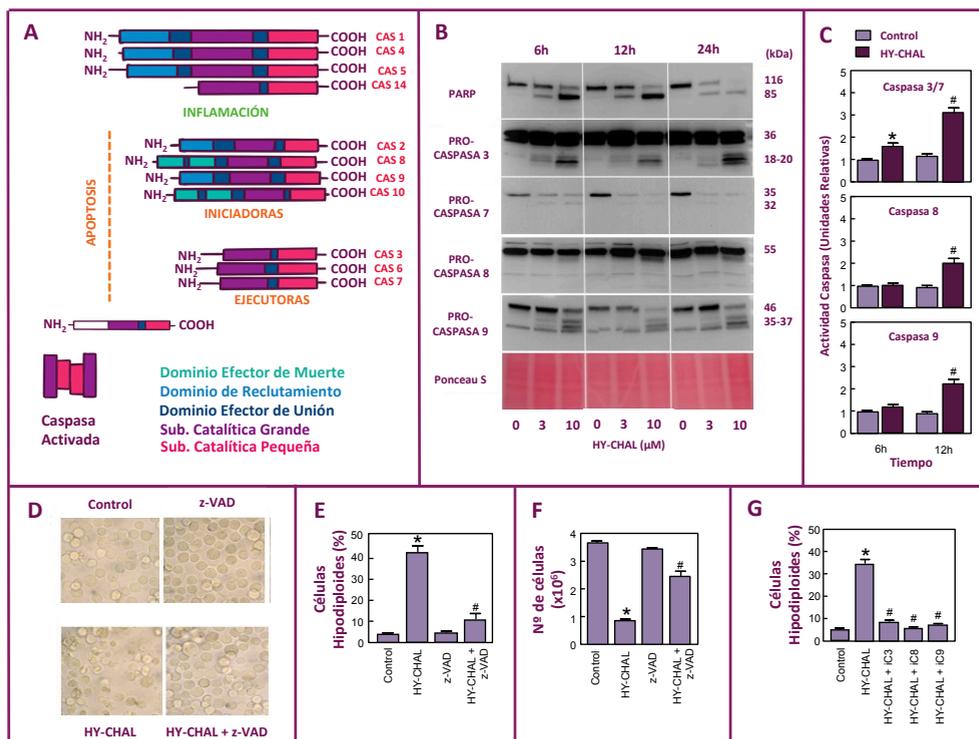


Figura 21. Análisis de las Caspasas. (A) Ilustración que muestra la estructura proteica de los distintos grupos dentro de la familia de las caspasas humanas. Estas se dividen en caspasas inflamatorias (1, 4, 5 y 14), iniciadoras (2, 8, 9 y 10) y ejecutoras (3, 6 y 7). Todas las caspasas poseen una subunidad catalítica pequeña y otra grande, que formarán un tetrámero al pasar a su conformación biológicamente activa. Las subunidades que se forman al fragmentarse los dominios de las pro-caspasas pueden detectarse como bandas de pesos moleculares específicos mediante inmunoblot. (B) Imagen del resultado de diversos experimentos de inmunoblot en los que las células de melanoma humano maligno se sometieron a concentraciones específicas de HY-CHAL (0, 3 y 10 μM) durante distintos intervalos de tiempo (6, 12 y 24 horas) para detectar los cambios en las concentraciones de PARP y pro-caspasas (zimógenos) de las caspasas ejecutoras 3 y 7 y de las caspasas iniciadoras 8 y 9. La tinción con rojo Ponceau se realizó para poder establecer, de manera previa a la realización de la inmunodetección, que todas las calles del gel habían sido cargadas con la misma concentración de proteínas. (C) Gráfico de barras que ilustra los cambios (Con respecto al grupo control) en la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9 entre las 6 y 12 horas de tratamiento con 3 μM de HY-CHAL. Se emplearon sustratos colorimétricos específicos para la determinación de la actividad de cada una de las caspasas. (D) Previamente al tratamiento con HY-CHAL (3 μM durante 24 horas), las células se pre-incubaron durante una hora con el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk a una concentración de 100 μM . Las imágenes se obtuvieron mediante un microscopio invertido de contraste de fases. (E) Las células SK-MEL-1 fueron expuestas a las mismas condiciones que en los experimentos descritos anteriormente (D), pero esta vez el objetivo fue analizar el número de células hipodiploides (apoptóticas) resultantes de la exposición a HY-CHAL, empleando para ello la citometría de flujo. Las barras representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes realizados por triplicado. El símbolo * destaca aquellos resultados que mostraron una $p < 0,05$ con respecto al grupo control. El símbolo # indica aquellos grupos experimentales en los que se obtuvo una $p < 0,05$ en comparación con las SK-MEL-1 expuestas únicamente a HY-CHAL. (F) Las células se

sometieron a las mismas condiciones que en (D) y se determinó su viabilidad empleando la técnica de exclusión del azul de tripán y un contador de células TC-10 (Bio-Rad). (G) Se utilizaron inhibidores específicos y selectivos para las caspasas 3 (z-DEVD-fmk a 50 μ M), 8 (z-IETD-fmk a 50 μ M) y 9 (z-LEHD-fmk a 50 μ M) para pre-incubar las células de melanoma humano maligno durante 1 hora y de manera previa a la adición de HY-CHAL a una concentración de 3 μ M. Las células apoptóticas se contabilizaron de la misma manera que en (E).

5. 3. 3. Análisis de la Actividad Caspasa

La inducción de la apoptosis está ligada íntimamente a la activación de las caspasas, por lo que el análisis de la actividad de estas proteasas constituye un marcador eficaz y fiable para la detección de células apoptóticas. Con este objetivo se procedió a la selección de sustratos tetrapeptídicos colorimétricos específicos para las principales caspasas (DEVD-pNA, IETD-pNA y LEHD-pNA para la caspasa 3/7, caspasa 8 y caspasa 9, respectivamente) que permitieran establecer el nivel de activación de cada una de estas moléculas esenciales para el proceso apoptótico.

Los resultados (Figura 21C) revelaron que el tratamiento durante 6 horas con 3 μ M de HY-CHAL indujo la activación de las caspasas ejecutoras (caspasa 3 y caspasa 7) en las células SK-MEL-1, y que la actividad enzimática fue aún más pronunciada con un tiempo de incubación más prolongado (12 horas). En este último tiempo de tratamiento pudo observarse también un incremento en la actividad de las caspasas iniciadoras (caspasa 8 y caspasa 9). Resultados similares fueron obtenidos en la línea MEL-HO (Figura suplementaria 1SB del anexo).

5. 3. 4. Efecto de la Exposición a Inhibidores de Caspasas

La adición de inhibidores generales de las caspasas permite dilucidar la importancia y el grado de implicación de la cascada de las caspasas dentro del mecanismo de muerte que genera un compuesto citotóxico. Del mismo modo, también pueden utilizarse inhibidores específicos para una determinada caspasa con el objetivo de analizar su relevancia individual. En este trabajo se decidió utilizar el inhibidor general z-VAD-fmk, así como inhibidores específicos para las caspasas 3/7, 8 y 9.

- **z-VAD-fmk:** Con el objetivo de estudiar la relación entre la actividad de las caspasas y el incremento de la muerte celular en las células SK-

MEL-1 y MEL-HO expuestas a HY-CHAL, se diseñaron una serie de experimentos en los que las células fueron pre-tratadas con 100 μ M de z-VAD-fmk y cultivadas posteriormente en presencia o ausencia de HY-CHAL (en función del grupo experimental correspondiente) durante 24 horas. Los resultados indicaron que la preincubación con z-VAD-fmk protegió tanto a las células SK-MEL-1 (Figuras 21D, 21E y 21F) como a las MEL-HO (Figuras suplementarias S2A y S2B del Anexo) del daño provocado por HY-CHAL, como se aprecia en la visualización de las imágenes de microscopía de contraste de fases. Además, el inhibidor general de las caspasas bloqueó en gran medida el aumento del porcentaje de células apoptóticas por HY-CHAL, determinado por citometría de flujo, y consecuentemente aumentó el número de células viables, analizado mediante el método del azul de tripán. Esto pone de manifiesto la importancia de las caspasas como mecanismo enzimático clave en la muerte desencadenada por HY-CHAL en las células de melanoma humano.

- **Inhibidores Específicos:** Para evaluar la relevancia individual de cada una de las caspasas, en otro grupo de experimentos las células se pre-incubaron con inhibidores selectivos para las caspasas 3/7, 8 y 9 (Figura 21G). Estos inhibidores bloquearon completamente la apoptosis desencadenada por el tratamiento con HY-CHAL; el porcentaje de células hipodiploides fue similar en las células control respecto a las células que fueron tratadas con la chalcona en combinación con los inhibidores específicos de las caspasas.

5. 4. CAMBIOS EN LAS PROTEÍNAS BCL-2

La apoptosis es un proceso activo de muerte celular que puede originarse de dos maneras distintas: mediante la activación de receptores de muerte (vía extrínseca de la apoptosis) o por señalización mitocondrial (vía intrínseca de la apoptosis). Las proteínas de la familia BCL-2 son un grupo de moléculas señalizadoras que actúan regulando ambas ramas de la apoptosis, aunque son especialmente importantes en la vía intrínseca (Figura 22). Las proteínas BCL-2 se componen de miembros tanto pro-apoptóticos como anti-apoptóticos y el equilibrio entre las distintas moléculas que conforman esta familia determinará si una célula comienza el proceso de muerte o continúa su ciclo vital.

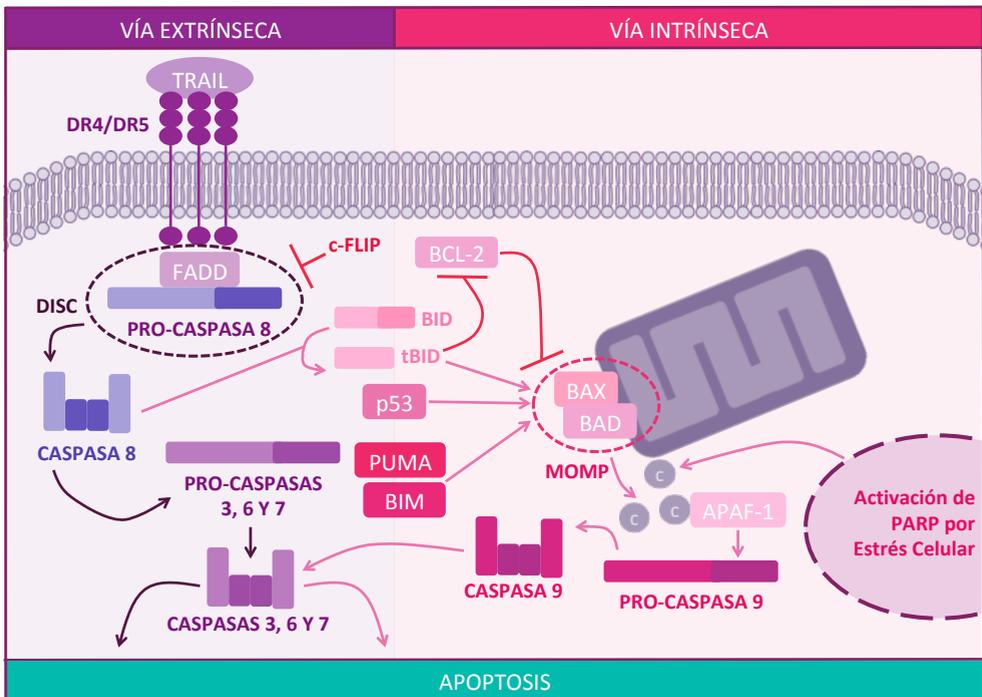


Figura 22. Mecanismos de Inducción de la Apoptosis. La unión de TRAIL a su receptor conduce al reclutamiento de la molécula adaptadora FADD. La unión de la pro-caspasa 8 a FADD lleva a la formación del complejo DISC, que resulta en la activación de la caspasa 8. La caspasa 8 es entonces capaz de activar a las caspasas ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7) o actuar sobre BID para la formación de tBID. La translocación de tBID a la mitocondria provoca la unión de BAX y BAK, que formarán oligómeros capaces de alterar la permeabilidad y el potencial de la membrana mitocondrial. La salida del citocromo c favorecerá la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa 9. En este estudio, se eligieron como moléculas clave para el análisis de los mecanismos de activación de la

apoptosis a la caspasa ejecutora 3, las caspasas iniciadoras 8 (esencial en la vía extrínseca) y 9 (especialmente relevante en la vía intrínseca) la polimerasa PARP, las proteínas anti-apoptóticas BCL-2, BCL-xL y MCL-1, las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK, las proteínas facilitadoras de la apoptosis BIM y BID y los niveles de TRAIL y sus receptores DR4 y DR5.

5. 4. 1. Proteínas BCL-2 Anti-Apoptóticas

Los miembros anti-apoptóticos de la familia de las proteínas BCL-2 (como BCL-2, BCL-xL, BCL-w o MCL-1) tienen la función principal de unirse a sus homólogos pro-apoptóticos para inhibir el proceso de muerte celular y favorecer la supervivencia. Un fenómeno que ha sido observado con frecuencia en células neoplásicas es la sobre-expresión de este grupo anti-apoptótico de proteínas.

Debido a la importante influencia que ejercen los miembros anti-apoptóticos de la familia de las proteínas BCL-2 sobre la supervivencia celular y a su potencial como diana farmacológica y de protección contra el cáncer, se determinó que los posibles cambios en los patrones de expresión de estas proteínas constituían un punto de especial interés para la determinación de la capacidad terapéutica de la chalcona híbrida HY-CHAL.

Con este fin las células SK-MEL-1 se incubaron con concentraciones crecientes de HY-CHAL durante distintos periodos de tiempo, se prepararon los lisados celulares y se analizaron mediante inmunoblots los cambios en la expresión de proteínas de la familia BCL-2 con actividad anti-apoptótica BCL-2, BCL-xL y MCL-1 (Figura 23A).

Los resultados mostraron una disminución evidente en los niveles de BCL-2 tras 24 horas de tratamiento con la chalcona híbrida, tanto a 3 μ M como a 10 μ M. A pesar de que a una concentración de 3 μ M de HY-CHAL esta parezca regular positivamente a MCL-1, los niveles de este factor promotor de la supervivencia descendieron tras las 6 y 12 horas del tratamiento con una concentración de 10 μ M de la chalcona. En contraste, los niveles de BCL-xL no variaron de manera significativa bajo ninguna de las condiciones analizadas.

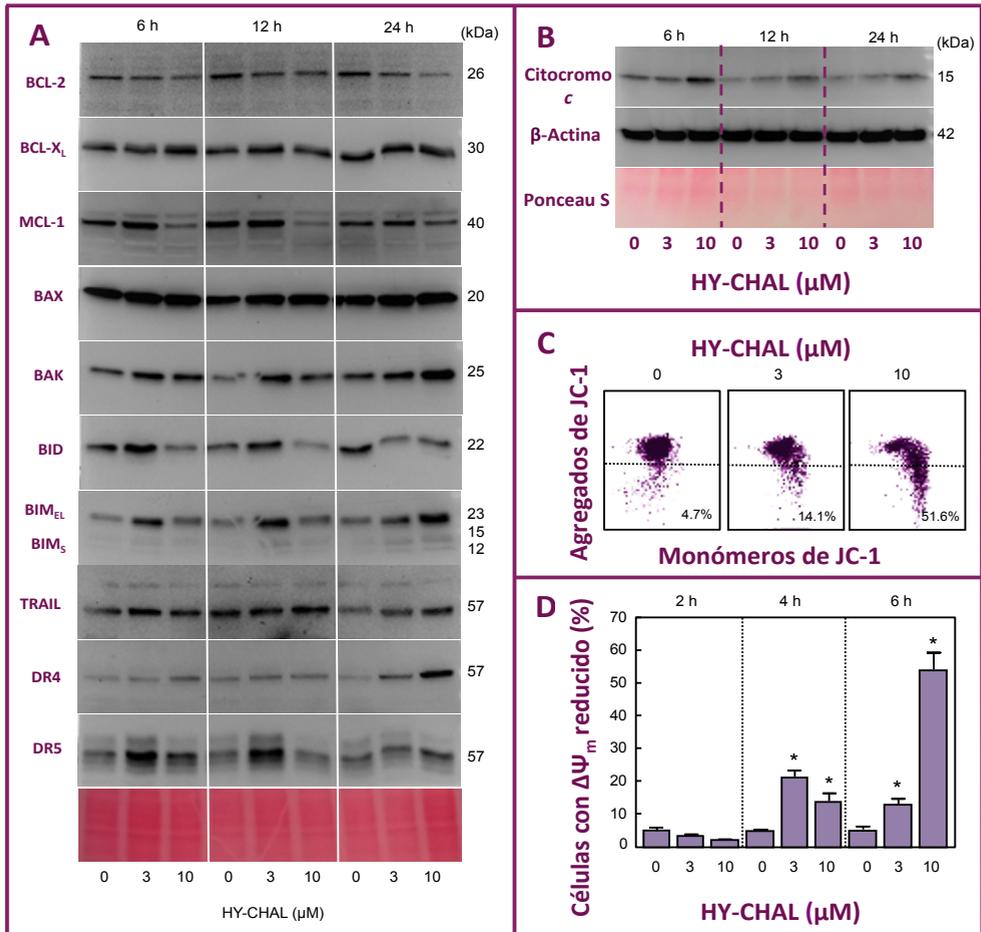


Figura 23. Papel de la Mitochondria, TRAIL y los Receptores de Muerte en el proceso apoptótico desencadenado por HY-CHAL en Células de Melanoma. Esta figura muestra el papel de la mitocondria, TRAIL y los receptores de muerte en la actividad apoptótica de HY-CHAL sobre las células SK-MEL-1. (A) Las células fueron tratadas con concentraciones específicas de HY-CHAL durante periodos de tiempo predeterminados. Los lisados totales generados a partir de las muestras se incubaron con anticuerpos específicos para distintos miembros de la familia de las BCL-2, el ligando TRAIL y los receptores de muerte DR4 y DR5 para su posterior análisis mediante inmunoblot. Para asegurar una carga de proteínas igual en todos los pocillos, de manera previa a la realización del western blot, se procedió a la exposición de las membranas a la tinción con Ponceau S. (B) Las células fueron incubadas con una concentración de 3 μM de la indol-chalcona durante los tiempos de incubación indicados. Una vez obtenidas las fracciones citosólicas se procedió al análisis de los niveles de citocromo c utilizando la técnica del inmunoblot. La carga proteica homogénea para todas las calles se aseguró mediante la tinción con Ponceau S. (C) Las células SK-MEL-1 se incubaron con las concentraciones de HY-CHAL indicadas durante 6 horas y el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) se determinó mediante citometría de flujo, empleando para ello la sonda JC-1. (D) Las células se dividieron en distintos grupos experimentales, algunos de los cuales fueron sometidos a condiciones control mientras que otros se expusieron a determinadas concentraciones de HY-CHAL durante periodos de tiempo específicos. El porcentaje de células cuyo $\Delta\Psi_m$ se encontraba reducido se cuantificó mediante citometría de flujo, utilizando la sonda JC-1.

5. 4. 2. Proteínas BCL-2 Pro-Apoptóticas Multidominio

En la ruta canónica de la muerte celular derivada del daño mitocondrial, los miembros pro-apoptóticos de la familia de las proteínas BCL-2, como BAX, BAD o BCL-xS, actúan como mediadores en la liberación de citocromo *c* desde la mitocondria. Este citocromo *c* provoca la iniciación de la cascada de las caspasas mediante la activación de la caspasa 9, que podrá entonces activar a las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7. Estas últimas son las moléculas implicadas en última instancia en provocar la muerte por apoptosis.

En lo referente al grupo de proteínas pro-apoptóticas de la familia BCL-2, se decidió analizar tanto a BAX como a BAK (Figura 23A). Los niveles de ambas moléculas reguladoras parecieron aumentar de manera dependiente del tiempo.

5. 4. 3. Proteínas BCL-2 Pro-Apoptóticas Solo BH3

A pesar de no activar de manera directa la ruta intrínseca de la apoptosis, se considera que las proteínas BCL-2 que cuentan con únicamente el dominio BH3 (como PUMA, BIM y BID) son las verdaderas efectoras de la vía canónica de la apoptosis provocada por el daño mitocondrial. Estas proteínas ejercen su función, principalmente, mediante la activación de BAX y/o BAK y su actividad puede ser suprimida por miembros anti-apoptóticos de su propia familia.

Debido a la naturaleza de estas moléculas activadoras y a las consecuencias metabólicas que provocan, en este estudio se decidió explorar si este tipo de miembros de las BCL-2 interviene en el mecanismo de acción de HY-CHAL. Para ello procedimos a analizar los niveles de BIM y BID a través de experimentos con concentraciones y tiempos de exposición crecientes (Figura 23A).

Estos ensayos revelaron la inducción de la isoforma BimEL tras 6 horas de tratamiento con HY-CHAL a una concentración de 3 μ M y el aumento de los niveles de todas las isoformas principales de BIM (BimEL, BimL y BimS) a las 24 horas de tratamiento a 3 y 10 μ M de concentración.

Se observó un ligero incremento en los niveles de BID a las 6 y 12 horas del tratamiento con una concentración de 3 μ M de HY-CHAL. En contraste, al

ser sometidas las SK-MEL-1 a la concentración máxima de HY-CHAL (10 μM), se pudo apreciar una disminución en los niveles de BID a estos mismos tiempos (6 y 12 horas). Después de 24 horas de tratamiento, ambas concentraciones de HY-CHAL parecieron regular negativamente la expresión de esta proteína.

5. 5. CAMBIOS EN TRAIL, DR4 Y DR5

Mientras que la ruta intrínseca de la apoptosis es activada por estímulos intracelulares y depende de la liberación de factores pro-apoptóticos desde la mitocondria, la vía extrínseca se inicia por la presencia de los ligandos proteicos de los receptores de muerte, que se encuentran típicamente en la superficie celular. Los ligandos más conocidos de los receptores de muerte son los que pertenecen a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) y entre ellos podemos encontrar tanto al propio TNF como a FasL o TRAIL.

En el caso del cáncer, se ha encontrado que algunos de los compuestos con mayor potencial terapéutico para el tratamiento de distintas variedades tumorales inducen la activación de la apoptosis a través de TRAIL. Este ligando se une a su receptor y provoca en él una serie de cambios conformacionales que favorecen el reclutamiento de varias proteínas (como FADD y la pro-caspasa 8), que formarán el complejo de señalización inductor de muerte (DISC). Este complejo induce la activación proteolítica de la pro-caspasa 8, que al romperse permite que la caspasa 8 ya madura se libere e inicie la denominada cascada de las caspasas.

Como HY-CHAL da muestras sólidas de inducir la activación de la caspasa 8, se decidió examinar si este hecho está relacionado con un posible fenómeno de regulación positiva de TRAIL o de dos de sus principales receptores, DR4 y DR5. Para poner a prueba esta hipótesis, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de la chalcona híbrida durante distintos intervalos de tiempo (Figura 23A). Las muestras se recogieron y procesaron para garantizar las condiciones óptimas para realizar un Western Blot con ellas y analizar los niveles de TRAIL, DR4 y DR5. De esta manera, los resultados obtenidos mostraron que HY-CHAL a bajas concentraciones (3 μ M) conduce a una sobre-expresión de DR5 a las 6 y 12 horas, mientras que los niveles de DR4 y TRAIL apenas parecen variar (siendo esta diferencia aún más notable después de las 24 horas de tratamiento). Así podemos deducir que estos tres factores analizados siguen distintas cinéticas y se regulan de forma diferencial en células SK-MEL-1 tratadas con nuestra indol-chalcona.

5. 6. ALTERACIONES MITOCONDRIALES

5. 6. 1. Liberación de Citocromo *c*

En las células, el citocromo *c* se encuentra en el espacio intermembrana de las mitocondrias, donde funciona como molécula transportadora de electrones en la cadena respiratoria. Diversos tipos de estímulos proapoptóticos son capaces de inducir el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, lo que facilitaría la comunicación molecular entre los distintos compartimentos mitocondriales y provocaría el aumento de la capacidad de movilización del citocromo *c* desde el interior de la mitocondria hacia el citoplasma de la célula. Una vez en ahí, el citocromo *c* actúa como intermediario en la activación de APAF-1, que es una de las moléculas requeridas para la maduración proteolítica de la caspasa 9, cuya actividad es esencial en la ruta de señalización de la apoptosis intrínseca. No obstante, hay que destacar que la presencia de citocromo *c* en el citosol no conduce invariablemente a la muerte celular. Diversos estudios han demostrado que esta molécula desempeña un papel importante en otras funciones celulares, como la diferenciación (181).

Debido a que HY-CHAL induce que las células de melanoma maligno humano SK-MEL-1 y MEL-HO entren en el proceso apoptótico de muerte celular, en este trabajo se decidió establecer el papel que juega la chalcona híbrida en el proceso de movilización del citocromo *c* así como estudiar los posibles patrones en su liberación.

Para ello se escogió el método del fraccionamiento subcelular seguido por un análisis mediante Western Blot. Primero se analizó la respuesta de las SK-MEL-1 ante el tratamiento a lo largo de varios periodos de tiempo, tras los cuales las muestras fueron recogidas y procesadas de tal manera que las distintas fracciones celulares se separaron para un análisis individual empleando la técnica del inmunoblot. Los resultados mostraron un aumento significativo en la cantidad de citocromo *c* citosólico y su presencia fue evidente a todos los tiempos analizados después de la exposición a una concentración de 3 μ M de HY-CHAL (Figura 23B).

En el caso de las células MEL-HO, también se examinó si el mecanismo de muerte desencadenado por la chalcona híbrida implicaba también la

liberación mitocondrial de citocromo *c*. Los resultados revelaron un importante incremento de esta hemoproteína en el citosol celular, incluso tras la exposición a la concentración de HY-CHAL más baja analizada, 1 μM (Figura suplementaria 1SB del Anexo).

5. 6. 2. Disminución del Potencial de Membrana Mitocondrial

El mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) resulta crítico para el correcto funcionamiento de la cadena respiratoria de electrones, cuyo objetivo principal es generar la energía necesaria, en forma de ATP, para el desempeño de las funciones fisiológicas de la célula. El aumento en la permeabilidad de esta estructura sub-celular conduce normalmente a la formación de poros de transición (MPTP), con el subsecuente colapso de $\Delta\Psi_m$ y el aumento en la movilización de citocromo *c* hacia el citosol. La disipación del potencial de membrana mitocondrial constituye por tanto otro de los eventos clave durante la muerte celular por apoptosis mediada por la mitocondria (182, 183).

Debido a la importancia de esta característica intrínseca de la mitocondria, en este trabajo se procedió a realizar el análisis de la disipación total o parcial de $\Delta\Psi_m$, su relación con el fenómeno de movilización del citocromo *c* y su influencia sobre el proceso apoptótico controlado por la mitocondria.

Con este fin las células SK-MEL-1 y MEL-HO fueron incubadas con concentraciones crecientes de HY-CHAL durante 6 horas, tras lo cual se añadió la sonda fluorescente de naturaleza catiónica JC-1 y se analizaron por citometría de flujo (Figura 23C). El efecto observado en las células expuestas a estas condiciones experimentales consistió en la detección de una pérdida significativa de los niveles de $\Delta\Psi_m$, lo que sugiere que la disipación de $\Delta\Psi_m$ podría estar implicada. Los niveles máximos en la reducción de $\Delta\Psi_m$ en las SK-MEL-1 se obtuvieron transcurridas 6 horas tras el tratamiento con 10 μM de la indol-chalcona híbrida (Figura 23D), resultados muy similares a los obtenidos en las células MEL-HO (Figura suplementaria S3 del Anexo).

5. 7. ALTERACIÓN DE LA MAQUINARIA NEOPLÁSICA

5. 7. 1. Aumento de ROS y Efecto del Glutati6n

Las c6lulas cancer6genas tienden a producir ROS de forma excesiva, lo que ha demostrado promover la transformaci6n oncog6nica de la c6lula mediante la inducci6n de inestabilidad gen6tica, la modificaci6n en la expresi6n de una gran variedad de genes y la alteraci6n en los patrones de se6alizacion celular (Figura 24A). Adem6s, la producci6n aumentada de ROS puede afectar a la sensibilidad de la c6lula cancer6gena ante los agentes anti-neopl6sicos. No obstante, esta capacidad de adaptaci6n molecular a los da6os derivados de la actividad de las especies reactivas del ox6geno tiene un l6mite y muchos f6rmacos contra el c6ncer act6an promoviendo la generaci6n de niveles de ROS citot6xicos incluso para las c6lulas oncog6nicas.

Para determinar si la capacidad pro-apopt6tica de HY-CHAL est6 relacionada con la inducci6n de la producci6n de ROS, las c6lulas SK-MEL-1 tratadas con la chalcona h6brida se incubaron con el fluorocromo H₂DCF-DA y se analizaron por citometr6a de flujo (Figura 24B). Los resultados revelaron que HY-CHAL a una concentraci6n de 3 μ M provoca una elevaci6n r6pida (1 hora) en los niveles de ROS.

Los niveles de ROS aumentaron ~2,5-veces tras exponer a las c6lulas SK MEL-1 a una concentraci6n de 3 μ M de HY-CHAL, y esos niveles fueron significativamente menores (Figura 24C) en las c6lulas preincubadas con el antioxidante glutati6n (GSH, 5mM). Estos resultados validan la idea de que la muerte celular inducida por la chalcona h6brida es dependiente de la generaci6n de ROS (Figura 24D).

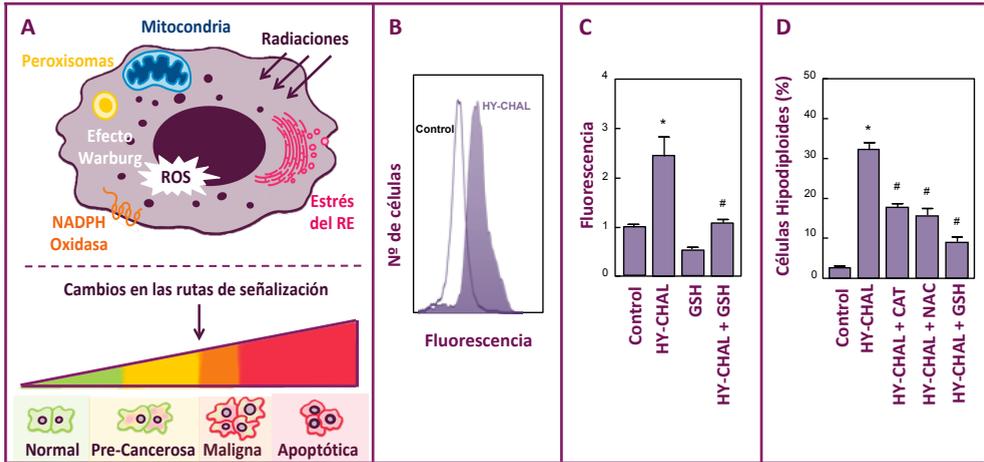


Figura 24. Importancia de ROS en la Muerte Celular Inducida por HY-CHAL. (A) Ilustración que muestra las principales fuentes biológicas y no biológicas de la producción de ROS. Tanto la actividad de la enzima NOX (NADPH oxidasa) como la de la mitocondria constituyen algunas de las principales fuentes de origen de las especies reactivas del oxígeno. Estas son transformadas usualmente en H_2O_2 gracias a SOD (superóxido dismutasa). Posteriormente el H_2O_2 se reducirá a H_2O por la acción de los antioxidantes intracelulares (como PRX, GPX o CAT). Cuando los niveles de H_2O_2 sobrepasan la capacidad de la maquinaria celular para continuar con su transformación, comienzan a generarse radicales libres mediante la reacción de Fenton. Al empezar a acumularse, estas moléculas inestables comenzarán a provocar daños en el material genético, los lípidos y las proteínas. Los efectos provocados por ROS en una célula concreta dependen de los niveles que se acumulen dentro de la misma. Las células normales poseen de manera habitual una concentración de ROS bastante baja y controlada por diversos mecanismos de eliminación. En estas condiciones, ROS actúa como molécula señalizadora en procesos de homeostasia, limitando la proliferación y la supervivencia. La tasa de crecimiento aumentada que se da en las células pre-neoplásicas genera una sobreproducción de ROS, cuya concentración elevada facilita la aparición de características tumorales, daña el ADN (provocando el fenómeno de inestabilidad genética y/o facilitando la activación de oncogenes y desactivación de genes supresores de tumores) y favorece la proliferación y supervivencia. En células cancerígenas, los niveles de ROS son bastante elevados pero se compensan con una capacidad celular antioxidante mejorada y que permite el crecimiento del tumor. Cuando se sobrepasa el umbral de la capacidad de los antioxidantes para neutralizar ROS, este comienza a generar una respuesta citotóxica y pro-apoptótica en la célula. (B) Histograma que representa los datos obtenidos mediante citometría de flujo sobre la fluorescencia de la oxidación del H_2DCF -DA después de tratar las SK-MEL-1 con $3 \mu M$ de HY-CHAL durante 1 hora. A la izquierda se muestra el control, mientras que la representación del tratamiento se encuentra a la derecha. (C) Las células fueron pre-tratadas con catalasa (500 unidades/ml), *N*-acetil-L-cisteína (5 mM) o glutatión (5 mM) antes de exponerse al tratamiento con $3 \mu M$ de HY-CHAL durante 24 horas. Después de este periodo de incubación, el porcentaje de células hipodiploides se determinó mediante citometría de flujo. (D) Datos sobre la fluorescencia obtenida a partir de la oxidación del H_2DCF -DA en células pre-tratadas con 5 mM de glutatión durante 2 horas, tras lo cual las células fueron expuestas a una concentración de $3 \mu M$ de HY-CHAL durante 1 hora. El símbolo * señala aquellos experimentos con una $p < 0,05$ con respecto al control, mientras que # muestra los grupos experimentales con una $p < 0,05$ en comparación con el grupo tratado.

5. 7. 2. Activación de la Vía MAPK

La vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) se encuentra alterada en gran parte de los melanomas y suele implicar una activación constitutiva de los genes NRAS (25%) o BRAF (50%) (184). En la mayoría de los casos esta característica genética del melanoma es atribuible a la variante oncogénica de BRAF llamada BRAF V600E (Figura 25A). La familia de las MAPK está formada por las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1 y ERK2), las quinasas c-Jun N-terminales (JNK1, JNK2 y JNK3) y las distintas isoformas de p38 (MAPK11, MAPK12, MAPK13 y MAPK14), ERK3 (MAPK6), ERK4 (MAPK4), ERK5 (MAPK7) y ERK7/8 (MAPK15) (185, 186).

Debido a la gran influencia que ejerce la ruta de las MAPK sobre procesos biológicos tan importantes como la proliferación, la supervivencia o la muerte celular, se decidió analizar la posible alteración de esta ruta en células SK-MEL-1 expuestas a la chalcona híbrida. Con este objetivo las células se trataron con concentraciones crecientes de HY-CHAL durante distintos periodos de tiempo y la activación de las MAPK se determinó posteriormente realizando la técnica del Western Blot y empleando anticuerpos específicos. Los resultados mostraron que la chalcona induce la fosforilación (activación) de ERK1/2, JNK y p38. Todas las MAPK analizadas mostraron un aumento en los niveles de sus variantes fosforiladas tras solo 1 hora de tratamiento y los niveles de dichas isoformas activas permanecieron significativamente elevados hasta las 6 horas de exposición a HY-CHAL, siguiendo patrones cinéticos similares y dependientes de la concentración del tratamiento (Figura 25B). Es interesante destacar la existencia de un fenómeno de regulación negativa en la cantidad total de ERK1/2 después de exponer a las células SK-MEL-1 con 10 μ M de HY-CHAL.

5. 7. 3. Inhibición de la Vía del AKT

AKT es una proteína quinasa de serina/treonina que también recibe el nombre de proteína quinasa B (PKB). Juega un papel esencial en múltiples procesos biológicos, tales como la síntesis de proteínas, la proliferación, la progresión del ciclo celular, la supervivencia, la migración y el metabolismo. Se trata de una molécula que se puede encontrar altamente activada en distintos tipos de cánceres, como en el de pulmón, ovario o páncreas. En el caso específico del melanoma, las principales mutaciones que resultan en

la activación patogénica de la vía del AKT suelen ocurrir en los genes NRAS (15-20%) o PTEN (20-30%) (187, 188). Esta alteración se encuentra íntimamente relacionada con la capacidad metastásica del tumor y aumenta el riesgo de desarrollar resistencia a los tratamientos. Numerosos fitoquímicos (como la acacetina o la isoangustona A) han demostrado inhibir la proliferación y progresión tumoral y favorecer el proceso apoptótico mediante la regulación indirecta de distintos factores de señalización relacionados con la vía del PI3K/AKT/mTOR (189).

Para investigar la influencia que ejerce AKT en el mecanismo de muerte activado por la chalcona híbrida, se analizó el grado de fosforilación de la serina 473 mediante inmunoblot (Figura 25C). Este residuo ha de encontrarse fosforilado para que el enzima presente una conformación activa. Los resultados mostraron niveles elevados de fosfo-AKT en las células de melanoma humano SK-MEL-1 y que su activación disminuyó de manera dependiente del tiempo al exponer las células a la indol-chalcona.

AKT es también capaz de regular la progresión dentro del ciclo celular mediante la interacción con GSK-3 β . AKT actúa evitando que esta glucógeno sintasa quinasa fosfore y degrade a la ciclina D1 (mediante la fosforilación de su serina 9), lo que resulta en la regulación negativa de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas p27 (que normalmente actúan como un potente supresor tumoral) y p21 (principal diana transcripcional de p53) (190, 200).

La GSK-3 β es una isoforma de GSK-3 y es una proteína quinasa de serina/treonina que fosforila más de 100 moléculas distintas (201). En células normales suele encontrarse activada pero su regulación negativa (por fosforilación de su serina 9) también es necesaria para el correcto mantenimiento de la homeostasis celular (202). Se trata de una enzima compleja, con reconocida capacidad anti-tumoral pero cuya expresión aberrante es capaz de ejercer un efecto proto-oncogénico que permite aumentar la capacidad de supervivencia, proliferación y metástasis.

Para explorar el efecto de HY-CHAL sobre la actividad de GSK-3 β , se procedió a realizar experimentos a distintas concentraciones de tratamiento y durante intervalos temporales variados. Mediante la determinación de los niveles de serina 9 fosforilada de GSK-3 β se pudo medir la concentración de su isoforma inactiva, cuyos niveles aumentaron

significativamente tras tan solo 1 hora de exposición a una concentración de 3 μM de HY-CHAL.

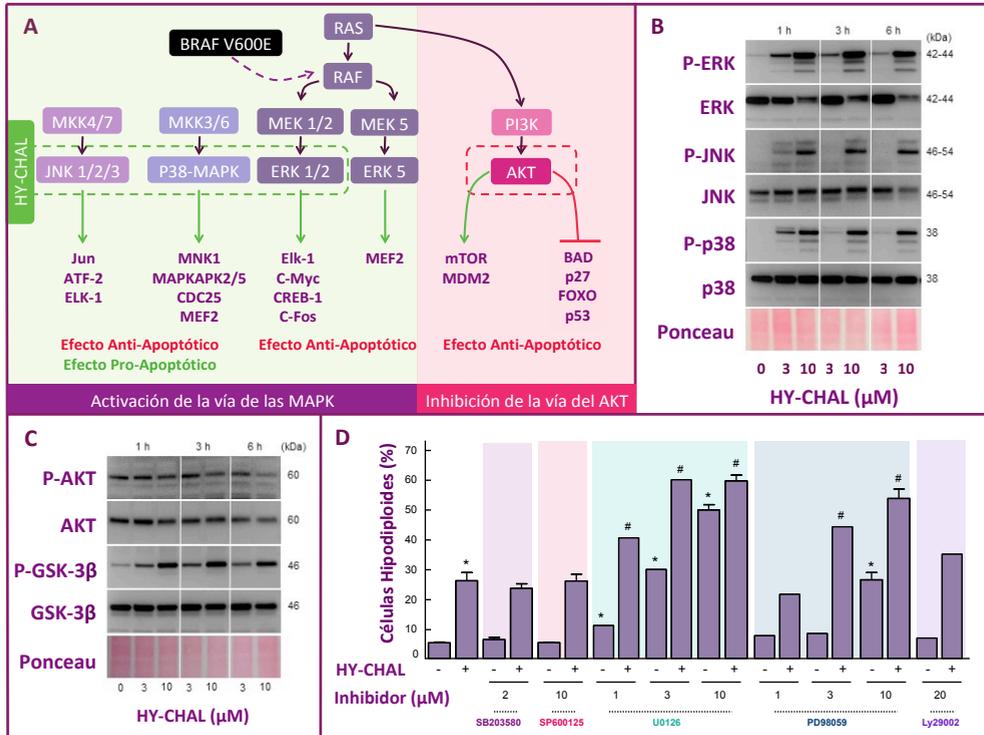


Figura 25. Cambios en la Ruta de las MAPK y AKT. (A) Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) fosforilan residuos de serina o treonina de sus sustratos específicos en respuesta a estímulos a los que son sensibles (como señales de crecimiento o estrés celular). Son capaces de modular la expresión de ciertos genes y participan en la regulación de la mitosis, la proliferación, la motilidad, el metabolismo y la muerte celular por apoptosis. La familia de las MAPK se divide en tres grupos convencionales (ERK, JNK y p38^{MAPK}) y un grupo adicional (ERK3, ERK4, ERK5 y ERK7/8). Las quinasas JNK y p38^{MAPK} son sensibles a moléculas relacionadas con el estrés celular y responden ante agresiones como la radiación o la presencia de citoquinas pro-inflamatorias. La naturaleza pro-apoptótica o anti-apoptótica de la respuesta celular que desencadenan estas MAPK ante estos estímulos dañinos depende tanto del tipo celular como de la propia naturaleza de la lesión. Las investigaciones sucesivas sobre el grupo de las ERK han demostrado que intervienen en procesos de señalización implicados en la proliferación, la diferenciación, la reorganización del citoesqueleto, la migración, la apoptosis y la respuesta celular al estrés. En el caso del melanoma, se ha establecido una relación entre la exposición a la radiación ultravioleta y la sobre-expresión conjunta de ERK y EGFR. (B) Resultados experimentales obtenidos tras exponer a las SK-MEL-1 a concentraciones de 3 y 10 μM de HY-CHAL durante 1, 3 y 6 horas. Se aprecia una relación directamente proporcional entre la fosforilación de ERK1/2, JNK y p38^{MAPK} y la concentración de la chalcona híbrida. (C) Los resultados de los inmunoblots expuestos muestran que la fosforilación de AKT y GSK-3 β es dependiente de la concentración de HY-CHAL y del tiempo de tratamiento. En este experimento, las muestras fueron lisadas y utilizadas para la realización de inmunoblots, empleando para ello anticuerpos específicos para cada una de las quinasas analizadas. La tinción con Ponceau S permitió comprobar la homogeneidad en la cantidad de proteínas de cada muestra

experimental. (D) Gráfico de barras que ilustra los cambios en el porcentaje de células apoptóticas en muestras expuestas a condiciones control y aquellas tratadas con HY-CHAL a una concentración de 3 μM en combinación o no con inhibidores de p38^{MAPK} (SB203580 a 2 μM), JNK (SP600125 a 10 μM), MEK1/2 (U0126 y PD98059 a concentraciones de 1, 3 y 10 μM) y PI3K (LY294002 a 20 μM). Todos estos tratamientos se prolongaron durante 24 horas y el porcentaje de células hipodiploides se determinó mediante la tinción de las células con yoduro de propidio y la realización de la técnica de la citometría de flujo. Las barras representan la media \pm error estándar de dos experimentos independientes realizados por triplicados. El símbolo * indica aquellos ensayos en los que encontramos una $p < 0,05$ en comparación con los controles. # Señala aquellos grupos en los que existe una $p < 0,05$ en comparación con las SK-MEL-1 tratadas con HY-CHAL y no pre-incubadas con ningún inhibidor.

5. 7. 4. Efecto de los Inhibidores de las rutas MAPK y PI3K sobre la Muerte Celular

La adición de inhibidores específicos ha demostrado ser una de las metodologías más útiles para el estudio de los fenómenos de señalización que forman parte de las distintas rutas metabólicas conocidas. En este trabajo se decidió emplear el pre-tratamiento con inhibidores específicos para distintos miembros de la ruta de señalización de las MAPK (p38^{MAPK} , JNK/SAPK y MEK1/2) y del PI3K (PI3K) para investigar tanto la importancia general de cada una de las vías dentro del mecanismo de muerte inducido por HY-CHAL como el papel que juegan de manera individual las moléculas señalizadoras analizadas.

El número de células hipodiploides (apoptóticas) fue empleado como parámetro de la eficacia de los inhibidores en cuanto al posible grado de bloqueo del fenómeno citotóxico. De esta manera, si la adición de un inhibidor compromete la capacidad pro-apoptótica de la chalcona híbrida, se podrá deducir que la molécula inhibida forma parte del mecanismo de muerte asociado a HY-CHAL. Los resultados demostraron que la presencia de los inhibidores específicos contra p38^{MAPK} y JNK/SAPK no fueron capaces de bloquear el incremento en el número de células hipodiploides que induce HY-CHAL en las células de melanoma humano, lo que hace suponer que dichos mediadores moleculares no intervienen de manera directa en la apoptosis inducida por la chalcona híbrida (Figura 25D).

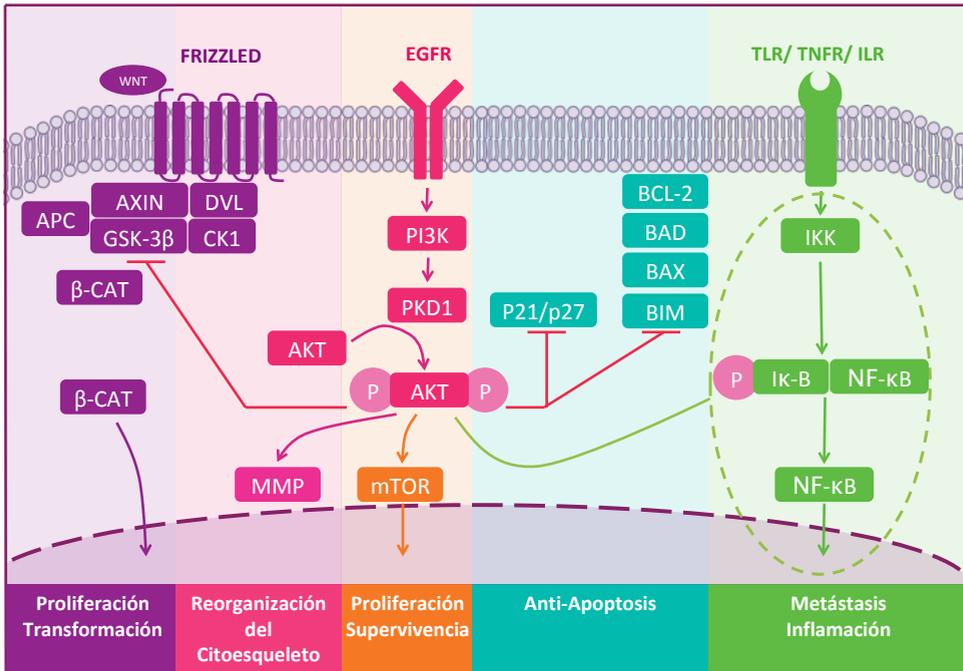


Figura 26. Interacción entre las Vías de PI3K, NF-κB y β-Catenina. GSK-3β es una enzima implicada en la modulación de diversos procesos celulares, como proliferación, la apoptosis, la autofagia o la diferenciación celular, y participa activamente en rutas de señalización muy diversas, entre las que se encuentra la vía del WNT o la de PI3K/AKT/mTOR. GSK-3β suele ejercer su actividad mediante la fosforilación de sus sustratos asociados, lo que normalmente implica una inhibición de los mismos así como su posterior degradación proteosómica. A su vez, GSK-3β también puede ser inhibida al ser fosforilada por otras quinasas como AKT, PKA o PKC. La GSK-3β puede encontrarse principalmente en tres localizaciones celulares distintas: citosol, núcleo y mitocondria. Su actividad también depende de dicha ubicación. Muchos estudios han encontrado que las células neoplásicas muestran con significativa frecuencia un incremento en los niveles de activación de GSK-3β, por lo que encontrar inhibidores para esta molécula se ha convertido en un objetivo de especial importancia en el establecimiento de nuevos tratamientos contra el cáncer. NF-κB es una familia de reguladores positivos de la proliferación y la supervivencia (p50, p52, p65, RelB y RelC) debido a su capacidad para influir positivamente sobre la transcripción de genes y factores de transcripción anti-apoptóticos (como BCL-xL, BCL-2 o XIAP). NF-κB suele ser regulado por el complejo IKK (formado por IKK-α, IKK-β y NEMO), que puede fosforilar a I-κB, y hace que esta última se separe de NF-κB. Una vez libre, el NF-κB translocará al núcleo para ejercer sus funciones biológicas. Se sabe que AKT promueve la actividad de NF-κB, pero el mecanismo por el cual se relacionan estas dos vías todavía no se ha establecido con claridad.

5. 7. 5. Regulación Negativa de β-Catenina

La ruta del WNT/β-catenina es esencial para el desarrollo, supervivencia y motilidad de los melanocitos (Figura 26), pero los mecanismos moleculares

de esta vía necesitan estudiarse con mayor profundidad para poder comprender la importancia de cada una de las moléculas señalizadoras implicadas, su interacción entre ellas y con otras rutas, el papel que juega la localización sub-celular de las mismas y la naturaleza de los distintos patrones cinéticos que muestran.

Las mutaciones que provocan la activación constitutiva de la vía del WNT/ β -catenina se observan con frecuencia en el melanoma, donde en hasta un 30% de los casos se puede detectar la presencia de β -catenina en el núcleo de la célula, localización en la cual actúan promoviendo la transcripción de genes como MYC, CCND1, POU3F2 (también llamado BRN2) o MITF (203, 204).

HY-CHAL demostró poseer la capacidad de reducir los niveles de este tipo de molécula señalizadora de forma dependiente del tiempo y de la concentración del tratamiento (Figura 27A). Se trata de un resultado sorprendente ya que, como se expuso anteriormente, la chalcona híbrida induce el aumento en la concentración de la isoforma inactiva de GSK-3 β , lo que significa que deja de favorecer la degradación proteosomal de β -catenina. Existen algunos modelos que podrían explicar este hallazgo conjunto de niveles elevados de proteína GSK-3 β fosforilada y bajas concentraciones de β -catenina en el núcleo celular. Algunas de las causas podrían ser: la translocación de la proteína AXIN, componente limitante en la formación del complejo de destrucción de la β -catenina, hacia la membrana citoplasmática; la degradación de la AXIN o su disociación de GSK-3 β ; la pérdida de la actividad quinasa del GSK-3 β , a causa por ejemplo de su fosforilación en serina 9 por AKT; el secuestro de GSK-3 β desde el citosol hacia cuerpos multi-vesiculares o la destrucción de la integridad del complejo (206).

En cualquier caso, los resultados también muestran una clara regulación negativa de la β -catenina, que comienza a las 6 horas del tratamiento con una concentración de 10 μ M de HY-CHAL. Este efecto puede estar causado por la degradación proteolítica de la β -catenina y podría estar relacionado con el incremento de actividad de la caspasa 3, tal y como han demostrado otros grupos con distintos modelos experimentales. Será necesario realizar estudios complementarios para confirmar este resultado.

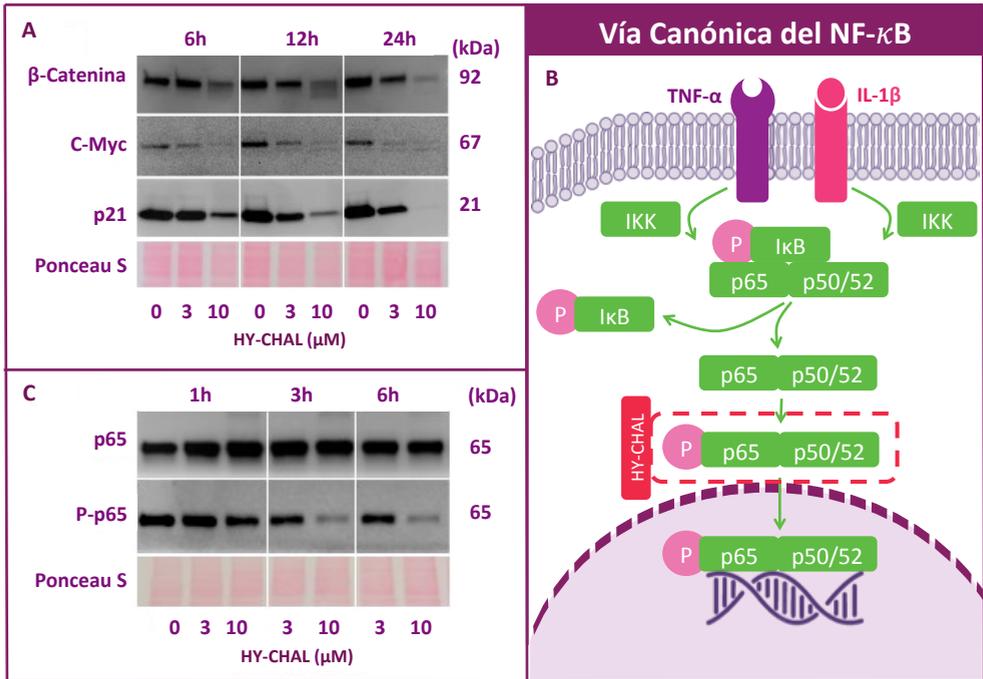


Figura 27. Influencia de HY-CHAL Sobre las Vías de c-Myc, β -catenina, p21 y NF- κ B. (A) Las células fueron tratadas con concentraciones específicas de la chalcona híbrida durante distintos tiempos y a continuación se recogieron y procesaron para obtener los lisados celulares correspondientes. Estos lisados se utilizaron para realizar inmunoblots específicos para distintas proteínas de interés. La carga homogénea de todas las calles del gel se comprobó mediante la tinción con Ponceau S. (B) En la ruta canónica del NF- κ B, la activación de la vía comienza con la activación del receptor, sensible a muchos tipos de estímulos, como las citoquinas inflamatorias, el factor de necrosis tumoral o las interleuquinas. Estas señales provocan la fosforilación y posterior degradación proteosomal del complejo inhibidor (I κ B) en un proceso regulado por IKK. Al separarse del complejo inhibidor, el heterodímero de NF- κ B (normalmente compuesto por p65/p50) es capaz de traslocarse al núcleo de la célula, donde activa la transcripción de genes relacionados con la supervivencia, la apoptosis, la respuesta inmune y la inflamación. (C) Las células fueron sometidas a los mismos procedimientos que en (A) y los lisados celulares se analizaron mediante Western Blot, asegurando una carga proteica homogénea mediante el uso del colorante Ponceau S.

5. 7. 6. Regulación Negativa de NF- κ B

Entre las rutas de señalización que se encuentran constitutivamente activadas o cuyos mecanismos de transducción de señales pueden hallarse alterados en el melanoma, la vía del NF- κ B conforma una de las principales herramientas que la célula tumoral puede emplear para potenciar su capacidad de supervivencia (Figura 27B). Debido a esto, tanto el propio factor de transcripción NF- κ B como otras moléculas señalizadoras propias

de esta ruta metabólica podrían suponer una diana farmacológica prometedora en el desarrollo de nuevas terapias anti-neoplásicas.

El factor de transcripción nuclear NF- κ B es en realidad un grupo de moléculas (RelA, RelB, c-Rel, NF- κ B1 y NF- κ B2) que pertenecen a la familia de los factores de transcripción y que juegan un papel esencial en la regulación de la inflamación, los mecanismos de inmunidad, la supervivencia y la proliferación, la diferenciación y la motilidad celular (207).

Para investigar el impacto de HY-CHAL sobre la expresión de NF- κ B, se trataron las células SK-MEL-1 con concentraciones crecientes del compuesto durante distintos periodos de tiempo (Figura 27C). Las células se recogieron y procesaron de manera adecuada para la posterior realización de inmunoblots específicos para p65 (RelA) y fosfo-p65 (isoforma nuclear con capacidad transcripcional). Los resultados demostraron que las células de melanoma humano SK-MEL-1 poseen niveles apreciables de p65 fosforilado, lo que indica una actividad transcripcional basal en este tipo de célula. No obstante, al ser expuestas a la chalcona híbrida, las células respondieron con una disminución de los niveles de fosfo-p65 que contrastó con el hallazgo de una concentración total de p65 que permaneció estable. Este tipo de patrón revela que HY-CHAL afecta de manera inhibitoria a la vía canónica del NF- κ B.

5. 7. 7. Regulación Negativa de c-Myc y p21

Los niveles intracelulares del factor de transcripción c-Myc están regulados por distintas rutas de señalización importantes, como WNT/ β -catenina, MEK/ERK o PI3K/AKT. El factor de transcripción c-Myc controla la expresión de distintos genes que actúan sobre la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la proliferación y el metabolismo (208). En presencia de WNT, la fosforilación y posterior degradación de la β -catenina se suprime. La β -catenina citoplasmática trasloca al núcleo, donde forma un complejo con el factor de células T (TCF) y el factor potenciador linfóide (LEF) que activa la transcripción de factores como la ciclina D1 y c-Myc (209).

En el presente estudio se examinaron los niveles del factor de transcripción c-Myc como valor indirecto de la activación de la ruta de WNT. Para ello se trataron las células con concentraciones crecientes de HY-CHAL durante

distintos periodos de tiempo. El análisis mediante inmunoblot permitió apreciar una relación proporcional entre la disminución de los niveles de c-Myc, la concentración de la chalcona y el tiempo de tratamiento. A nivel clínico, la presencia de elevados niveles de expresión de c-Myc suele indicar una mayor probabilidad de desarrollar metástasis y un pronóstico de naturaleza más negativa. Por otra parte, a nivel biológico, la sobreexpresión de c-Myc incrementa significativamente el potencial de migración de la célula y por lo tanto también la capacidad de invasión y metástasis. Por ello, encontrar compuestos con la habilidad para reducir la concentración de c-Myc supone un avance en el establecimiento de nuevas vías de tratamiento. Hay que añadir que la regulación negativa de c-Myc también ha demostrado incrementar la sensibilidad de las células del melanoma humano ante el cisplatino.

El inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas llamado p21 es una de las principales dianas transcripcionales de p53 y su expresión suele aumentar en células cuyo material genético ha sufrido daños (Figura 28). Esta molécula es capaz de bloquear la progresión del ciclo celular mediante la inhibición de un amplio espectro de CDKs esenciales para esta transición entre fases. Además, p21 también puede unirse al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) para inhibir la replicación del ADN. Por otra parte, durante la apoptosis de células neoplásicas, se ha observado que los niveles de p21 suelen descender y esto se asocia con un incremento en la capacidad pro-apoptótica de los fármacos quimioterápicos.

Las células SK-MEL-1 presentaron elevados niveles de p21, y estos disminuyeron de manera dependiente con la concentración de HY-CHAL y el tiempo de exposición a la chalcona. Este tipo de cinética podría deberse, al menos en parte, a la acción neutralizadora que es capaz de ejercer la caspasa 3 sobre p21 en células neoplásicas que se encuentran en un estado de apoptosis temprana. Esta relación entre p21 y la caspasa 3 ha sido descrita desde finales del siglo XX e incluso algunos autores sugieren que el truncamiento de p21 y consecuente activación de CDK2 es un requisito estrictamente necesario para iniciar el proceso apoptótico inducido por ciertos tratamientos. Se cree que la inactivación de p21 mediada por la acción proteolítica de la caspasa 3 conduce a la escisión del ácido aspártico 112, que se encuentra en el dominio C-terminal y cuya eliminación previene su traslocación al núcleo de la célula que resulta en una regulación positiva de CDK2 (210-212).

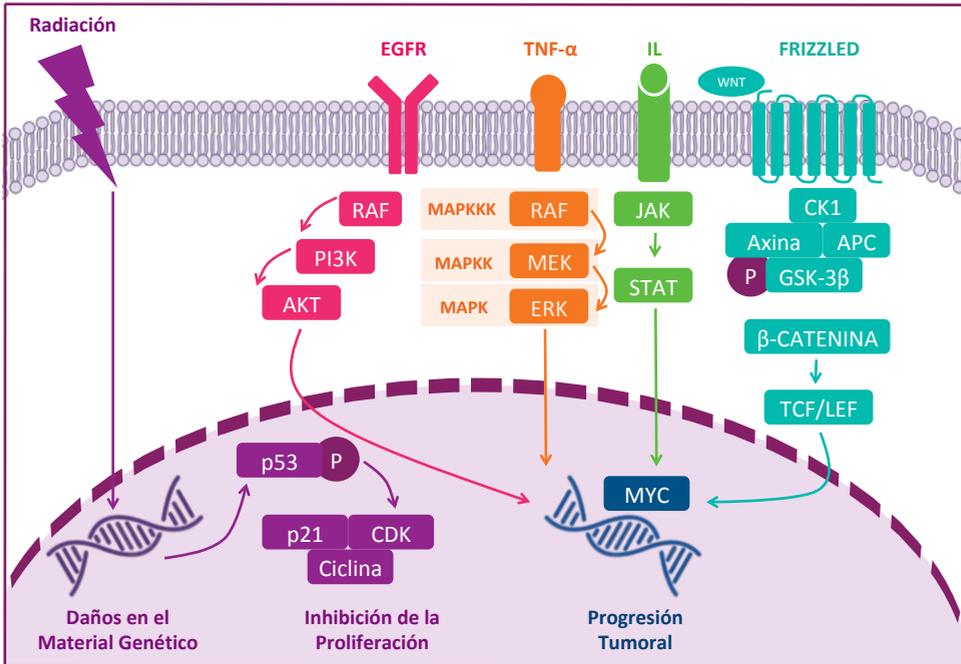


Figura 28. Señalización de p53 y MYC. El proto-oncogén MYC produce el factor de transcripción c-Myc, que es capaz de unirse a regiones específicas del ADN, regulando la transcripción de genes implicados en procesos como el crecimiento y la proliferación de la célula. La pérdida de la correcta regulación de MYC puede desencadenar su potencial oncogénico, favoreciendo la progresión tumoral. La progresión del ciclo celular está regulada principalmente por las quinasas dependientes de ciclina (CDKs), que necesitan fosforilarse y unirse a la ciclina para activarse. Los inhibidores de CDKs se dividen en 2 familias: ink4 (p15, p16, p18 y p19) y Cip/Kip (p21, p27 y p57). La proteína p21 (también llamada CDKN1A, p21Cip1, Cip1/Waf1 o Waf1) proviene de un gen (P21) cuya expresión está estrechamente regulada por la proteína supresora tumoral p53 y su actividad puede variar en función de su localización. Cuando p21 se encuentra en el núcleo, puede unirse a CDK1 y CDK2, lo que provoca la inactivación de estas quinasas y el bloqueo de la transición de la fase G₁ hacia la S o de la G₂ hacia la mitosis. En el citoplasma, p21 actúa como un agente anti-apoptótico. Esto se debe a que puede unirse a la caspasa 3 o a JNK, provocando la inactivación de estas moléculas señalizadoras. Además se ha observado que los niveles de p21 varían mucho dependiendo de la situación biológica y metabólica en la que se encuentra la célula. En el caso de producirse daños en el material genético, los niveles de p21 pueden descender (si el daño es extenso o irreversible) o aumentar (si los daños son pequeños o reversibles).

6. DISCUSIÓN

A pesar de ser un tipo tumoral relativamente poco frecuente (1 de cada 38 individuos en el caso de los caucásicos, 1 de cada 167 en hispanos y 1 de cada 1.000 en personas de piel oscura) la incidencia del melanoma se ha incrementado durante los últimos años y actualmente conforma el tipo de cáncer de piel con mayor índice de mortalidad asociado. Esta agresividad que caracteriza al melanoma se asocia con su propensión a metastatizar y a la capacidad que poseen estos tumores para desarrollar estrategias de supervivencia que les permiten soportar la exposición a los tratamientos más usuales o desarrollar resistencias a los mismos conforme progresa la enfermedad. Las evidencias clínicas confirman que a pesar de haberse producido un innegable progreso en el entendimiento de la biología, la fisiopatología, el metabolismo y la genómica del melanoma, se requiere de una mayor inversión en la investigación de nuevos tratamientos y dianas farmacológicas, así como en la comprensión de las diversas rutas metabólicas que pueden encontrarse alteradas en este tipo de neoplasias.

La patogenia del melanoma es muy compleja y este proceso de transformación por el cual la célula va cambiando hacia un genotipo maligno puede implicar una amplia variedad de mutaciones, por lo que constituye uno de los cánceres con mayor variabilidad y diversidad a nivel genético. Esta característica tan representativa del melanoma genera un aumento en la dificultad de la selección del tratamiento o tratamientos de mayor eficacia para cada paciente.

Las chalconas son cetonas aromáticas que forman parte de diversos metabolitos vegetales con funciones biológicas tan importantes como la protección ante la radiación UV o la defensa contra una amplia variedad de micro-organismos patógenos. Este tipo de flavonoides están despertando un interés científico que ha ido en aumento durante las últimas décadas y cuya relevancia a nivel clínico se ha visto incrementada debido a sus propiedades antibióticas, anti-diabéticas, anti-asmáticas, anti-mitóticas, antioxidantes, anti-inflamatorias y anti-cancerígenas.

Aunque se trata de moléculas de origen natural bastante comunes en el reino vegetal, las chalconas también pueden ser sintetizadas o modificadas artificialmente para potenciar sus propiedades o combinarlas con las de otros compuestos con actividad farmacológica.

La chalcona híbrida (α -bromoacrilamido-indolil-piridil-propenona) elegida para este estudio había demostrado con anterioridad una habilidad significativa para la inhibición del crecimiento celular en distintas líneas de leucemia, así como para la inducción de la muerte celular por apoptosis asociada a la disipación del potencial de membrana mitocondrial y a la activación de la cascada de las caspasas. Otro factor importante en el proceso de decisión de escoger este compuesto híbrido como objeto de estudio fue la menor citotoxicidad que produjo al ser añadido a células humanas normales, cultivadas bajo condiciones estándar.

En este trabajo se ha evaluado un amplio abanico de propiedades biológicas y moléculares relacionadas con el potencial clínico y farmacológico que podrían hacer de esta chalcona un posible agente terapéutico (Figura 30).

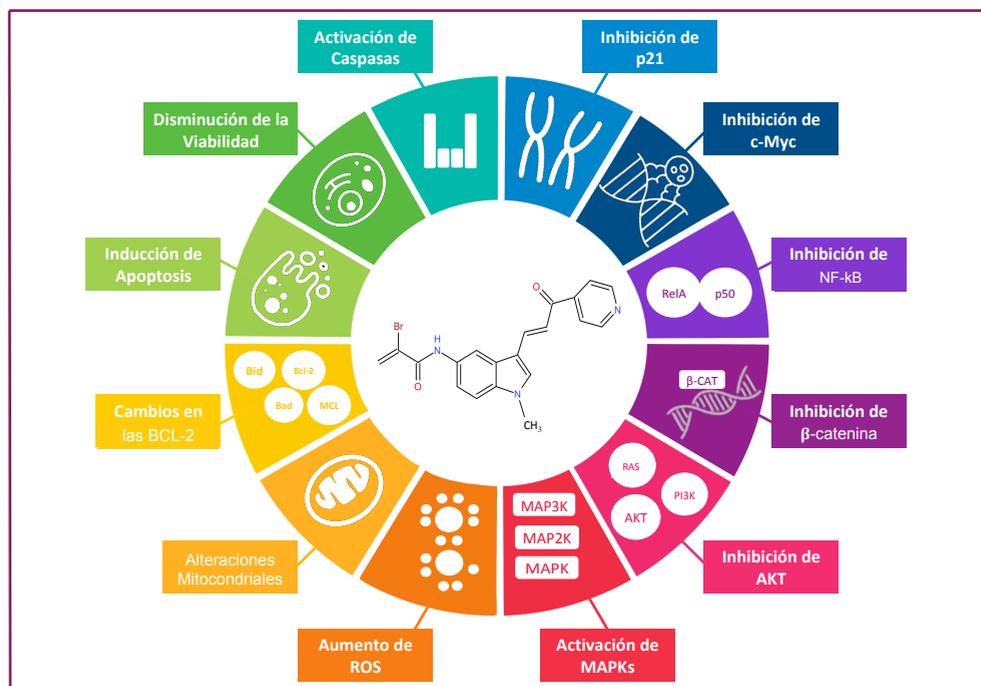


Figura 30. Efectos de HY-CHAL Sobre Células de Melanoma. Gráfico que muestra los distintos efectos que genera en células de melanoma humano de tipo SK-MEL-1 y MEL-HO la exposición a la indol-chalcona.

La línea celular SK-MEL-1 se estableció en 1966 a partir de una muestra tumoral metastásica de un paciente varón de 29 años y etnia caucásica, que falleció a causa de un melanoma. Se trata de melanocitos malignos no adherentes, que crecen en suspensión y cuyo genotipo cuenta con la

mutación V600E del gen BRAF (alteración genética más común en tumores tipo melanoma). La mencionada línea celular fue elegida principalmente por presentar esta anomalía genética, que aparece en aproximadamente el 50% de los melanomas diagnosticados y que implica la activación constitutiva de la ruta MEK/ERK.

La línea MEL-HO está formada por células humanas de melanoma que se recogieron del tumor primario de una mujer caucásica en 1976. Se trata de células epiteliales de morfología alargada, naturaleza adherente y que también portan la mutación V600E del gen BRAF.

La viabilidad celular se define como una medida cuyo valor depende de la proporción de células vivas y sanas dentro de una población. Normalmente se trata de una cuantificación de células funcionalmente activas que permite evaluar la eficacia potencial de moléculas de interés farmacológico. Un gran número de estudios experimentales, clínicos y epidemiológicos han permitido establecer con certeza la utilidad de los flavonoides como agentes fitoquímicos capaces de regular la proliferación y división de diversos tipos de células cancerígenas, así como afectar a funciones metabólicas esenciales para la supervivencia. En células de leucemia humana, HY-CHAL ha demostrado con anterioridad su habilidad para reducir la capacidad proliferativa de dicho tipo celular neoplásico. Por esta razón, se eligió esta chalcona híbrida como candidato ideal para comprobar la posible extrapolación de estas habilidades anti-cancerígenas en células de melanoma humano.

La técnica escogida para el análisis de la viabilidad celular fue el ensayo del MTT. Se trata de un método colorimétrico que evalúa los niveles de actividad metabólica de la célula, utilizándolos como indicador para la valoración de la viabilidad, citotoxicidad y capacidad proliferativa. Este método que emplea la reducción del MTT a formazán permitió realizar estudios de dosis-respuesta y determinar la IC_{50} en células SK-MEL-1 ($0,15 \pm 0,04 \mu M$) y MEL-HO ($0,3 \pm 0,1 \mu M$). Además, de manera previa al inicio de los estudios de tinción con MTT, se decidió observar la morfología celular general de las muestras tratadas y control para comparar las características físicas de cada uno de los grupos experimentales. Esto permitió corroborar la influencia de HY-CHAL sobre las SK-MEL-1 y las MEL-HO a nivel de inhibición del crecimiento y la proliferación, la disminución de la viabilidad general de las células y su aparente influencia sobre la formación de agregados celulares, comunes en SK-MEL-1.

El melanoma es un tipo de cáncer bastante agresivo y con frecuencia logra evitar la muerte celular mediante el desarrollo de distintas mutaciones que incrementan la actividad de las rutas metabólicas relacionadas con la supervivencia o bien silencian aquellas vías moleculares que conducirían a la célula aberrante hacia su muerte. La habilidad del melanoma para sobrevivir, progresar y metastatizar depende por tanto en gran medida de su habilidad para manipular las rutas metabólicas relacionadas con la muerte, la respuesta inmune y la capacidad de supervivencia en microambientes desfavorables. La muerte celular programada conforma una maquinaria molecular predefinida que puede ser modulada o modificada mediante el uso de agentes farmacológicos, afectando al destino de la célula, que podría desviarse hacia la apoptosis, la autofagia o la necroptosis. La apoptosis constituye el proceso de muerte celular mejor comprendido hasta la fecha y está implicada en el mantenimiento de la homeostasis dentro de la propia célula y en el tejido del que forma parte. Puede iniciarse de tres maneras distintas en función del estímulo inicial que pone en marcha esta ruta. La apoptosis intrínseca (también conocida como ruta mitocondrial de la apoptosis) se desarrolla como consecuencia al daño al material genético, el exceso de especies reactivas del oxígeno, el incremento del estrés replicativo por encima del umbral permitido por la célula o la ausencia de factores de crecimiento. La vía extrínseca, por otro lado, se activa ante la presencia de determinadas moléculas señalizadoras (como FasL, TRAIL o TNF- α) liberadas por células adyacentes. Finalmente, la ruta de las granzimas (o sistema de las perforinas/granzimas) es inducida por las células T citotóxicas. Se cree que la desmedida capacidad de proliferación exhibida por las células del melanoma podría deberse en gran medida a la desregulación de distintos factores moduladores de la apoptosis (como p53, IAPs, caspasas, etc) y fue por esta razón por la cual este trabajo abordó el estudio de los posibles cambios que podría provocar HY-CHAL en la expresión de estas moléculas señalizadoras.

Mediante microscopía de fluorescencia se descubrieron cambios morfológicos característicos de la muerte celular por apoptosis, como la condensación de la cromatina. Por otra parte, con los datos obtenidos a partir del análisis por citometría de flujo, se generaron una serie de histogramas que ilustraron el incremento del número de células apoptóticas (hipodiploides) al someter a las SK-MEL-1 y a las MEL-HO a la presencia de una concentración de 3 μ M de HY-CHAL durante 24 horas. De manera complementaria, también se examinó la externalización de

fosfatidilserina (fosfolípido que normalmente se localiza en la cara interior de la membrana celular y cuya externalización permite que la célula sea reconocida por los macrófagos como una célula muerta o moribunda). El resultado positivo obtenido a partir de estos análisis de la fosfatidilserina se empleó para localizar temporalmente el inicio del proceso apoptótico desencadenado por la actividad de la chalcona híbrida.

Las caspasas son las principales moléculas inductoras de la apoptosis, se encuentran normalmente en forma de zimógenos (pro-caspasas) que sólo se activan y dimerizan cuando aparece un estímulo específico. La activación de la cascada de las caspasas conduce, en última instancia, hacia la proteólisis del citoesqueleto y otros componentes moleculares esenciales para la integridad estructural y funcional de la célula. Las caspasas participan en las dos ramas de la apoptosis y es la caspasa 3 la principal encargada de la comunicación de señales entre ambas.

La cascada de las caspasas en la ruta intrínseca de la apoptosis se inicia a partir de la liberación de citocromo *c* desde la mitocondria. Este proceso es el resultado final de una serie de cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, que pueden estar causados por distintos estímulos negativos relacionados con el estrés celular, como la hipoxia, la presencia de radiación, el aumento en los niveles de ROS o la falta de factores de crecimiento. El aumento en la permeabilidad de la membrana, que facilita la salida del citocromo *c* desde el interior de la mitocondria hacia el citoplasma de la célula, se asocia con la disipación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la disminución en la producción de ATP. Estas señales de estrés activan a los miembros pro-apoptóticos de la familia de las proteínas BCL-2, algunos de los cuales podrán inactivar a los factores anti-apoptóticos (BCL-2, BCL-xL y MCL-1) mientras otros actúan favoreciendo la liberación del citocromo *c* desde la mitocondria. En el citosol, APAF-1 oligomeriza en presencia de citocromo *c* y recluta a la caspasa 9, formando un complejo llamado apoptosoma que favorecerá la fagocitosis de la célula y evitará la generación de una respuesta inflamatoria a la muerte celular.

Para estudiar el comportamiento de las caspasas en células de melanoma humano expuestas a la chalcona híbrida, se emplearon sustratos sintéticos específicos para tres de las caspasas más relevantes (caspasa 3/7, caspasa 8 y caspasa 9). Estos sustratos comerciales proporcionaban una señal que fue analizada mediante espectrofotometría y que permitía calcular la actividad

enzimática de cada una de estas caspasas en los distintos grupos experimentales. Se utilizó una concentración de 3 μM de HY-CHAL y, analizando la respuesta celular a distintos tiempos de exposición, se dedujo la cinética de estas moléculas señalizadoras. La caspasa ejecutora 3 se detectó a partir de las 6 horas de tratamiento y su actividad aumentó con el tiempo. Las caspasas iniciadoras 8 y 9 siguieron patrones similares. Esto sugiere un aumento de actividad caspasa conforme se incrementa el tiempo de exposición a la indol-chalcona, resultado que concuerda con el resto de experimentos realizados (Figura 31).

El análisis de los niveles de PARP se utilizó como indicador secundario de la actividad de las caspasas, ya que es un reconocido sustrato sobre el que actúan de manera proteolítica las caspasas 3 y 7. Mediante Western Blot se detectó un fragmento del tamaño que generan las caspasas anteriormente nombradas al actuar sobre PARP. Este hallazgo confirma que HY-CHAL induce la activación de las caspasas en SK-MEL-1 y MEL-HO. El análisis por inmunoblot de los fragmentos en los que se dividen las caspasas al ser activadas corroboró la presencia de la forma biológicamente activa de estas moléculas proteolíticas y se pudo establecer una relación directamente proporcional entre la activación de las caspasas y la concentración de HY-CHAL a las que las células fueron sometidas, así como con el tiempo transcurrido desde el inicio de dicha exposición (mayor incremento en la actividad de las caspasas y más activación de la vía de la apoptosis intrínseca a mayor concentración de tratamiento y mayor duración del mismo). Además, al añadir z-VAD-fmk (inhibidor general de las caspasas) a las células de melanoma humano cultivadas en presencia de HY-CHAL, se observó mediante microscopía óptica que las células volvían a un estado morfológicamente muy similar al encontrado en los grupos control. Esto pone de manifiesto que la muerte celular de las SK-MEL-1 y MEL-HO inducida por HY-CHAL está íntimamente relacionada con la actividad de las caspasas. El recuento de células hipodiploides bajo las distintas condiciones anteriormente mencionadas, corroboró los resultados relativos a la activación de la vía intrínseca de la apoptosis.

Para conocer los cambios en los niveles de expresión de las proteínas de la familia BCL-2 (muy importantes dentro de la rama intrínseca de la apoptosis), se analizaron tanto los miembros antiapoptóticos (BCL-2, BCL-xL y MCL-1), como pro-apoptóticos (BAX, BAK, BID y distintas isoformas de BIM). Los niveles de los distintos miembros anti-apoptóticos parecieron disminuir de manera general y significativa en respuesta a la exposición a

HY-CHAL (aunque BCL-xL no varió con la concentración del tratamiento y MCL-1 descendía a altas concentraciones combinadas con exposiciones prolongadas). Las proteínas BAX y BAK mostraron una relación directamente proporcional a la concentración de HY-CHAL y el tiempo de exposición a la chalcona híbrida. En lo referente a BIM y BID, se pudo establecer que los niveles de las isoformas BimEL, BimL y BimS tendían también a aumentar con el tiempo y la concentración, mientras que BID mostraba una cinética más compleja (con un incremento de sus niveles a concentraciones y tiempo bajos y una disminución de los mismos a concentraciones altas de HY-CHAL y tiempos prolongados de exposición a dichas concentraciones de tratamiento)

Asimismo se estudiaron las posibles variaciones en los niveles de citocromo *c* citosólico y la despolarización del potencial de membrana mitocondrial como factores complementarios para la determinación global de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. Mediante la técnica del inmunoblot se hallaron niveles importantes de citocromo *c* en el citoplasma celular en todos los grupos experimentales expuestos a la indolchalcona. Estos resultados se correspondieron también con la detección de una pérdida significativa de los niveles de $\Delta\Psi_m$ en experimentos independientes pero realizados bajo las mismas condiciones de cultivo.

Por otras parte, aunque se sabe que unos elevados niveles de ROS conducen normalmente a la muerte apoptótica de la célula, diversos estudios han demostrado que las células neoplásicas son capaces de desarrollar mecanismos de resistencia ante la presencia de estos radicales libres dañinos, escapando de la muerte celular programada e incluso aprovechando la capacidad mutagénica de ROS para aumentar la inestabilidad genética de la población y facilitar la aparición de nuevas mutaciones. No obstante, incluso estas células malignas han manifestado un umbral de tolerancia hacia este tipo de especies reactivas del oxígeno. La chalcona híbrida ha conseguido influir sobre la producción de ROS hasta el punto de sobrepasar dicho umbral de tolerancia y provocar una muerte celular dependiente de la generación de este exceso de radicales libres. Esta deducción se alcanza tras someter las células SK-MEL-1 cultivadas en presencia de HY-CHAL a la exposición a distintos antioxidantes, con capacidad previa demostrada en otras líneas celulares para actuar bloqueando las especies reactivas del oxígeno. En estos experimentos las células tratadas con HY-CHAL recuperaban en mayor o menor medida su viabilidad original, dependiendo del antioxidante empleado.

La ruta extrínseca de la apoptosis se inicia cuando un receptor transmembrana de la superfamilia de los TNFRs (como DR4/DR5) se une con su ligando (TNF- α , TRAIL, etc.). Entonces este receptor sufre un cambio conformacional que incrementa su afinidad por ciertas proteínas adaptadoras y se facilita la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC). El componente clave de esta vía es la caspasa iniciadora 8, que podrá activar a las caspasas efectoras 3, 6 y 7. Como al analizar las caspasas HY-CHAL dio muestras sólidas de inducir la activación de la caspasa 8, se decidió evaluar la posible implicación de la ruta extrínseca de la apoptosis en relación a su importancia dentro de la muerte celular que la chalcona híbrida desencadena en SK-MEL-1. Los resultados obtenidos mostraron que los niveles de TRAIL no varían significativamente bajo ninguna de las distintas condiciones experimentales analizadas. Por otra parte, la expresión de DR4 aumentó sólo en aquellas muestras sometidas al tiempo de exposición más prolongado y con mayor concentración de HY-CHAL. Los niveles de DR5 aumentaron con la concentración más baja de la chalcona y periodos de exposición no superiores a las 12 horas. Así, se puede concluir que estos tres factores analizados siguen distintos patrones cinéticos y se regulan de manera distinta en células de melanoma humano de la línea SK-MEL-1 sometidas al tratamiento con HY-CHAL.

La superfamilia de las MAPKs está formada por una serie de proteín-quinasas señalizadoras capaces de convertir una amplia variedad de estímulos extra-celulares en respuestas celulares de carácter muy diverso, como pueden ser la proliferación, la diferenciación, la migración celular o la apoptosis. Estas moléculas se activan normalmente mediante una doble fosforilación peptídica en la región del bucle T a través de una cascada comprendida por una MAPK, una MAPKK (MAP2K) y una MAPKKK (MAP3K). En cambio, las MAPKs se inactivan por la acción de fosfatasas capaces de desfosforilar los residuos previamente fosforilados en el bucle T. En mamíferos, la superfamilia de las MAPKs se divide en dos grupos: uno convencional que se compone de aquellos miembros que siguen la cascada típica de activación en tres pasos (ERK1/2, JNK, p38-MAPK y ERK5) y otro en el que se reúnen aquellas MAPKs atípicas que no necesitan de la doble fosforilación para ejercer su actividad (ERK3/4, ERK7/8 y NLK). De entre todas estas quinasas, se sabe que JNK y p38-MAPK son las que responden con un mayor grado de activación ante el estrés celular generado por la exposición a agentes físicos, químicos o biológicos de naturaleza nociva. Estas MAPKs activadas por estrés (intracelular o extracelular) juegan un

papel esencial en el mantenimiento del balance entre la supervivencia y la muerte de la célula, ya que pueden influir a nivel transcripcional y/o post-transcripcional sobre varias proteínas (pro-apoptóticas y anti-apoptóticas) de la familia BCL-2. Normalmente JNK y p38-MAPK actúan como mediadores pro-apoptóticos, aunque hay que tener en cuenta que también son capaces de ejercer efectos anti-apoptóticos bajo determinadas condiciones, como la protección de los queratinocitos ante la apoptosis inducida por la exposición a radiación UV, la supresión de la apoptosis en macrófagos con lipoproteínas oxidadas de baja densidad, etc. No obstante, la activación de ERK1/2 se asocia típicamente con funciones anti-apoptóticas y de control de la proliferación y la diferenciación. Además, suele ser el miembro de las MAPKs que actúa como principal molécula señalizadora en la transmisión de señales relacionadas con la presencia de algún factor de crecimiento en el entorno cercano a la célula. Sin embargo, ERK1/2 posee también el potencial para actuar como un agente promotor de la muerte celular mediante la activación de la ruta apoptótica; por ejemplo, se ha demostrado que en células con daño genético provocado por la exposición al cisplatino, los niveles de ERK1/2 aumentan y provocan un incremento de la fosforilación de p53 (213).

De manera complementaria, se realizaron análisis con inhibidores específicos para p38^{MAPK} (SB203580), JNK/SAPK (SP600125), MEK1/2 (U0126 y PD98059) y PI3K (LY294002). Los resultados de dichos experimentos indicaron que tanto la activación de JNK como la de p38-MAPK no está directamente implicada en la muerte celular, ya que los inhibidores específicos SP600125 (10 μ M) y SB203580 (2 μ M) fueron incapaces de bloquear el incremento del porcentaje de células hipodiploides que sucede al exponer a las SK-MEL-1 a la chalcona híbrida. En contraste, los inhibidores de MEK (PD98059 y U0126) provocaron un aumento en la tasa de muerte celular. Por tanto, podemos concluir que, en células de melanoma humano, la presencia de inhibidores de MEK podría ser beneficiosa en cuanto a que aumenta la tasa de muerte de este tipo de célula neoplásica, mientras que ni JNK, ni p38^{MAPK}, ni PI3K parecen tener un papel relevante en el mecanismo apoptótico generado por HY-CHAL.

En el presente estudio se observó que HY-CHAL indujo una sobre-activación de ERK1/2, JNK y p38-MAPK, cuyo efecto general consistió en la inducción de la muerte celular por apoptosis. Estas MAPKs mostraron patrones cinéticos similares y dependientes de la concentración del tratamiento. No obstante, debido a la naturaleza dual (pro-apoptótica y anti-apoptótica) de

las MAPKs, sería necesario realizar un análisis más exhaustivo sobre la influencia de HY-CHAL en los patrones de expresión y activación de las distintas MAPKs para establecer realmente el posible papel de cada uno de los miembros de esta familia de quinasas en la determinación del destino celular.

AKT es una proteína con actividad quinasa de serina/treonina capaz de fosforilar a más de 200 sustratos y cuya ruta de señalización (PI3K/AKT/mTOR) juega un papel fundamental en la supervivencia celular durante el desarrollo embrionario y la carcinogénesis. Diversos estudios han observado que la activación del AKT no solo actúa inhibiendo la apoptosis, sino que también promueve la formación de metástasis, la angiogénesis, inhibe el parada del ciclo celular y provoca la fosforilación de mTOR, que participa a su vez en la regulación de la progresión del ciclo celular, la síntesis de proteínas y la angiogénesis. En este estudio se decidió analizar los posibles cambios en los niveles de AKT en células de melanoma humano de la estirpe SK-MEL-1 en respuesta a la exposición a la chalcona híbrida. Mediante la realización de inmunoblots se apreció que los niveles basales, tanto de AKT total como de AKT fosforilado, se encontraban significativamente elevados en este tipo de célula neoplásica. La respuesta al tratamiento consistió en una rápida disminución tanto de los niveles de la proteína como de su isoforma fosforilada, que conduce a deducir que HY-CHAL es capaz de influir negativamente sobre esta ruta y ejercer una función anti-proliferativa en lo referente a la transducción de señales propias de la vía de señalización del PI3K/AKT/mTOR, típicamente activada en muchos tipos de cáncer.

GSK-3 β es un regulador clave de la apoptosis que puede actuar de manera directa o indirecta sobre algunos de los miembros de la familia de las proteínas BCL-2 y que cuenta con sustratos de reconocida importancia, como WNT, Notch o Hedgehog. La fosforilación de GSK-3 β , inducida por el AKT en respuesta a la presencia de factores de crecimiento, provoca su paso hacia una conformación inactiva, que es incapaz de promover la degradación de la β -catenina y la fosforilación de miembros pro-apoptóticos de la familia de las proteínas BCL-2 pero que posee la capacidad de inducir la transición de la fase G₁ del ciclo celular hacia la S, mediante la estabilización de los niveles de las ciclinas D1 y E. GSK-3 β es una molécula compleja que puede promover o inhibir la muerte celular gracias a su habilidad para influir sobre las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis. Normalmente la GSK-3 β puede o bien promover la apoptosis a

través de la ruta mitocondrial (intrínseca) o actuar inhibiendo la vía extrínseca. Mediante la determinación de los niveles de serina 9 fosforilada de GSK-3 β se observó un aumento rápido y significativo de su isoforma inactiva tras la exposición de las células SK-MEL-1 a la chalcona híbrida. En cuanto a su efecto sobre la apoptosis, serían necesarios estudios más específicos para detallar con seguridad el papel del GSK-3 β sobre los dos tipos de mecanismos por los que se puede desencadenar el proceso apoptótico.

La ruta canónica de señalización del WNT/ β -catenina juega un papel fundamental en la proliferación tumoral y su nivel de activación se correlaciona con la tasa metabólica y la capacidad de la célula neoplásica para desarrollar resistencias hacia los distintos agentes quimioterapéuticos. Normalmente las células sanas poseen bajos niveles citosólicos de β -catenina, ya que se encuentra regulada por un mecanismo de degradación proteosomal que favorece una baja concentración de la misma. La unión del ligando WNT a su receptor provoca la inhibición de la fosforilación y ubiquitinación de la β -catenina, que conduce a un incremento en sus niveles citoplasmáticos que permite su translocación hacia el núcleo, donde activa la transcripción de varios genes, algunos de los cuales conducen a la síntesis de productos proteicos que participan activamente en la regulación de la división celular. La chalcona híbrida disminuyó la concentración de β -catenina de forma dependiente del tiempo y de la concentración del tratamiento. Se trata de un resultado sorprendente, ya que con anterioridad se había establecido que la chalcona híbrida induce el aumento en la concentración de la isoforma inactiva de GSK-3 β , que al encontrarse fosforilada deja de ser capaz de favorecer la degradación proteosomal de la β -catenina. Este hecho podría deberse a la degradación proteolítica de la β -catenina y/o estar relacionado con el incremento de la actividad de la caspasa 3. Sería necesario realizar estudios complementarios para confirmar esta hipótesis, que sí ha sido probada experimentalmente por otros grupos en distintos modelos (214, 215).

Entre los genes diana activados por la vía de señalización del WNT/ β -catenina se encuentran c-Myc, c-Jun, CCND1 o FOSL1. El primero de ellos es un proto-oncogén que se conoce desde hace más de 25 años y que se relaciona con la regulación de la actividad telomerasa, la angiogénesis la motilidad y la progresión del ciclo celular. Durante la transformación neoplásica, c-Myc pasa de estar altamente regulado a expresarse constitutivamente en muchos tipos de cáncer, reprimiendo además a

diversos genes anti-proliferativos (como p21 o p27^{KIP}). Los datos obtenidos a partir del análisis de este factor, que actúa como indicador de la actividad de la ruta del WNT/ β -catenina, permitieron apreciar una relación proporcional entre la disminución de los niveles de c-Myc, la concentración de la chalcona y el tiempo total de tratamiento.

Muchos grupos de investigación se han centrado en la relación de represión que ejerce c-Myc sobre p21 y han favorecido la identificación de una gran variedad de mecanismos por los que ocurre este fenómeno de inhibición. El inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas p21 es el principal mediador molecular en la inducción de la parada del ciclo celular en la fase G₁ provocada por la actividad de p53, que puede intervenir también en el crecimiento celular y la apoptosis. Las células SK-MEL-1 presentaron elevados niveles basales de p21, que se redujeron tras la exposición a la chalcona híbrida de manera dependiente de la concentración y del tiempo de exposición a la chalcona. Esto parece contradecirse con los datos obtenidos a partir del análisis de c-Myc, ya que si HY-CHAL reduce los niveles de este factor represor de p21, la concentración de p21 debería aumentar conforme se reduce la de c-Myc. Esta aparente contradicción podría ser causa de una inactivación de p21 mediada por la caspasa 3, cuyos efectos sobre este factor de transcripción se conocen desde finales del siglo XX (216).

El grupo de los factores de transcripción nucleares asociados a las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) está compuesto en mamíferos por cinco miembros: p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), p65 (RelA), RelB y c-Rel. Los distintos miembros de la familia del NF- κ B participan en la integración de diversos estímulos relacionados con el estrés celular y pueden promover la iniciación de la respuesta inmune innata y adaptativa así como controlar la expresión de genes implicados en la inflamación, la proliferación y la apoptosis. Algunos de los estímulos extracelulares que pueden favorecer la activación de la vía del NF- κ B incluyen la presencia de citoquinas pro-inflamatorias, bacterias, niveles citotóxicos de ROS o determinados agentes terapéuticos. Al estudiar los niveles de p65 total y fosforilado, se demostró que las SK-MEL-1 cuentan con concentraciones basales de p65 significativamente elevadas, lo que favorecería la transformación, iniciación y progresión tumoral. Por otra parte, al someter a estas células de melanoma humano al tratamiento con la chalcona híbrida, la respuesta desencadenada consistió en una disminución en los niveles de p65 activado (fosforilado). Este hallazgo conduce a pensar que

HY-CHAL es capaz de actuar como agente anti-inflamatorio e inhibir la vía NF- κ B.

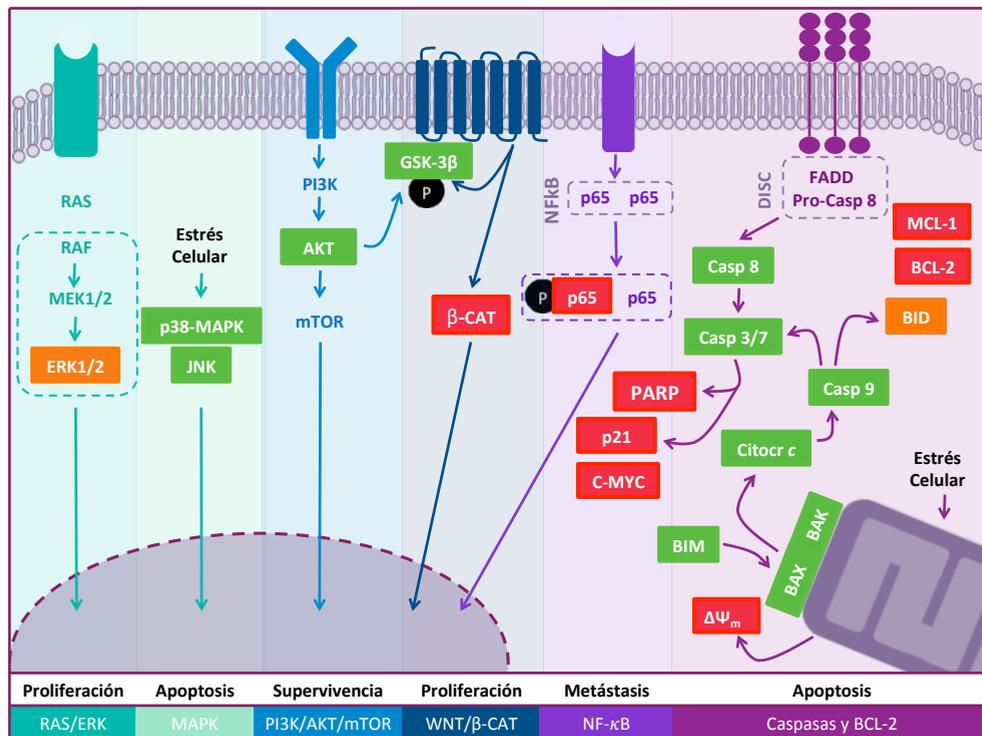


Figura 31. Influencia de HY-CHAL sobre Distintas Rutas de Señalización. La exposición de las células de melanoma humano a la chalcona híbrida indujo cambios en la activación, actividad o concentración de distintos factores metabólicos, rutas de señalización y moléculas mensajeras. El color rojo señala una disminución, el naranja indica una influencia variable (pudiendo promover un incremento a cierta concentración, seguido de una inhibición a otro tiempo o cantidad de tratamiento, por ejemplo) y el verde muestra un incremento.

7. CONCLUSIONES

La chalcona híbrida analizada en este estudio:

1. Posee potencial como agente antitumoral para el tratamiento del melanoma humano, ya que presenta propiedades citotóxicas selectivas frente a células neoplásicas, inducidas a concentraciones lo suficientemente bajas como para alcanzarse *in vivo*.
2. Disminuye la viabilidad celular e induce la muerte por apoptosis, evidenciada por la externalización de la fosfatidilserina, la reducción de la función respiratoria, el aumento en el número de células hipodiploides y la aparición de características morfológicas típicas.
3. Promueve la activación de las caspasas iniciadoras (8 y 9) y ejecutoras (3/7).
4. Genera cambios en la expresión de las proteínas de la familia BCL-2. Los niveles de los miembros anti-apoptóticos BCL-2, BCL-xL y MCL-1 disminuyeron, mientras que los de los factores pro-apoptóticos BAX y BAK aumentaron significativamente.
5. Causa alteraciones a nivel mitocondrial, incluyendo la disminución del potencial transmembrana, el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, la liberación de citocromo c al citosol, y el aumento de la generación de especies reactivas del oxígeno.
6. Induce la fosforilación y consecuente activación de ERK1/2, JNK y p38-MAPK y la adición de inhibidores específicos de MEK1/2 potenció la muerte celular. Al emplear inhibidores específicos para JNK y p38-MAPK, se determinó que estas quinasas no se encuentran directamente implicadas en el mecanismo de muerte.
7. Disminuye la expresión y fosforilación de AKT, sugiriendo que existe una inhibición de la ruta PI3K/AKT/mTOR.
8. Ejerce un efecto de regulación negativa sobre el factor de transcripción c-Myc, el inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas p21^{Cip1/WAF1} y la ruta de la β -catenina y el NF- κ B.

8. Bibliografía

- (1) World Health Organization. (2021). *Cáncer*. Consultado en Junio de 2021 en <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- (2) Baylin, S. B., & Jones, P. A. (2016). *Epigenetic determinants of cancer*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 8(9), a019505.
- (3) Cooper, G. M., Hausman, R. E., & Hausman, R. E. (2007). *The cell: a molecular approach* (Vol. 4, pp. 649-656). Washington, DC: ASM Press.
- (4) Du, W., & Elemento, O. (2015). *Cancer systems biology: embracing complexity to develop better anticancer therapeutic strategies*. Oncogene, 34(25), 3215-3225.
- (5) Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E. R., & Morrison, S. J. (2009). *Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution*. Cell, 138(5), 822-829.
- (6) Baba, A. I., & Cătoi, C. (2007). *Comparative oncology*. Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin. The Publishing House of the Romanian Academy.
- (7) Porth, C. (2011). *Essentials of pathophysiology: concepts of altered health states*. Lippincott Williams & Wilkins. 357-402
- (8) Rosen, R. D., & Sapro, A. (2020). *TNM classification*. StatPearls. Consultado en Junio de 2021 en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553187/>
- (9) Stanford Health Care (SHC) - Stanford Medical Center. (2019) Stanfordhealthcare.org. *Cancer Types*. Consultado en Junio de 2021 en <https://stanfordhealthcare.org/medical-conditions/cancer/cancer/cancer-types.html>
- (10) Cancer Research UK. (2021). *Types of cancer*. Consultado en Junio de 2021 en <https://www.cancerresearchuk.org/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer>

- (11) Hospital Universitario Clínic de Barcelona. *PortalClínic*. (2021) *Tipos de Cáncer*. Consultado en Junio de 2021 en <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/cancer/tipos-de-cancer>
- (12) Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). *Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 71 (3), 209-249.
- (13) Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). *Cancer statistics, 2021*. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 71 (1), 7-33.
- (14) World Health Organization. International Agency for Research of Cancer. (2021). *Cancer Tomorrow*. Consultado en Junio de 2021 en <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>
- (15) Statista. Mendoza, J. (2021). *Cancer: New cases diagnosed by type Spain 2021*. Consultado en Junio de 2021 en <https://www.statista.com/statistics/779054/number-from-new-cases-from-cancer-by-kind-in-spain/>
- (16) Wu, S., Zhu, W., Thompson, P., & Hannun, Y. A. (2018). *Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors*. *Nature Communications*, 9 (1), 1-12.
- (17) Wu, S., Powers, S., Zhu, W., & Hannun, Y. (2016). *Dissecting extrinsic and intrinsic cancer risk*. *Cancer Research*, 76 (14_Supplement): 2589.
- (18) Tomasetti, C., & Vogelstein, B. (2015). *Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions*. *Science*, 347 (6217), 78-81.
- (19) Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 100(1), 57-70.
- (20) Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 144(5), 646-674.

- (21) Fior, R., & Zilhão, R. (2019). *Molecular and cell biology of cancer*. Springer International Publishing.
- (22) Giancotti, F. G. (2014). *Deregulation of cell signaling in cancer*. FEBS letters, 588(16), 2558-2570.
- (23) Amin, A. R., Karpowicz, P. A., Carey, T. E., Arbiser, J., Nahta, R., Chen, Z. G., & Shin, D. M. (2015). *Evasion of anti-growth signaling: a key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds*. Seminars in Cancer Biology (35, pp. S55-S77). Academic Press.
- (24) Ribatti, D. (2017). *A revisited concept: Contact inhibition of growth. From cell biology to malignancy*. Experimental Cell Research, 359(1), 17-19.
- (25) Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics*. British Journal of Cancer, 26(4), 239-257.
- (26) Fernald, K., & Kurokawa, M. (2013). *Evading apoptosis in cancer*. Trends in Cell Biology, 23(12), 620-633.
- (27) Matsuura, K., Canfield, K., Feng, W., & Kurokawa, M. (2016). *Metabolic regulation of apoptosis in cancer*. International Review of Cell and Molecular Biology, 327, 43-87.
- (28) Goh, P. P., Sze, D. M., & Roufogalis, B. D. (2007). *Molecular and cellular regulators of cancer angiogenesis*. Current Cancer Drug Targets, 7(8), 743-758.
- (29) Papetti, M., & Herman, I. M. (2002). *Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis*. American Journal of Physiology: Cell Physiology, 282(5), C947-C970.
- (30) Cairns, R. A., Khokha, R., & Hill, R. P. (2003). *Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view*. Current Molecular Medicine, 3(7), 659-671.
- (31) Schwager, S. C., Taufalele, P. V., & Reinhart-King, C. A. (2019). *Cell-cell mechanical communication in cancer*. Cellular and Molecular Bioengineering, 12(1), 1-14.

- (32) Feron, O. (2009). *Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells*. *Radiotherapy and Oncology*, 92(3), 329-333.
- (33) Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., & Kwon, B. S. (2015). *Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies*. *Seminars in Cancer Biology* (35, pp. S185-S198).
- (34) Korniluk, A., Koper, O., Kemoná, H., & Dymicka-Piekarska, V. (2017). *From inflammation to cancer*. *Irish Journal of Medical Science*, 186(1), 57-62.
- (35) Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). *Genomic instability: an evolving hallmark of cancer*. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(3), 220-228.
- (36) Graziano, S., & Gonzalo, S. (2017). *Mechanisms of oncogene-induced genomic instability*. *Biophysical Chemistry*, 225, 49-57.
- (37) Ahmed, B., Qadir, M. I., & Ghafoor, S. (2020). *Malignant Melanoma: Skin Cancer: Diagnosis, Prevention, and Treatment*. *Critical Reviews, Eukaryotic Gene Expression*, 30(4).
- (38) Gregory L. Wells MD, Ada West. (2020). *Melanoma (Melanoma maligno)*. Manual MSD versión para profesionales. Consultado en Junio de 2021 en <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>
- (39) Myers, D. J., & Hyde, E. A. (2021). *Aggressive Nodular Malignant Melanoma*. *Cureus*, 13(8).
- (40) Samaniego, E., & Redondo, P. (2013). *Lentigo maligno*. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 104(9), 757-775.
- (41) B. Ashleigh Guadagnolo, K. Kian Ang, Matthew T. Ballo. (2010). *Chapter 6 - The Skin*. *Radiation Oncology (Ninth Edition)*, 141-157.
- (42) International Agency for Research on Cancer. (2020). *Melanoma of skin*. Global Cancer Observatory. Consultado en Junio de 2021 en <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/16-Melanoma-of-skin-fact-sheet.pdf>.

- (43) American Cancer Society (2020). *Melanoma of the skin: at a glance*. American Cancer Society - Cancer Facts & Statistics. Consultado en Junio de 2021 en <https://cancerstatisticscenter.cancer.org/#!/cancer-site/Melanoma%20of%20the%20skin>
- (44) Sociedad Española de Oncología Médica (2021). *Los avances en melanoma*. Consultado en Junio de 2021 en <https://seom.org/avances-melanoma>
- (45) Sociedad Española de Oncología Médica. (2020). *Las cifras del cáncer en España 2020*. Consultado en Junio de 2021 en https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Cifras_del_cancer_2020.pdf
- (46) Grau-Pérez, M., Carretero, G., Almeida, P., Castro-González, E., del Pilar de-la-Rosa, M., González-Martín, J. M., & Borrego, L. (2021). *The incidence of skin melanoma in Gran Canaria (Canary Islands, Spain) is lower than expected in Southern Europe despite high-risk environmental conditions: an island-wide cross-sectional study*. *Cancer Causes & Control*, 32 (5), 525-535.
- (47) Chen, S. T., Geller, A. C., & Tsao, H. (2013). *Update on the epidemiology of melanoma*. *Current Dermatology Reports*, 2 (1), 24-34.
- (48) Matthews, N. H., Li, W. Q., Qureshi, A. A., Weinstock, M. A., & Cho, E. (2017). *Epidemiology of melanoma*. Exon Publications, 3-22.
- (49) Linos, E., Swetter, S. M., Cockburn, M. G., Colditz, G. A., & Clarke, C. A. (2009). *Increasing burden of melanoma in the United States*. *Journal of Investigative Dermatology*, 129 (7), 1666-1674.
- (50) American Cancer Society. (2019). *Risk factors for melanoma skin cancer*. American Cancer Society. Consultado en Junio de 2021 en <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>
- (51) Noell, C., Aleissa, S., & Nguyen, B. M. (2018). *Skin cancer: At-risk populations and prevention*. In *A Practical Guide to Skin Cancer* (pp. 1-20). Springer, Cham.
- (52) Arnaut, J. R. M. B., dos Santos Guimarães, I., Dos Santos, A. C. E., da Silva, F. D. M. L., Machado, J. R., & de Melo, A. C. (2021). *Molecular*

landscape of Hereditary Melanoma. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 164, 103425.

(53) Rossi, M., Pellegrini, C., Cardelli, L., Ciciarelli, V., Di Nardo, L., & Fargnoli, M. C. (2019). *Familial melanoma: diagnostic and management implications*. Dermatology Practical & Conceptual, 9(1), 10.

(54) Gupta, V., & Sharma, V. K. (2019). *Skin typing: Fitzpatrick grading and others*. Clinics in Dermatology, 37(5), 430-436.

(55) Goldman, M. P. (2008). *Universal classification of skin type*. Simplified Facial Rejuvenation (pp. 47-50). Springer, Berlin, Heidelberg.

(56) Gupta, V., & Sharma, V. K. (2019). *Skin typing: Fitzpatrick grading and others*. Clinics in Dermatology, 37 (5), 430-436.

(57) Saginala, K., Barsouk, A., Aluru, J. S., Rawla, P., & Barsouk, A. (2021). *Epidemiology of Melanoma*. Medical Sciences, 9 (4), 63.

(58) Henriques, V., Martins, T., Link, W., & Ferreira, B. I. (2018). *The emerging therapeutic landscape of advanced melanoma*. Current Pharmaceutical Design, 24 (5), 549-558.

(59) Kalal, B. S., Upadhya, D., & Pai, V. R. (2017). *Chemotherapy resistance mechanisms in advanced skin cancer*. Oncology Reviews, 11 (1).

(60) Davis, E. J., Johnson, D. B., Sosman, J. A., & Chandra, S. (2018). *Melanoma: What do all the mutations mean?*. Cancer, 124 (17), 3490-3499.

(61) Griewank, K. G., Murali, R., & Wiesner, T. (2020). *Molecular pathology and genomics of melanoma*. Cutaneous Melanoma, 381-422.

(62) Testa, U., Castelli, G., & Pelosi, E. (2017). *Melanoma: genetic abnormalities, tumor progression, clonal evolution and tumor initiating cells*. Medical Sciences, 5 (4), 28.

(63) Tod, B. M., Schneider, J. W., Bowcock, A. M., Visser, W. I., & Kotze, M. J. (2020). *The tumor genetics of acral melanoma: What should a dermatologist know?*. JAAD International, 1 (2), 135-147.

(64) Kozar, I., Margue, C., Rothengatter, S., Haan, C., & Kreis, S. (2019). *Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted*

therapies. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 1871 (2), 313-322.

(65) Hilke, F. J., Sinnberg, T., Gschwind, A., Niessner, H., Demidov, G., Amaral, T. & Forschner, A. (2020). *Distinct mutation patterns reveal melanoma subtypes and influence immunotherapy response in advanced melanoma patients*. Cancers, 12(9), 2359.

(66) Shaughnessy, M., Klebanov, N., & Tsao, H. (2018). *Clinical and therapeutic implications of melanoma genomics*. Journal of Translational Genetics and Genomics, 2.

(67) Reddy, B. Y., Miller, D. M., & Tsao, H. (2017). *Somatic driver mutations in melanoma*. Cancer, 123 (S11), 2104-2117.

(68) Hamid, O., Cowey, C. L., Offner, M., Faries, M., & Carvajal, R. D. (2019). *Efficacy, safety, and tolerability of approved combination BRAF and MEK inhibitor regimens for BRAF-mutant melanoma*. Cancers, 11 (11), 1642.

(69) Vanella, V., Festino, L., Trojaniello, C., Vitale, M. G., Sorrentino, A., Paone, M., & Ascierto, P. A. (2019). *The role of BRAF-targeted therapy for advanced melanoma in the immunotherapy era*. Current Oncology Reports, 21 (9), 1-11.

(70) Johnson, D. B., & Puzanov, I. (2015). *Treatment of NRAS-mutant melanoma*. Current Treatment Options in Oncology, 16(4), 15.

(71) Vuković, P., Lugović-Mihić, L., Ćesić, D., Novak-Bilić, G., Šitum, M., & Spoljar, S. (2020). *Melanoma development: current knowledge on melanoma pathogenesis*. Acta Dermatovenerologica Croatica, 28 (2), 163-163.

(72) Leonardi, G. C., Falzone, L., Salemi, R., Zanghi, A., Spandidos, D. A., Mccubrey, J. A., ... & Libra, M. (2018). *Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy*. International Journal of Oncology, 52 (4), 1071-1080.

(73) Mohammadpour, A., Derakhshan, M., Darabi, H., Hedayat, P., & Momeni, M. (2019). *Melanoma: where we are and where we go*. Journal of Cellular Physiology, 234 (4), 3307-3320.

- (74) Krishnan, T., Menzies, A. M., & Roberts-Thomson, R. (2021). *Recent advancements in melanoma management*. *Internal Medicine Journal*, 51(3), 327-333.
- (75) Kaufman, H. L., & Mehnert, J. M. (Eds.). (2016). *Melanoma*. Springer.
- (76) Choudhari, A. S., Mandave, P. C., Deshpande, M., Ranjekar, P., & Prakash, O. (2020). *Phytochemicals in cancer treatment: From preclinical studies to clinical practice*. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1614.
- (77) Forni, C., Facchiano, F., Bartoli, M., Pieretti, S., Facchiano, A., D'Arcangelo, D., & Jadeja, R. N. (2019). *Beneficial role of phytochemicals on oxidative stress and age-related diseases*. *BioMed Research International*, 2019.
- (78) Cox-Georgian, D., Ramadoss, N., Dona, C., & Basu, C. (2019). *Therapeutic and medicinal uses of terpenes*. In *Medicinal Plants* (pp. 333-359). Springer, Cham.
- (79) Holopainen, J. K., Kivimäenpää, M., & Julkunen-Tiitto, R. (2018). *New light for phytochemicals*. *Trends in Biotechnology*, 36 (1), 7-10.
- (80) Rivera-Madrid, R., Carballo-Uicab, V. M., Cárdenas-Conejo, Y., Aguilar-Espinosa, M., & Siva, R. (2020). *Overview of carotenoids and beneficial effects on human health*. *Carotenoids: Properties, Processing and Applications* (pp. 1-40). Academic Press.
- (81) Misawa, N., Takemura, M., & Maoka, T. (2021). *Carotenoid Biosynthesis in Animals: Case of Arthropods*. *Carotenoids: Biosynthetic and Biofunctional Approaches*, 1261, 217-220.
- (82) Bhatt, T., & Patel, K. (2020). *Carotenoids: potent to prevent diseases review*. *Natural Products and Bioprospecting*, 10 (3), 109-117.
- (83) Fernandes, A. S., do Nascimento, T. C., Jacob-Lopes, E., De Rosso, V. V., & Zepka, L. Q. (2018). *Carotenoids: A brief overview on its structure, biosynthesis, synthesis, and applications*. *Progress in Carotenoid Research*, 1-15.
- (84) Böttger, A., Vothknecht, U., Bolle, C., & Wolf, A. (2018). *Alkaloids. Lessons on Caffeine, Cannabis & Co*, 179-203. Springer, Cham.

- (85) Salehi, B., Quispe, C., Sharifi-Rad, J., Cruz-Martins, N., Nigam, M., Mishra, A. P. & Koch, W. (2021). *Phytosterols: From preclinical evidence to potential clinical applications*. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1819.
- (86) Nguyen, L. T., Farcas, A. C., Socaci, S. A., Tofana, M., Diaconeasa, Z. M., Pop, O. L., & Salanta, L. C. (2020). *An Overview of Saponins—A Bioactive Group*. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, 77, 1.
- (87) Juang, Y. P., & Liang, P. H. (2020). *Biological and pharmacological effects of synthetic saponins*. *Molecules*, 25 (21), 4974.
- (88) Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Šimat, V., Hamed, I., Čagalj, M., & Popović Perković, Z. (2019). *Phenolic content of brown algae (Pheophyceae) species: Extraction, identification, and quantification*. *Biomolecules*, 9(6), 244.
- (89) Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., & Santini, A. (2019). *Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health*. *Phytotherapy Research*, 33 (9), 2221-2243.
- (90) Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). *A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables*. *Food Chemistry*, 126 (4), 1821-1835.
- (91) Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). *Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview*. *Medicines*, 5(3), 93.
- (92) Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). *Flavonoids as anticancer agents*. *Nutrients*, 12 (2), 457.
- (93) Kamiloglu, S., Tomas, M., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2021). *Effect of food matrix on the content and bioavailability of flavonoids*. *Trends in Food Science & Technology*, 117, 15-33.
- (94) Dufour, C., Loonis, M., Delosière, M., Buffière, C., Hafnaoui, N., Santé-Lhoutellier, V., & Rémond, D. (2018). *The matrix of fruit & vegetables modulates the gastrointestinal bioaccessibility of polyphenols and their impact on dietary protein digestibility*. *Food Chemistry*, 240, 314-322.

- (95) Hu, B., Liu, X., Zhang, C., & Zeng, X. (2017). *Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25 (1), 3-15.
- (96) Kesavardhana, S., Malireddi, R. S., & Kanneganti, T. D. (2020). *Caspases in cell death, inflammation and pyroptosis*. *Annual Review of Immunology*, 38, 567-595.
- (97) Boice, A., & Bouchier-Hayes, L. (2020). *Targeting apoptotic caspases in cancer*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1867 (6), 118688.
- (98) Kakarla, R., Hur, J., Kim, Y. J., Kim, J., & Chwae, Y. J. (2020). *Apoptotic cell-derived exosomes: messages from dying cells*. *Experimental & Molecular Medicine*, 52 (1), 1-6.
- (99) D'Arcy, M. S. (2019). *Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy*. *Cell Biology International*, 43(6), 582-592.
- (100) Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. (2018). *Apoptosis: a target for anticancer therapy*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (2), 448.
- (101) Kale, J., Osterlund, E. J., & Andrews, D. W. (2018). *BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death*. *Cell Death & Differentiation*, 25 (1), 65-80.
- (102) Adams, C. M., Clark-Garvey, S., Porcu, P., & Eischen, C. M. (2019). *Targeting the Bcl-2 family in B cell lymphoma*. *Frontiers in Oncology*, 8, 636.
- (103) Kalkavan, H., & Green, D. R. (2018). *MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business*. *Cell Death & Differentiation*, 25 (1), 46-55.
- (104) Adamkov, M. (2019). *Logical complexity of Bcl-2 family proteins function in the intrinsic apoptosis*. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*, 147 (1-2), 99-104.
- (105) Krishna, S., Kumar, S. B., Murthy, T. K., & Murahari, M. (2021). *Structure-based design approach of potential Bcl-2 inhibitors for cancer chemotherapy*. *Computers in Biology and Medicine*, 134, 104455.

- (106) Hafezi, S., & Rahmani, M. (2021). *Targeting BCL-2 in Cancer: Advances, Challenges, and Perspectives*. *Cancers*, 13 (6), 1292.
- (107) Ngoi, N. Y. L., Choong, C., Lee, J., Bellot, G., Wong, A. L., Goh, B. C., & Pervaiz, S. (2020). *Targeting mitochondrial apoptosis to overcome treatment resistance in cancer*. *Cancers*, 12(3), 574.
- (108) Imran, M., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Aslam Gondal, T., Saeed, F., Imran, A. & Estevinho, L. M. (2019). *Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential*. *Molecules*, 24(12), 2277.
- (109) Kedhari Sundaram, M., Raina, R., Afroze, N., Bajbouj, K., Hamad, M., Haque, S., & Hussain, A. (2019). *Quercetin modulates signaling pathways and induces apoptosis in cervical cancer cells*. *Bioscience Reports*, 39(8), BSR20190720.
- (110) Chae, H. S., Xu, R., Won, J. Y., Chin, Y. W., & Yim, H. (2019). *Molecular targets of genistein and its related flavonoids to exert anticancer effects*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (10), 2420.
- (111) Lee, J. H., & Lee, Y. K. (2019). *Anticancer Effect and Immunomodulatory Activity of Flavonoids and Their Mechanism*. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 10, 89.
- (113) Figel, S., & Fenstermaker, R. A. (2018). *Cell-cycle regulation. Handbook of Brain Tumor Chemotherapy, Molecular Therapeutics, and Immunotherapy* (pp. 257-269). Academic Press.
- (114) Hidayat, R., & Hayati, L. (2020). *Regulation of Cell Cycle*. *Biomedical Journal of Indonesia*, 6 (3), 84-90.
- (115) Khan, A. U., Dagur, H. S., Khan, M., Malik, N., Alam, M., & Mushtaque, M. (2021). *Therapeutic role of flavonoids and flavones in cancer prevention: Current trends and future perspectives*. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 3, 100010.
- (116) Kapoor, B., Gulati, M., Gupta, R., Singh, S. K., Gupta, M., Nabi, A., & Chawla, P. A. (2021). *A Review on Plant Flavonoids as Potential Anticancer Agents*. *Current Organic Chemistry*, 25 (6), 737-747.

- (117) Hosseinzadeh, E., Hassanzadeh, A., Marofi, F., Alivand, M. R., & Solali, S. (2020). *Flavonoid-based cancer therapy: an updated review*. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 20 (12), 1398-1414.
- (118) Ponte, L. G. S., Pavan, I. C. B., Mancini, M. C. S., da Silva, L. G. S., Morelli, A. P., Severino, M. B. & Simabuco, F. M. (2021). *The Hallmarks of Flavonoids in Cancer*. *Molecules*, 26 (7), 2029.
- (119) Tsai, M. H., Liu, J. F., Chiang, Y. C., Hu, S. C. S., Hsu, L. F., Lin, Y. C. & Lee, C. W. (2019). *Artocarpin, an isoprenyl flavonoid, induces p53-dependent or independent apoptosis via ROS-mediated MAPKs and Akt activation in non-small cell lung cancer cells*. *Oncotarget*, 10 (36), 3430.
- (120) Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). *Autophagy: cellular and molecular mechanisms*. *The Journal of Pathology*, 221 (1), 3-12
- (121) Hashim, M., Mohamed, N., & Mahmoud, E. (2018). *Role of autophagy in immune regulation*. *Sohag Medical Journal*, 22 (3), 329-331.
- (122) Trelford, C. B., & Di Guglielmo, G. M. (2021). *Molecular mechanisms of mammalian autophagy*. *Biochemical Journal*, 478 (18), 3395-3421.
- (123) Lin, F., Zhu, Y. T., & Qin, Z. H. (2021). *Biomarkers of Autophagy*. *Autophagy: Biology and diseases*. (pp. 265-287). Springer, Singapore.
- (124) Nie, T., Zhu, L., & Yang, Q. (2021). *The Classification and Basic Processes of Autophagy*. *Autophagy: Biology and diseases* (pp. 3-16). Springer, Singapore.
- (125) Liu, L., Liao, J. Z., He, X. X., & Li, P. Y. (2017). *The role of autophagy in hepatocellular carcinoma: friend or foe*. *Oncotarget*, 8(34), 57707.
- (126) Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Malik, S. A., & Kroemer, G. (2010). *Autophagy regulation by p53*. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 181-185.
- (127) Pang, X., Zhang, X., Jiang, Y., Su, Q., Li, Q., & Li, Z. (2021). *Autophagy: mechanisms and therapeutic potential of flavonoids in cancer*. *Biomolecules* 11(2), 135.

- (128) Prieto-Dominguez, N., Garcia-Mediavilla, M. V., Sanchez-Campos, S., Mauriz, J. L., & Gonzalez-Gallego, J. (2018). *Autophagy as a molecular target of flavonoids underlying their protective effects in human disease*. *Current Medicinal Chemistry*, 25 (7), 814-838.
- (129) Dias, I. H., Milic, I., Heiss, C., Ademowo, O. S., Polidori, M. C., Devitt, A., & Griffiths, H. R. (2020). *Inflammation, lipid (per) oxidation, and redox regulation*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 33 (3), 166-190.
- (130) Barnes, R. P., Fouquerel, E., & Opresko, P. L. (2019). *The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 177, 37-45.
- (131) Murata, M. (2018). *Inflammation and cancer*. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 23 (1), 1-8.
- (132) Vazhappilly, C. G., Ansari, S. A., Al-Jaleeli, R., Al-Azawi, A. M., Ramadan, W. S., Menon, V. & Radhakrishnan, R. (2019). *Role of flavonoids in thrombotic, cardiovascular and inflammatory diseases*. *Inflammopharmacology*, 27 (5), 863-869.
- (133) Li, G., Ding, K., Qiao, Y., Zhang, L., Zheng, L., Pan, T., & Zhang, L. (2020). *Flavonoids Regulate Inflammation and Oxidative Stress in Cancer*. *Molecules*, 25 (23), 5628.
- (134) Karak, P. (2019). *Biological activities of flavonoids: an overview*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10 (4), 1567-1574.
- (135) Zuo, A. R., Dong, H. H., Yu, Y. Y., Shu, Q. L., Zheng, L. X., Yu, X. Y. & Cao, S. W. (2018). *The antityrosinase and antioxidant activities of flavonoids dominated by the number and location of phenolic hydroxyl groups*. *Chinese Medicine*, 13 (1), 1-12.
- (136) Wang, T. Y., Li, Q., & Bi, K. S. (2018). *Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate*. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13 (1), 12-23.
- (137) González-Paramás, A. M., Ayuda-Durán, B., Martínez, S., González-Manzano, S. & Santos-Buelga, C. (2019). *The mechanisms behind the*

biological activity of flavonoids. Current Medicinal Chemistry, 26(39), 6976-6990.

(138) Baskar, V., Venkatesh, R., & Ramalingam, S. (2018). *Flavonoids (antioxidants systems) in higher plants and their response to stresses*. Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants (pp. 253-268). Springer, Cham.

(139) Purwanto, P., & Martono, S. (2020). *Activity of Noni Fruit (Morinda citrifolia L.) Ethanolic Extract on Class mu Glutation S-Transferase of Lung Rat*. Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention, 11(1), 46-53.

(140) De Silva, M. B., & Tencomnao, T. (2018). *The protective effect of some Thai plants and their bioactive compounds in UV light-induced skin carcinogenesis*. Journal of Photochemistry and Photobiology - Biology, 185, 80-89.

(141) Dias, A. S., Helguero, L., Almeida, C. R., & Duarte, I. F. (2021). *Natural Compounds as Metabolic Modulators of the Tumor Microenvironment*. Molecules, 26(12), 3494.

(142) Kumar, A., Singh, A. K., Gautam, M. K., & Tripathi, G. (2020). *Role of Phytochemicals in Cancer Cell Metabolism Regulation*. Cancer Cell Metabolism: A Potential Target for Cancer Therapy (pp. 167-184). Springer, Singapore.

(143) Reckzeh, E. S., & Waldmann, H. (2020). *Development of glucose transporter (GLUT) inhibitors*. European Journal of Organic Chemistry, 2020 (16), 2321.

(144) Wang, G., Wang, J. J., Guan, R., Du, L., Gao, J., & Fu, X. L. (2017). *Strategies to target glucose metabolism in tumor microenvironment on cancer by flavonoids*. Nutrition and Cancer, 69(4), 534-554.

(145) Rankin, L. C., & Artis, D. (2018). *Beyond host defense: emerging functions of the immune system in regulating complex tissue physiology*. Cell, 173(3), 554-567.

(146) Medzhitov, R. (2008). *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 454 (7203), 428-435.

- (147) Ahmed, A. U. (2011). *An overview of inflammation: mechanism and consequences*. *Frontiers in Biology*, 6(4), 274.
- (148) Singh, N., Baby, D., Rajguru, J. P., Patil, P. B., Thakkannavar, S. S., & Pujari, V. B. (2019). *Inflammation and cancer*. *Annals of African Medicine*, 18 (3), 121.
- (149) Fishbein, A., Hammock, B. D., Serhan, C. N. & Panigrahy, D. (2021). *Carcinogenesis: Failure of resolution of inflammation?*. *Pharmacology & Therapeutics*, 218, 107670.
- (150) Greten, F. R., & Grivennikov, S. I. (2019). *Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences*. *Immunity*, 51 (1), 27-41.
- (151) Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. (2019). *Anti-inflammatory effects of flavonoids*. *Food Chemistry*, 299, 125124.
- (152) Ginwala, R., Bhavsar, R., Chigbu, D. G. I., Jain, P., & Khan, Z. K. (2019). *Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin*. *Antioxidants*, 8(2), 35.
- (153) Silva, B., Biluca, F. C., Gonzaga, L. V., Fett, R., Dalmarco, E. M., Caon, T., & Costa, A. C. O. (2021). *In vitro anti-inflammatory properties of honey flavonoids: A review*. *Food Research International*. 141, 110086.
- (154) Nile, S. H., Keum, Y. S., Nile, A. S., Jalde, S. S., & Patel, R. V. (2018). *Antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activity of natural plant flavonoids and their synthesized derivatives*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32 (1), e22002.
- (155) Shukla, R., Pandey, V., Vadnere, G. P., & Lodhi, S. (2019). *Role of flavonoids in management of inflammatory disorders*. *Bioactive food as dietary interventions for arthritis and related inflammatory diseases* (pp. 293-322). Academic Press.
- (156) Chen, L., Teng, H., Jia, Z., Battino, M., Miron, A., Yu, Z. & Xiao, J. (2018). *Intracellular signaling pathways of inflammation modulated by dietary flavonoids: The most recent evidence*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58 (17), 2908-2924.

- (157) Choy, K. W., Murugan, D., Leong, X. F., Abas, R., Alias, A., & Mustafa, M. R. (2019). *Flavonoids as natural anti-inflammatory agents targeting nuclear factor-kappa B (NFκB) signaling in cardiovascular diseases: a mini review*. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1295.
- (158) Khan, H., Ullah, H., Castilho, P. C. M. F., Gomila, A. S., D'Onofrio, G., Filosa, R. & Cao, H. (2020). *Targeting NF-κB signaling pathway in cancer by dietary polyphenols*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60 (16), 2790-2800.
- (159) Dhanasekaran, S., & Jaganathan, R. (2018). *Augmented cell signaling by natural polyphenols and flavonoids: insights into cancer cell remodeling and prevention*. *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 58, pp. 213-244). Elsevier.
- (160) Afshari, K., Haddadi, N. S., Haj-Mirzaian, A., Farzaei, M. H., Rohani, M. M., Akramian, F. & Abdolghaffari, A. H. (2019). *Natural flavonoids for the prevention of colon cancer: A comprehensive review of preclinical and clinical studies*. *Journal of Cellular Physiology*, 234 (12), 21519-21546.
- (161) Swetha, T. K., Priya, A. & Pandian, S. K. (2020). *Flavonoids for Therapeutic Applications*. *Plant Metabolites: Methods, Applications and Prospects* (pp. 347-378). Springer, Singapore.
- (162) Hou, D. X., & Kumamoto, T. (2010). *Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: direct binding and molecular modeling*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13 (5), 691-719.
- (163) Aldbass, A., Amina, M., Al Musayeib, N. M., Bhat, R. S., Al-Rashed, S., Marraiki, N. & El-Ansary, A. (2021). *Cytotoxic and anti-excitotoxic effects of selected plant and algal extracts using COMET and cell viability assays*. *Scientific Reports*, 11 (1), 1-11.
- (164) Boly, R., Gras, T., Lamkami, T., Guissou, P., Serteyn, D., Kiss, R., & Dubois, J. (2011). *Quercetin inhibits a large panel of kinases implicated in cancer cell biology*. *International Journal of Oncology*, 38(3), 833-842.
- (165) Izzi, V., Masuelli, L., Tresoldi, I., Sacchetti, P., Modesti, A., Galvano, F., & Bei, R. (2012). *The effects of dietary flavonoids on the regulation of redox inflammatory networks*. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)*, 17 (7), 2396-2418.

- (166) Bode, A. M., & Dong, Z. (2013). *Signal transduction and molecular targets of selected flavonoids*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19 (2), 163-180.
- (167) Rani, A., Anand, A., Kumar, K., & Kumar, V. (2019). *Recent developments in biological aspects of chalcones: the odyssey continues*. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14 (3), 249-288.
- (168) Jasim, H. A., Nahar, L., Jasim, M. A., Moore, S. A., Ritchie, K. J., & Sarker, S. D. (2021). *Chalcones: Synthetic Chemistry Follows Where Nature Leads*. *Biomolecules*, 11 (8), 1203.
- (169) Batovska, D. I., & Todorova, I. T. (2010). *Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones*. *Current Clinical Pharmacology*, 5 (1), 1-29.
- (170) Karthikeyan, C., SH Narayana Moorthy, N., Ramasamy, S., Vanam, U., Manivannan, E., Karunagaran, D. & Trivedi, P. (2015). *Advances in chalcones with anticancer activities*. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 10 (1), 97-115.
- (171) Gao, F., Huang, G., & Xiao, J. (2020). *Chalcone hybrids as potential anticancer agents: Current development, mechanism of action, and structure-activity relationship*. *Medicinal Research Reviews*, 40 (5), 2049-2084.
- (172) Rudrapal, M., Khan, J., Dukhyil, A. A. B., Alarousy, R. M. I. I., Attah, E. I., Sharma, T., & Bendale, A. R. (2021). *Chalcone scaffolds, bioprecursors of flavonoids: Chemistry, bioactivities and pharmacokinetics*. *Molecules*, 26 (23), 7177.
- (173) Mahapatra, D. K., Asati, V., & Bharti, S. K. (2020). *Promising anticancer potentials of natural chalcones as inhibitors of angiogenesis*. *Natural Products Chemistry* (pp. 253-268). Apple Academic Press.
- (174) Misra, S. K., & Pathak, K. (2021). *Naturally occurring heterocyclic anticancer compounds*. *Physical Sciences Reviews*.
- (175) Rammohan, A., Reddy, J. S., Sravya, G., Rao, C. N. & Zyryanov, G. V. (2020). *Chalcone synthesis, properties and medicinal applications: a review*. *Environmental Chemistry Letters*, 18 (2), 433-458.

- (176) Ouyang, Y., Li, J., Chen, X., Fu, X., Sun, S., & Wu, Q. (2021). *Chalcone Derivatives: Role in Anticancer Therapy*. *Biomolecules*, 11 (6), 894.
- (177) Selvakumar, N., Kumar, G. S., Azhagan, A. M., Rajulu, G. G., Sharma, S., Kumar, M. S. & Trehan, S. (2007). *Synthesis, SAR and antibacterial studies on novel chalcone oxazolidinone hybrids*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42 (4), 538-543.
- (178) Romagnoli, R., Baraldi, P. G., Carrion, M. D., Cruz-Lopez, O., Cara, C. L., Balzarini, J. & Viola, G. (2009). *Hybrid α -bromoacryloylamido chalcones. Design, synthesis and biological evaluation*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19 (7), 2022-2028.
- (179) Romagnoli, R., Prencipe, F., Lopez-Cara, L. C., Oliva, P., Baraldi, S., Baraldi, P. G. & Estévez, F. (2018). *Synthesis and biological evaluation of alpha-bromoacryloylamido indolyl pyridinyl propenones as potent apoptotic inducers in human leukaemia cells*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33 (1), 727-742.
- (180) Das, M., & Manna, K. (2016). *Chalcone scaffold in anticancer armamentarium: a molecular insight*. *Journal of Toxicology*. 2016, 7651047.
- (181) Qi, H., Jiang, Y., Yin, Z., Jiang, K., Li, L., & Shuai, J. (2018). *Optimal pathways for the assembly of the Apaf-1. Cytochrome c complex into apoptosome*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(3), 1964-1973.
- (182) Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. J., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S. & Zorov, D. B. (2018). *Functional significance of the mitochondrial membrane potential*. *Biochemistry. Supplemental Series A, Membrane and Cell Biology*, 12 (1), 20-26.
- (183) González-Arzola, K., Velázquez-Cruz, A., Guerra-Castellano, A., Casado-Combreras, M. Á., Pérez-Mejías, G., Díaz-Quintana, A., & De la Rosa, M. A. (2019). *New moonlighting functions of mitochondrial cytochrome c in the cytoplasm and nucleus*. *FEBS Letters*, 593 (22), 3101-3119.
- (184) Sullivan, R. J., & Flaherty, K. (2013). *MAP kinase signaling and inhibition in melanoma*. *Oncogene*, 32 (19), 2373-2379.

- (185) Zlobin, A., Bloodworth, J. C., & Osipo, C. (2019). *Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling*. Predictive Biomarkers in Oncology (pp. 213-221).
- (186) Zlobin, A., Bloodworth, J. C., & Osipo, C. (2018). *Mitogen-Activated Protein Kinase*. Predictive Biomarkers in Oncology: Applications in Precision Medicine, 213.
- (187) Hocker, T., & Tsao, H. (2007). *Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants*. Human Mutation, 28 (6), 578-588.
- (188) Kwong, L. N., & Davies, M. A. (2013). *Navigating the therapeutic complexity of PI3K pathway inhibition in melanoma*. Clinical Cancer Research, 19 (19), 5310-5319.
- (189) Hwang, S. Y., Chae, J. I., Kwak, A. W., Lee, M. H., & Shim, J. H. (2020). *Alternative options for skin cancer therapy via regulation of AKT and related signaling pathways*. International Journal of Molecular Sciences, 21(18), 6869.
- (190) Yang, X., Feng, Y., Liu, Y., Ye, X., Ji, X., Sun, L. & Wang, X. (2021). *Fuzheng Jiedu Xiaoji formulation inhibits hepatocellular carcinoma progression in patients by targeting the AKT/CyclinD1/p21/p27 pathway*. Phytomedicine, 87, 153575.
- (200) Jalali, A., & Zarshenas, M. M. (2021). *AKT/GSK-3 Pathway Targeting; Botanicals and Bioactive Compounds with Anticancer Activities*. Current Pharmaceutical Design.
- (201) Robertson, H., Hayes, J. D., & Sutherland, C. (2018). *A partnership with the proteasome; the destructive nature of GSK3*. Biochemical Pharmacology, 147, 77-92.
- (202) Duda, P., Wiśniewski, J., Wójtowicz, T., Wójcicka, O., Jaśkiewicz, M., Drulis-Fajdasz, D. & Gizak, A. (2018). *Targeting GSK3 signaling as a potential therapy of neurodegenerative diseases and aging*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 22 (10), 833-848.
- (203) Gajos-Michniewicz, A., & Czyz, M. (2020). *WNT signaling in melanoma*. International Journal of Molecular Sciences, 21 (14), 4852.

- (204) Kufe, D. W. (2020). *MUC1-C in chronic inflammation and carcinogenesis; emergence as a target for cancer treatment*. *Carcinogenesis*, 41 (9), 1173-1183.
- (205) Wu, D., & Pan, W. (2010). *GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling*. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(3), 161-168.
- (206) Li, V. S., Ng, S. S., Boersema, P. J., Low, T. Y., Karthaus, W. R., Gerlach, J. P., & Clevers, H. (2012). *Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex*. *Cell*, 149(6), 1245-1256.
- (207) Miraghazadeh, B., & Cook, M. C. (2018). *Nuclear factor-kappaB in autoimmunity: man and mouse*. *Frontiers in Immunology*, 9, 613.
- (208) Huang, H., Weng, H., Zhou, H., & Qu, L. (2014). *Attacking c-Myc: targeted and combined therapies for cancer*. *Current Pharmaceutical Design*, 20 (42), 6543-6554.
- (209) Lecarpentier, Y., Schussler, O., Hébert, J. L., & Vallée, A. (2019). *Multiple targets of the canonical WNT/ β -catenin signaling in cancers*. *Frontiers in Oncology*, 9, 1248.
- (210) Jin, Y. H., Yoo, K. J., Lee, Y. H., & Lee, S. K. (2000). *Caspase 3-mediated cleavage of p21 WAF1/CIP1 associated with the cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (39), 30256-30263.
- (211) Harvey, K. J., Lukovic, D., & Ucker, D. S. (2000). *Caspase-dependent Cdk activity is a requisite effector of apoptotic death events*. *The Journal of Cell Biology*, 148 (1), 59-72.
- (212) Kreis, N. N., Louwen, F., & Yuan, J. (2019). *The multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in cell differentiation, migration and cancer therapy*. *Cancers* 11 (9), 1220.
- (213) Lee, S. Y., Shin, S. J., & Kim, H. S. (2013). *ERK1/2 activation mediated by the nutlin-3-induced mitochondrial translocation of p53*. *International Journal of Oncology*, 42 (3), 1027-1035.
- (214) Narayan, S. (2004). *Curcumin, a multi-functional chemopreventive agent, blocks growth of colon cancer cells by targeting β -catenin-mediated*

transactivation and cell–cell adhesion pathways. Journal of molecular histology, 35(3), 301-307.

(215) Ryu, M. J., Cho, M., Song, J. Y., Yun, Y. S., Choi, I. W., Kim, D. E., & Oh, S. (2008). *Natural derivatives of curcumin attenuate the Wnt/ β -catenin pathway through down-regulation of the transcriptional coactivator p300*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 377(4), 1304-1308.

(216) Gervais, J. L., Seth, P., & Zhang, H. (1998). *Cleavage of CDK inhibitor p21Cip1/Waf1 by caspases is an early event during DNA damage-induced apoptosis*. Journal of Biological Chemistry, 273 (30), 19207-19212.

FIGURA S1

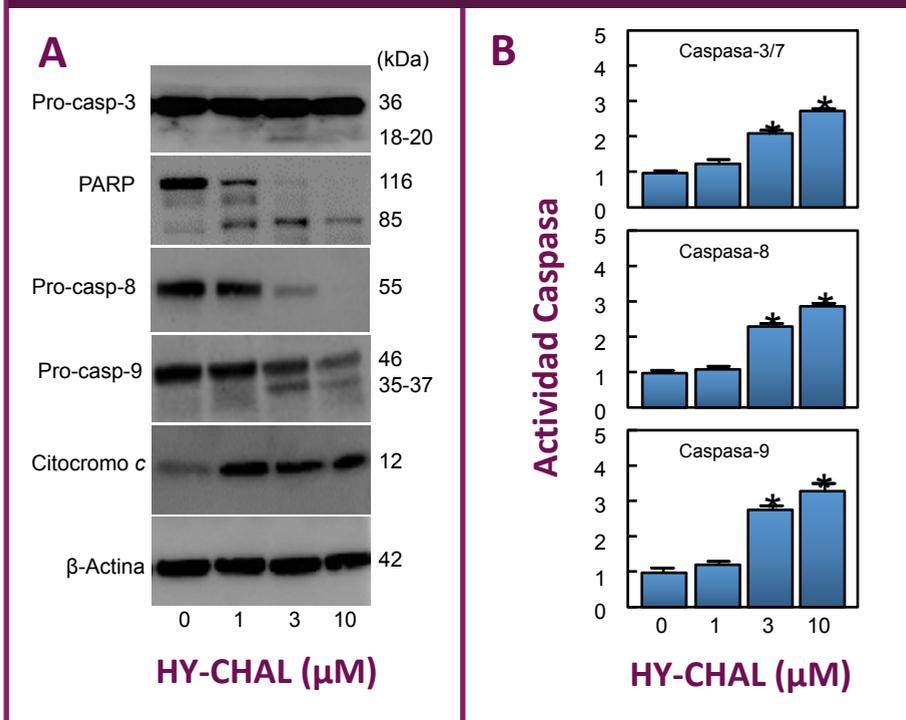


Figura Suplementaria S1. HY-CHAL Induce la Activación Proteolítica de las Caspasas y Genera un Aumento en su Actividad. (A) Las células MEL-HO fueron tratadas con concentraciones específicas de la chalcona híbrida durante un periodo de 24 horas, tras las cuales se procedió a obtener los correspondientes lisados celulares de cada grupo experimental. Posteriormente se analizó la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9. (B) Las células MEL-HO fueron sometidas a las mismas condiciones que en (A), pero en este caso los lisados celulares o la fracción citosólica (en el caso del análisis del citocromo c) estudiados mediante la técnica del Western Blot. La β -actina se empleó como control de carga.

FIGURA S2

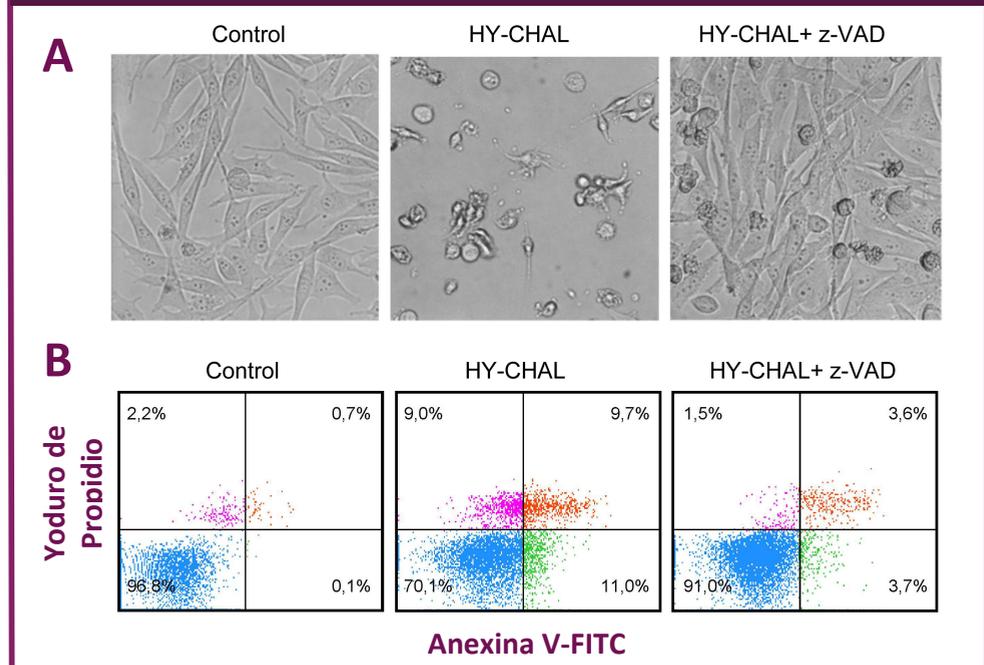


Figura Suplementaria S2. Efecto de z-VAD en Células MEL-HO Expuestas a la Chalcona Híbrida. (A) Las células se trataron con 100 μ M de z-VAD-fmk durante una hora y después se incubaron con o sin HY-CHAL (3 μ M) durante 24 horas. Posteriormente se tomaron imágenes empleando un microscopio invertido de contraste de fases. (B) Se sigue el mismo procedimiento que en (A) pero las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo para valorar la viabilidad de cada grupo experimental.

FIGURA S3

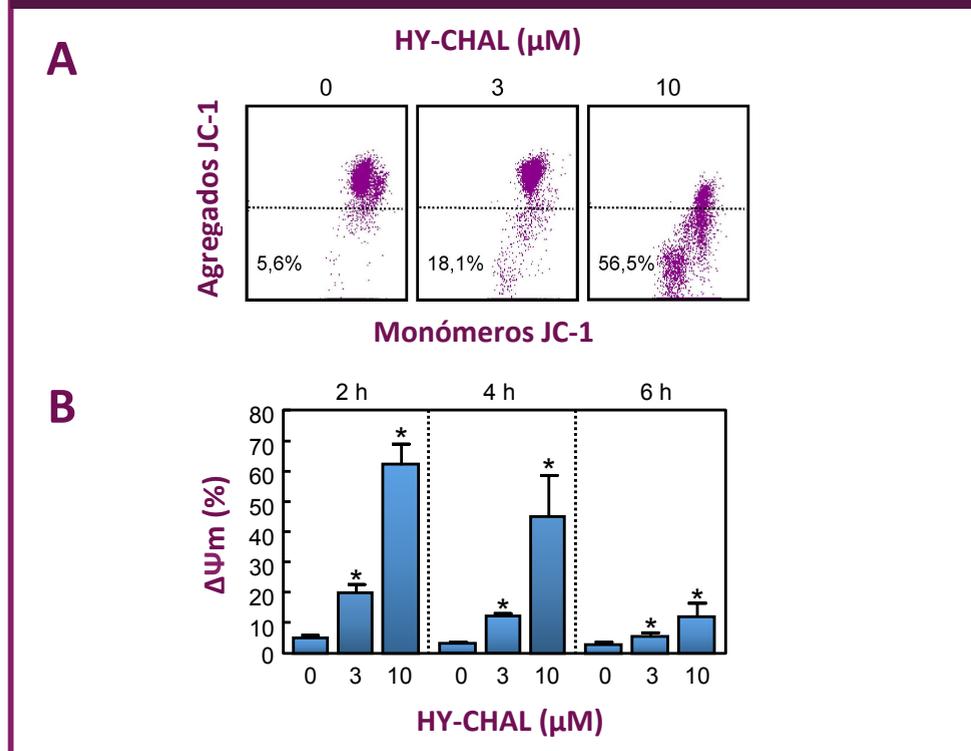


Figura Suplementaria S3. Efecto de HY-CHAL sobre el Potencial de Membrana Mitocondrial en Células MEL-HO. (A) Las células se incubaron con las concentraciones indicadas de la chalcona híbrida durante 2 horas, tras las cuales se analizó el $\Delta\Psi\text{m}$ mediante citometría de flujo. (B) Las MEL-HO se cultivaron bajo condiciones control o en presencia de las concentraciones de HY-CHAL indicadas y durante los tiempos especificados. El porcentaje de la reducción de $\Delta\Psi\text{m}$ se cuantificó mediante citometría de flujo.



Article

Apoptosis Pathways Triggered by a Potent Antiproliferative Hybrid Chalcone on Human Melanoma Cells

Irene Rodríguez¹, Ester Saavedra^{1,2} , Henoc del Rosario¹, Juan Perdomo¹ , José Quintana¹ ,
Filippo Prencipe³, Paola Oliva³, Romeo Romagnoli³ and Francisco Estévez^{1,*}

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35016 Las Palmas de Gran Canaria, Spain; irene.rodriguez118@alu.ulpgc.es (I.R.); ester.saavedra102@alu.ulpgc.es (E.S.); henoc.del101@alu.ulpgc.es (H.d.R.); juan.perdomo@ulpgc.es (J.P.); jose.quintana@ulpgc.es (J.Q.)

² Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC), 35016 Las Palmas de Gran Canaria, Spain

³ Dipartimento di Scienze Chimiche, Farmaceutiche ed Agrarie, Via L. Borsari 46, 44121 Ferrara, Italy; prnfpp@unife.it (F.P.); lvopla@unife.it (P.O.); rmr@unife.it (R.R.)

* Correspondence: francisco.estevez@ulpgc.es; Tel.: +34-928-451-443; Fax: +34-928-451-441

Abstract: The World Health Organization reported that approximately 324,000 new cases of melanoma skin cancer were diagnosed worldwide in 2020. The incidence of melanoma has been increasing over the past decades. Targeting apoptotic pathways is a potential therapeutic strategy in the transition to preclinical models and clinical trials. Some naturally occurring products and synthetic derivatives are apoptosis inducers and may represent a realistic option in the fight against the disease. Thus, chalcones have received considerable attention due to their potential cytotoxicity against cancer cells. We have previously reported a chalcone containing an indole and a pyridine heterocyclic rings and an α -bromoacryloylamido radical which displays potent antiproliferative activity against several tumor cell lines. In this study, we report that this chalcone is a potent apoptotic inducer for human melanoma cell lines SK-MEL-1 and MEL-HO. Cell death was associated with mitochondrial cytochrome *c* release and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and was prevented by a non-specific caspase inhibitor. Using SK-MEL-1 as a model, we found that the mechanism of cell death involves (i) the generation of reactive oxygen species, (ii) activation of the extrinsic and intrinsic apoptotic and mitogen-activated protein kinase pathways, (iii) upregulation of TRAIL, DR4 and DR5, (iv) downregulation of p21^{Cip1/WAF1} and, inhibition of the NF- κ B pathway.

Keywords: apoptosis; caspases; cytotoxicity; hybrid chalcones; extracellular signal-regulated kinases; melanoma; mitogen-activated protein kinase; reactive oxygen species



Citation: Rodríguez, I.; Saavedra, E.; del Rosario, H.; Perdomo, J.; Quintana, J.; Prencipe, F.; Oliva, P.; Romagnoli, R.; Estévez, F. Apoptosis Pathways Triggered by a Potent Antiproliferative Hybrid Chalcone on Human Melanoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13462. <https://doi.org/10.3390/ijms222413462>

Academic Editor: Atsushi Matsuzawa

Received: 30 October 2021

Accepted: 13 December 2021

Published: 15 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Among the different kinds of cancer, melanoma is the deadliest form of skin cancer for its aggressiveness and resistance to current therapies. The number of new cases of melanoma reported by the World Health Organization was approximately 324,000 with an associated 57,000 deaths worldwide in 2020 [1]. It is estimated that 196,060 new cases of melanoma will be diagnosed in the United States in 2021 [2,3]. Melanoma is the third most commonly diagnosed cancer in the group aged 20 to 39 years [4]. Current treatment for melanoma include, in addition to an adequate surgical excision, chemotherapy, radiotherapy, immunotherapy and targeted therapy [5–8]. However, many of these treatments are expensive, toxic, and less effective in treating the disease due to the appearance of resistance especially in the metastatic form [9]. Moreover, the introduction of new therapies such as immune checkpoint inhibitors and targeted therapies for metastatic melanoma has allowed a decrease in death rates for melanoma of 6.4% per year only between 2013 and 2017 in the United States [10,11]. Despite progress in treatments some patients are refractory to current therapies or develop resistance. Therefore, there is an urgent need to develop and improve potential new therapies in patients with melanoma.

The evasion of apoptosis is considered one of the hallmarks of cancer and there is a great interest and need for the development of new potential anticancer agents for use in clinical oncology that may overcome different types of resistance [12]. Apoptosis is a kind of cell death which is mediated by the activation of a class of cysteine-aspartic proteases, known as caspases [13]. These enzymes are responsible for many of the morphological and biochemical features of regulated cell death, including phosphatidylserine externalization, chromatin condensation, DNA fragmentation, and formation of apoptotic bodies. Two main apoptotic pathways have been described. The intrinsic pathway involves mitochondrial cytochrome *c* release to the cytosol and caspase-9 activation [14]. The extrinsic pathway is mediated by death receptors and involves caspase-8 activation [15]. Both caspase-8 and caspase-9 can catalyze the proteolytic activation of caspase-3 and caspase-7 which are responsible for cell demolition.

One of the most relevant aspects in the regulation of apoptosis and survival is the signaling by the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT pathways. The main groups of MAPKs include the extracellular signal-regulated kinases (ERKs) that also include ERK5, the c-Jun NH₂ terminal kinases (JNKs) and the p38 MAP kinases (p38^{MAPK}). Mitogens and growth factors activate the ERK cascade, while the JNK and p38^{MAPK} pathways are involved in apoptosis induction by diverse stimuli. Melanomas frequently exhibit mutations in the RAS/RAF/MEK/ERK pathway. The B-RAF^{V600E} mutation which is caused by the substitution of valine for glutamate at position 600 has been found in 50% cutaneous melanoma. This mutation determines that B-RAF is constitutively activated, which continuously stimulates MEK and ERK, leading to the proliferation and survival of melanoma cells [16]. Previous studies have also shown that the ERK and the PI3K/AKT pathways are interconnected in cutaneous melanoma [17]. For this reason, targeting both pathways may be an option in the treatment of melanoma [18].

Alterations in MAPKs and PI3K/AKT pathways may be triggered by reactive oxygen species (ROS). These chemical species are generated by the partial reduction of molecular oxygen and they are involved in the regulation of cell proliferation and apoptosis [19]. Compounds used in chemotherapy in the treatment of cancer are known to increase ROS generation resulting in cell death [20]. Many anticancer agents are inspired in naturally occurring products. Chalcones (1,3-diphenyl-2-propen-1-ones), a class of compounds characterized by the presence of two aromatic rings linked by a three-carbon α,β -unsaturated carbonyl system, have been shown to possess numerous biological activities, including antiproliferative, antiangiogenic, and anticancer properties [21]. This electrophilic α,β -unsaturated carbonyl moiety allows chalcones to act as Michael acceptors and react with cellular nucleophilic residues which may be responsible for covalent modifications of specific target proteins [22]. Both the double bond of the α,β -unsaturated carbonyl and the planar structure geometry have been reported to be essential for the potential anticancer activity of these compounds [23]. Chalcones constituted by an α,β -unsaturated ketone linking two aromatic heterocyclic rings represented by indole and pyridine moieties have attracted a lot of attention as potential anticancer agents. We have recently described different series of α -bromoacryloylamido indolyl pyridinyl propenones that show cytotoxicity against five human cancer cell lines [24]. These hybrid molecules were prepared to combine the α -bromoacryloyl moiety with two series of indole-inspired chalcone analogs, containing an indole derivative and a 3- or 4-pyridine ring, respectively, linked on either side of 2-propen-1-one system. Several human cancer cell lines, including a B cell precursor (NALM-6), myeloid (U-937, K-562), and lymphoid (MOLT-3) leukemia cells, and the SK-MEL-1 melanoma cells, were highly sensitive to the antiproliferative effect of these compounds. The most cytotoxic chalcone, (*E*)-2-bromo-*N*-(1-methyl-3-(3-oxo-3-(pyridin-4-yl)prop-1-en-1-yl)-1H-indol-5-yl)acrylamide (HY-CHAL), induced apoptosis along with a decrease in mitochondrial membrane potential in human leukemia cells and showed no cytotoxicity against fresh or proliferating peripheral blood mononuclear cells. However, the potential significance of this specific hybrid chalcone in antimelanoma therapy has not

been explored to date. The main aim of this work was to investigate whether HY-CHAL is a potential apoptotic inducer in melanoma cells and to elucidate the signal transduction pathways involved in cell death.

2. Results and Discussion

2.1. The Synthetic Hybrid Chalcone HY-CHAL Decreases the Viability of Human Melanoma Cells

Recently, we showed that an α -bromoacryloylamido indole-pyridine-chalcone derivative (HY-CHAL, Figure 1a) displayed high antiproliferative activity against human leukemia cells and showed less cytotoxicity (up 0.1 μ M) to either fresh or proliferating normal human peripheral blood mononuclear cells. To determine the effect on SK-MEL viability, cells were treated with increasing concentrations of HY-CHAL and evaluated the mitochondrial respiratory function by colorimetric MTT. As expected, HY-CHAL decreased the metabolic activity in a concentration-dependent manner with an IC_{50} value (the concentration that induces a 50% inhibition of cell growth) of $0.15 \pm 0.04 \mu$ M (Figure 1b). The antiproliferative and cytotoxic effects of HY-CHAL were also explored in an additional melanoma cell line MEL-HO, a human epithelial-like adherent cell line which has been described to contain the BRAFV600E mutation as well as the SK-MEL-1 cells [25]. This mutation leads to permanent mitogen-activated extracellular-signal-regulated kinase kinase (MEK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation. As shown in Figure 1b, HY-CHAL decreased the MTT reduction of MEL-HO in a concentration-dependent manner with an IC_{50} value of $0.3 \pm 0.1 \mu$ M, similar to the value obtained for SK-MEL-1 cells. The effect of HY-CHAL on melanoma cells was further analyzed by phase-contrast microscopy using the most effective concentration (3 μ M). As shown in Figure 1c, untreated SK-MEL-1 cells were round and healthy, while cells incubated in the presence of HY-CHAL showed important morphological changes, accompanied by a clear reduction in their number were also observed in the epithelial-like adherent MEL-HO cells. Together, these data indicate cytotoxicity of HY-CHAL against melanoma cells. In the following experiments, concentrations 10–30-fold higher than the antiproliferative IC_{50} values were used in order to identify the primary targets and early mechanism of action of HY-CHAL, since the reported IC_{50} values were determined at 72 h of treatment, while the potential targets were analyzed after a shorter incubation time.

2.2. HY-CHAL Induced Cell Death by Apoptosis on Human Melanoma Cells

To determine whether the cytotoxicity triggered by HY-CHAL was due to regulated cell death induction, treated cells were analyzed by fluorescent microscopy and flow cytometry. As shown in Figure 2a, HY-CHAL induced important morphological changes characteristic of apoptotic cells (condensed and fragmented chromatin) as detected by fluorescent microscopy after Hoechst 33,258 staining. Flow cytometric analyses revealed an increase in the percentage of hypodiploid cells (i.e., apoptotic cells). The histogram shows that the percentage of apoptotic cells increased ~8 fold (5.4% vs. 42.4%) in HY-CHAL-treated SK-MEL-1 cells, after 24 h exposure at a concentration as low as 3 μ M. A similar trend was observed in MEL-HO cells. HY-CHAL (3 μ M, 24 h) increased ~5-fold the percentage of hypodiploid cells indicating apoptotic cell death (Figure 2b). Dose-response experiments revealed an increase in the percentages of hypodiploid cells dependent on concentration (Figure 2c). In addition, HY-CHAL also led to the exposure of phosphatidylserine on the outside of the plasma membrane, which is an early marker of apoptosis, as detected by Annexin V-FITC staining (Figure 2d). These results demonstrated that HY-CHAL induced apoptosis in SK-MEL-1 and in MEL-HO and this effect was concentration-dependent.

2.3. HY-CHAL Induces Cell Death by a Caspase-Dependent Pathway in Human Melanoma Cells

Caspases are essential for the execution of apoptosis. To determine whether caspase activation was associated with the cell death induced by HY-CHAL, enzymatic analysis of these cysteine proteases was performed in time-course experiments using specific colorimetric tetrapeptide substrates (DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA for caspase-3/7,

caspase-8 and caspase-9, respectively). As shown in Figure 3a, treatment of SK-MEL-1 cells with 3 μM HY-CHAL induced activation of the executioner caspase-3/7 which was detected after 6 h and activity was more pronounced at 12 h of treatment. At this time, an increase of the activity of the initiator caspases, caspase-8 and -9, was also observed.

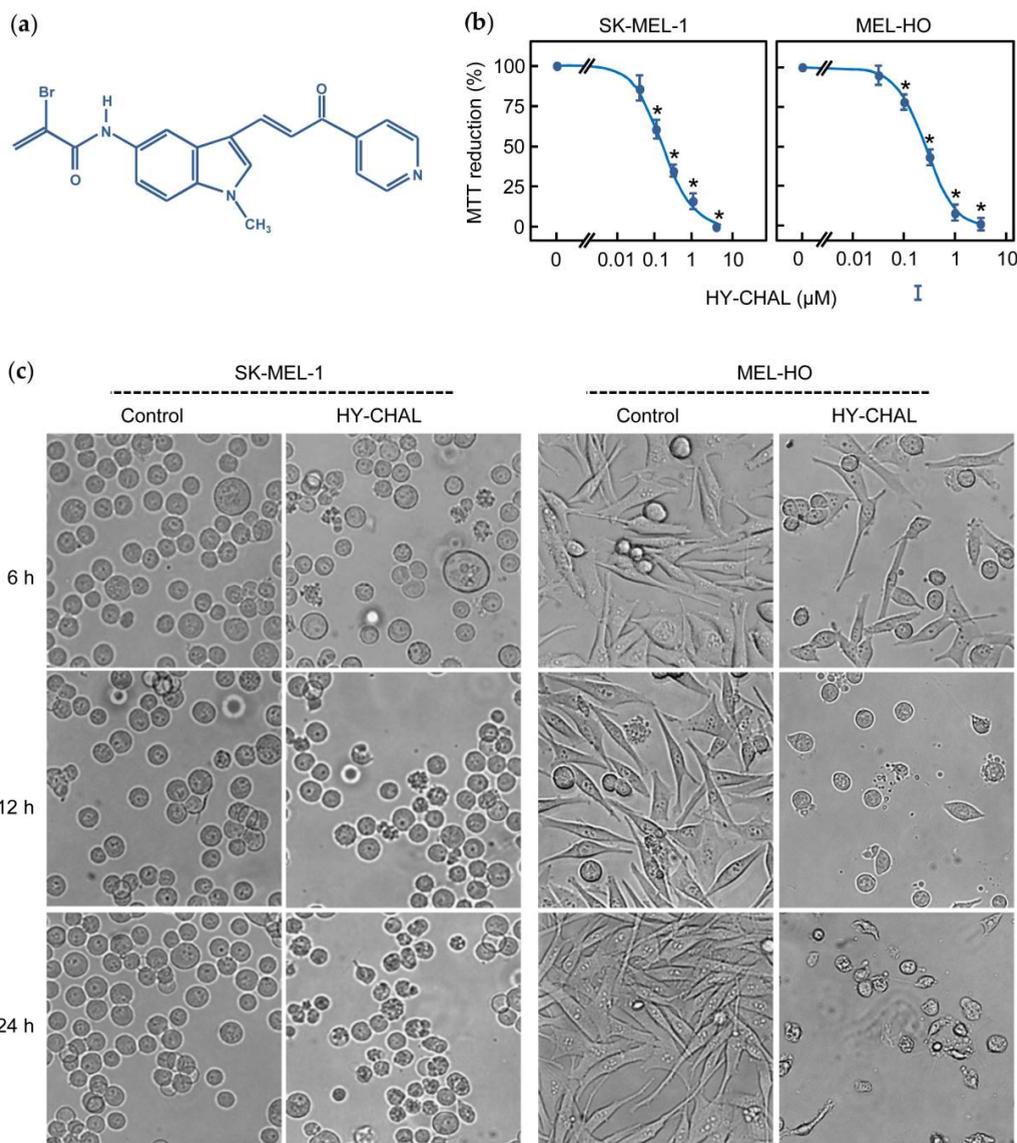


Figure 1. The hybrid chalcone (HY-CHAL) reduced the viability of human SK-MEL-1 and MEL-HO melanoma cells. (a) Chemical structure of the synthetic HY-CHAL; (b) Dose-response study on MTT reduction (means \pm SEs; * indicates significant difference from the control at 0.05 significance level). Cells were incubated in the presence of increasing concentrations of HY-CHAL for 72 h, and thereafter mitochondrial respiratory function was determined by the MTT assay; (c) Cells were incubated with 3 μM HY-CHAL for different time periods and images were obtained with an inverted phase-contrast microscope; original magnification 20 \times .

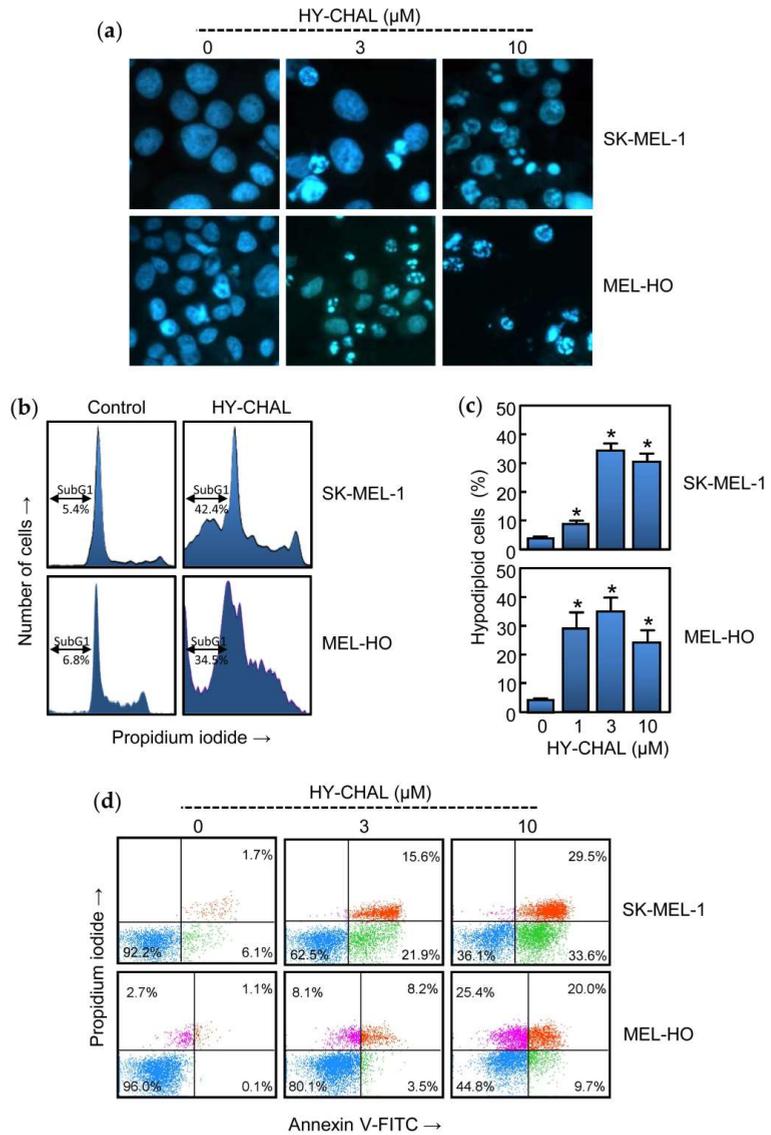


Figure 2. HY-CHAL induced apoptosis in melanoma cells. (a) Cells were incubated with increasing concentrations of HY-CHAL for 24 h, stained with bisbenzimidazole trihydrochloride, and images of representative fields were obtained with a fluorescence microscopy; (b) Representative histograms of flow cytometry study. Cells were incubated with 3 μM HY-CHAL, fixed and analyzed by flow cytometry after propidium iodide labeling. Hypodiploid cells (i.e., apoptotic cells) are shown in the region marked with a double edge arrow; (c) Cells were treated with increasing concentrations of HY-CHAL and the percentage of hypodiploid cells was determined by flow cytometry. Bars represent the means \pm SEs of three independent experiments each were performed in triplicate. * $p < 0.05$, significantly different from untreated control; (d) Cells were incubated with the specified concentrations of HY-CHAL for 24 h, stained with annexin V-FITC and propidium iodide and analyzed by flow cytometry. Data shown are representative of three independent experiments with similar results.

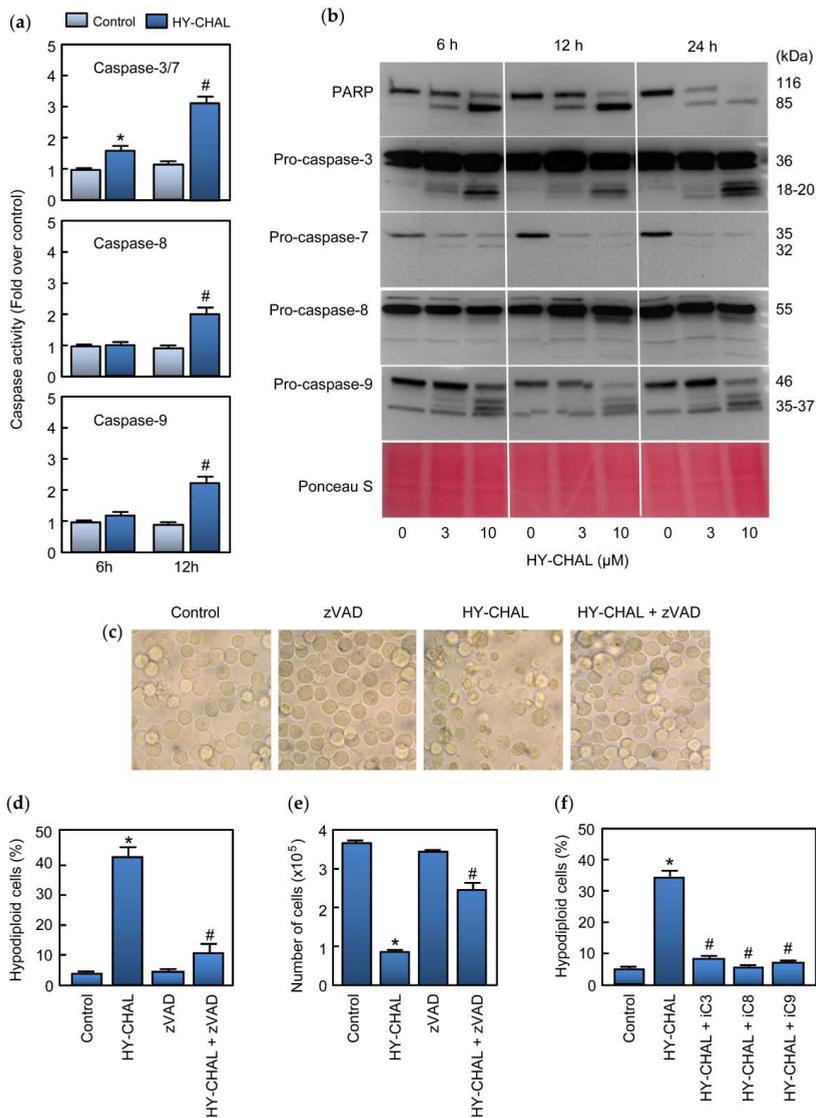


Figure 3. HY-CHAL induced caspase cascade in SK-MEL-1 melanoma cells. (a) Cells were treated with 3 μ M HY-CHAL for the indicated times and caspase activation was determined using specific colorimetric substrates; (b) Cells were treated with the specified concentrations of HY-CHAL and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage and caspase processing was determined by immunoblotting. The membrane was stained with Ponceau S before antibody detection to control equal protein loading; (c) Cells were pretreated with 100 μ M z-VAD-fmk for 1 h and then incubated in the absence or in the presence of 3 μ M HY-CHAL for 24 h and images were obtained with an inverted phase-contrast microscope; (d) Cells were treated as in (c) and hypodiploid cells (i.e., apoptotic cells) were analyzed by flow cytometry. Bars represent the mean \pm SE of three independent experiments each performed in triplicate. * Indicates $p < 0.05$ for comparison with untreated control. # Indicates $p < 0.05$ for comparison with HY-CHAL treatment alone; (e) Cells were treated as in (c) and cell viability was determined by the trypan blue exclusion method using a TC counter; (f) Cells were pretreated with the selective caspase inhibitors z-DEVD-fmk (iC3, 50 μ M), z-IETD-fmk (iC8, 50 μ M) and z-LEHD-fmk (iC9, 50 μ M) for 1 h before the addition of 3 μ M HY-CHAL and apoptotic cells were quantified as in (d).

Processing of caspases was also determined by western blot using specific antibodies against caspases and the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) which is a known caspase-3 and caspase-7 substrate [26]. To this end, SK-MEL-1 cells were incubated with increasing concentrations of HY-CHAL for different time periods and lysates were analyzed by immunoblotting. The results showed PARP cleavage leading to the formation of the characteristic ~85 kDa fragment which was evident after 6 h of treatment with 3 μ M HY-CHAL. Using MTT assay, SK-MEL-1 cells viability was 40% at 3 μ M for 24 h. Processing of caspases-3 and -7 was also detected by an increase in the corresponding fragments and in the case of caspase-7 by a decrease in the zymogen as well. These results are in accordance with PARP cleavage. Processing of initiator caspases, caspases-8 and -9, which were detected by the generation of the fragments as well as by an important decrease in the corresponding proenzyme in the case of caspase-9 (Figure 3b). In these experiments, Ponceau S staining before antibody detection was used as an alternative loading control. To define which caspases are involved in MEL-HO cell death, the enzymatic activity of cell lysates was analyzed after 24 h of treatment. As shown in Figure S1a (Supplementary materials), dose-response experiments revealed that a low concentration (3 μ M) of the chalcone activated the executioner caspase-3/7 activity, as well as the initiator caspases-8 and 9. The processing of caspases was analyzed by immunoblotting. As shown in Figure S1b (Supplementary materials), HY-CHAL stimulated the cleavage of caspase-3 and the initiator caspases (caspase-8 and -9). In accordance with the activation of caspase-3/7 and caspase-3 processing, PARP was effectively cleaved to the 85 kDa fragment.

We evaluated whether the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk could rescue SK-MEL-1 melanoma cells from HY-CHAL-induced cell death. To this end, cells were pretreated with z-VAD-fmk (100 μ M) and cultured in the absence or the presence of HY-CHAL for 24 h and visualized with an inverted phase-contrast microscope. As shown in Figure 3c, the cells appeared healthy in the combination group (z-VAD-fmk plus HY-CHAL). In addition, the general inhibitor of caspases was able to block in great part the increase in the percentage of apoptotic cells as determined by flow cytometry and to rescue the cells from death as determined by the trypan blue exclusion method (Figure 3d,e). z-VAD-fmk also blocked HY-CHAL-induced cell death in MEL-HO cells, as visualized by phase-contrast microscopy and determined by flow cytometric analysis of annexin V-FITC and propidium iodide stained cells (Supplementary materials, Figure S1c,d). The results showing that z-VAD-fmk inhibited cell death induced by HY-CHAL indicate that caspase activation has a key role in cell death. To deep knowledge about which specific caspase is involved in HY-CHAL-induced cell death, SK-MEL-1 cells were pretreated with permeable and selective caspase inhibitors for caspase-3/7, -8, and -9. As shown in Figure 3f, not only the caspase-3/7 inhibitor was able to block the increase in the percentage of hypodiploid cells, but also the specific caspase-8 and -9 inhibitors blocked completely cell death triggered by HY-CHAL.

2.4. HY-CHAL Down-Regulated the Pro-Survival Bcl-2 Members and Up-Regulated the Pro-Apoptotic Bcl-2 Proteins and Death Receptors and Its Ligand in Human Melanoma SK-MEL-1 Cells

The effects of HY-CHAL on B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) family proteins expression were evaluated since these proteins control the intrinsic apoptotic pathway and play a crucial role in protecting against cancer. To this end, cells were treated with increasing concentrations of HY-CHAL and different time periods and whole cell lysates were analyzed by immunoblotting (Figure 4a). Among the Bcl-2 proteins with anti-apoptotic activities, the expression of Bcl-2 itself, Bcl-x_L (B-cell lymphoma-extra-large), and Mcl-1 (Myeloid cell leukemia 1), one of the most potent anti-apoptotic protein of the Bcl-2 family, were analyzed. There was a decrease in Bcl-2 levels which was evident with 3 μ M and 10 μ M HY-CHAL after 24 h of treatment. Although 3 μ M HY-CHAL slightly upregulated Mcl-1, the levels of this pro-survival factor decreased after 6 h and 12 h of treatment with 10 μ M HY-CHAL. In contrast, there were no changes in Bcl-x_L levels at any time assayed.

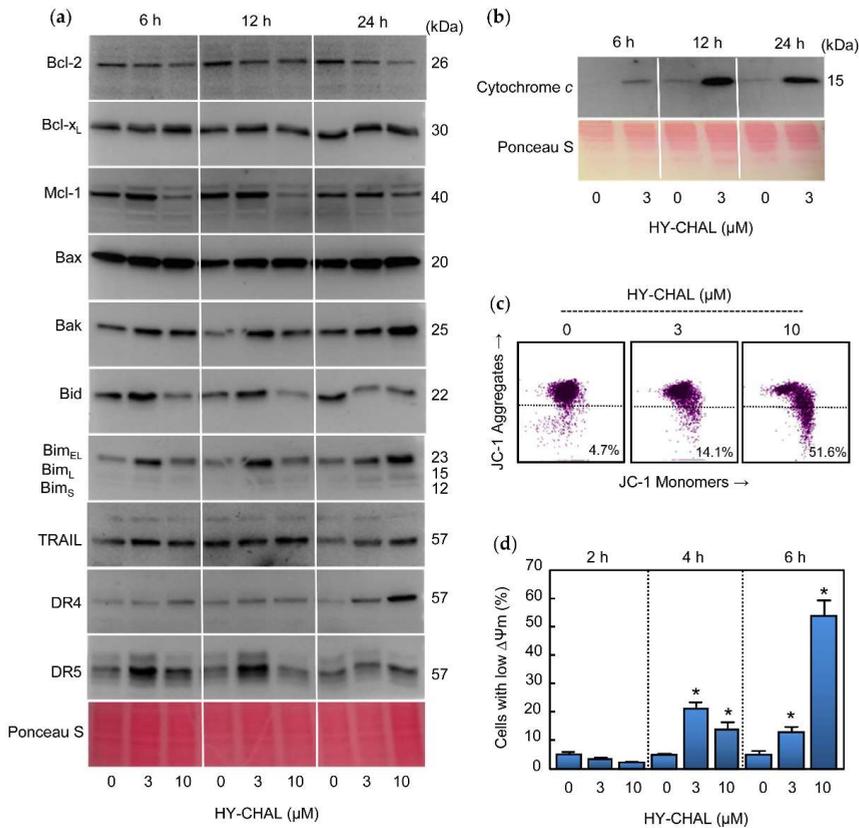


Figure 4. Role of the mitochondria, TRAIL and Death Receptors in the apoptotic cell death triggered by HY-CHAL in SK-MEL-1 melanoma cells. (a) Cells were treated with the specified concentrations of HY-CHAL for the indicated times and whole cell lysates were probed with antibodies raised against the indicated Bcl-2 family proteins, TRAIL, and death receptors by immunoblotting. Equal protein loading was controlled by staining the membranes with Ponceau S before the incubation with antibodies (a representative section of the stained membrane is shown); (b) Cells were treated with 3 μM HY-CHAL for the indicated times and cytosolic fractions prepared, separated by SDS-PAGE and cytochrome *c* was detected by immunoblotting. Equal protein loading was controlled by staining the membranes with Ponceau S; (c) Cells were incubated with the indicated concentrations of HY-CHAL for 6 h and $\Delta\Psi_m$ analyzed by flow cytometry after staining with the JC-1 probe as described in the Experimental Section; (d) Cells were incubated in control conditions or in the presence of the indicated concentrations of HY-CHAL for the specified times, and the percentage of cells with reduced $\Delta\Psi_m$ was quantified by flow cytometry using the fluorescent probe JC-1. * Indicates $p < 0.05$ for comparison with untreated control.

Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 proteins Bax (Bcl-2-associated X protein) and Bak (Bcl-2 antagonist killer) were analyzed since they are involved in the increase in permeability of the outer mitochondrial membrane and the release of proteins from the intermembrane space into the cytoplasm [27], which lead the subsequent initiation of the caspase cascade. As shown in Figure 4a, an increased levels of Bax and Bak were observed for all times assayed.

The BH3-only proteins of the Bcl-2 family are involved in the inhibition of pro-survival Bcl-2 proteins as well as in the direct activation of Bax and Bak. Therefore, the mechanism of action HY-CHAL was explored in relation to changes in the levels of the BH3-only proteins Bid (BH3-interacting domain death agonist) and Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death). Time-course and dose-response experiments revealed up-regulation of BimEL

isoform at 6 h of treatment with 3 μM HY-CHAL and all three major Bim isoforms (BimEL, BimL, and BimS) increased at 24 h of treatment with 3 and 10 μM HY-CHAL. Among the three Bim isoforms generated by alternative splicing, the shortest form, BimS, is the most cytotoxic and is generally only transiently expressed during apoptosis [28]. Slight increases in Bid levels were observed at 6 h and 12 h with 3 μM HY-CHAL, while there was a decrease at the same times with the highest concentration of the compound and at 24 h with both assayed concentrations, in accordance with the caspase-8 activation. Although we were unable to detect truncated Bid, the decrease in full-length Bid levels is probably a consequence of Bid cleavage by caspase-8.

Since HY-CHAL induced caspase-8 activation, this could be caused by TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) and/or Death Receptors as DR4 (Death Receptor 4) and DR5 (Death Receptor 5) up-regulation. To test this hypothesis, cells were treated with increasing concentrations of compound for the specified times and TRAIL, DR4, and DR5 were analyzed by Western blot. As shown in Figure 4a, a low concentration of HY-CHAL (3 μM) induced up-regulation of DR5 at 6 h and 12 h, whereas DR4 and TRAIL only slightly increased and this was more evident after 24 h of treatment. These results indicate that Death Receptors were differentially up-regulated following different kinetics.

2.5. HY-CHAL Induced Cytochrome *c* Release and Mitochondrial Membrane Potential Depolarization in Human Melanoma Cells

The release of cytochrome *c* of the mitochondrial intermembrane space to cytoplasm is a key event in the intrinsic pathway of cell death. To examine whether HY-CHAL-induced apoptosis involves the release of cytochrome *c* from intermembrane space to cytoplasm, time-course experiments were performed and cytosolic fractions were analyzed by immunoblotting. As shown in Figure 4b, a significant increase in the quantity of cytochrome *c* in the cytosol was detected at all times assayed after treatment with 3 μM HY-CHAL. The mechanism of cell death in MEL-HO was also examined to investigate whether it is involved in the mitochondrial cytochrome *c* release. The results revealed a significant increase in the amount of this hemoprotein in the cytosol, even after treatment with a concentration as low as 1 μM of compound (Supplementary materials, Figure S1b). Since the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) dissipation is also a crucial event in the mitochondrial pathway, it was also interesting to investigate whether a disruption of the $\Delta\Psi\text{m}$ was associated with the release of cytochrome *c*. To this end, cells were incubated for 6 h with increasing concentrations of HY-CHAL and analyzed by flow cytometry using the fluorescent probe JC-1. As shown in Figure 4c, the chalcone induced a significant loss of $\Delta\Psi\text{m}$, which suggests that the dissipation of the mitochondrial membrane potential might be involved in the mechanism of cell death. Maximal levels of reduced $\Delta\Psi\text{m}$ were observed after treatment with 10 μM of compound for 6 h (Figure 4d). A similar trend was observed in MEL-HO cells. HY-CHAL induced a fast dissipation of $\Delta\Psi\text{m}$ and maximal levels of reduced $\Delta\Psi\text{m}$ were detected with the highest concentration of chalcone (Supplementary materials, Figure S1e,f). In summary, these results showed that HY-CHAL induced apoptosis in SK-MEL-1 and MEL-HO cells which were associated with the release of cytochrome *c* and activation of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathway of cell death.

2.6. HY-CHAL Activated the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway and Inhibited AKT in Human Melanoma SK-MEL-1 Cells

The effect of HY-CHAL on mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathways was also evaluated due to their implication in cell proliferation, survival, and death. Specifically, the activation of the MAPK pathway is a central step in melanoma pathogenesis [29]. To this end, SK-MEL-1 cells were treated with increasing concentrations of chalcone for different time periods and activation of MAPKs was determined by western blot using specific antibodies. As shown in Figure 5a, HY-CHAL induced the phosphorylation of ERK1/2, JNK/SAPK and p38^{MAPK}. All MAPKs were fast activated starting at 1 h and remained elevated for up to at least 6 h, following similar kinetics and dependent on concentration. Interestingly, there was a fast downregulation of total ERK1/2 after treatment with 10 μM

HY-CHAL. In addition to the MAPK pathway, the phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase) pathway can also be activated by interactions between receptor tyrosine kinases and their ligands. Protein kinase B (PKB/AKT) is a downstream target of growth factor receptor activation and promotes cell survival. To investigate the role of AKT in the mechanism of cell death, the effect of HY-CHAL on phosphorylation status on Ser473, which is involved in its activation, was analyzed. As shown in Figure 5b, phospho-AKT levels were high on SK-MEL-1 cells and HY-CHAL reduced AKT phosphorylation in a time-dependent manner as detected by immunoblotting.

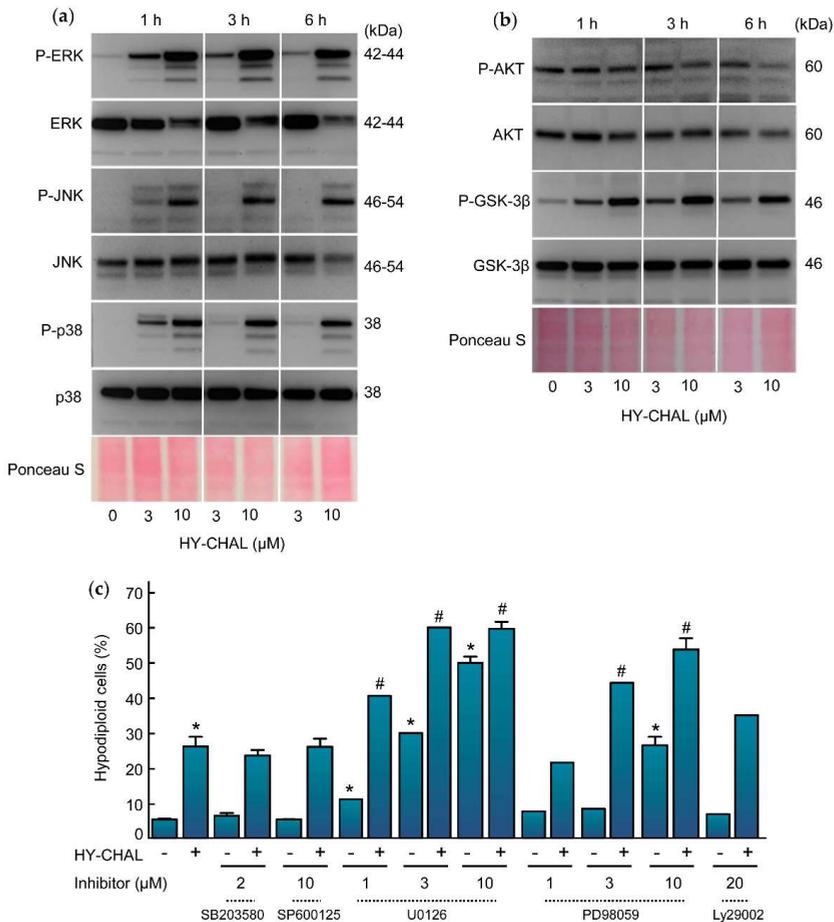


Figure 5. Effect of HY-CHAL on MAPK and AKT pathways. **(a)** Time-dependent phosphorylation of ERK1/2, JNK/SAPK and p38^{MAPK} and **(b)** of AKT and GSK-3β by HY-CHAL. Cells were incubated with the concentrations specified for the time periods shown. Lysates were analyzed on Western blots probed with specific antibodies to ascertain the phosphorylation of MAPKs, AKT, and GSK-3β. Membranes were stripped and reprobed with specified antibodies as loading controls. Equal protein loading was also controlled by staining the membrane with Ponceau S; **(c)** Effect of MAPKs and PI3K inhibitors on HY-CHAL-induced cell death. Cells were preincubated with the p38^{MAPK} inhibitor SB203580 (2 μM), the JNK/SAPK inhibitor SP600125 (10 μM), the indicated concentrations of the MEK1/2 inhibitors U0126 and PD98059 or the PI3K inhibitor LY294002 (20 μM) and then treated with 3 μM HY-CHAL for 24 h. The percentages of hypodiploid cells were determined by flow cytometry after propidium iodide staining. Bars represent means ± SEs of two independent experiments performed in triplicate. * Indicates *p* < 0.05 for comparison with untreated control. # Indicates *p* < 0.05 for comparison with HY-CHAL treatment alone.

AKT is involved in cell cycle regulation by preventing glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)-mediated phosphorylation and degradation of cyclin D1 and by negatively regulating the cyclin-dependent kinase inhibitors p27 and p21 [30,31]. GSK-3 β is a protein serine/threonine kinase and a critical downstream component of the PI3 kinase/AKT cell survival pathway whose activity can be inhibited by AKT-mediated phosphorylation at Ser9 [32]. To explore the effect of HY-CHAL on the activity of GSK-3 β we performed time-course and dose-response experiments and determined the levels of phosphoSer9 GSK-3 β which is indicative of inactivation. As shown in Figure 5b, there was a fast (1 h) phosphorylation of GSK-3 β even at concentrations as low as 3 μ M HY-CHAL.

To investigate the potential impact of the MAPK and PI-3K/AKT cascades in the signal transduction pathway of cell death we used specific inhibitors (Figure 5c). The results indicated that activation of both, JNK/SAPK and p38^{MAPK}, is not involved in cell death since the specific inhibitors SP600125 (10 μ M) and SB203580 (2 μ M) were unable to block the increase in the percentage of hypodiploid cells triggered by HY-CHAL. In contrast, the MEK inhibitors PD98059 and U0126 amplified cell death. These results indicate that cell death triggered by HY-CHAL is enhanced by MEK inhibitors and is independent on JNK/SAPK and p38^{MAPK}. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase pathway with LY294002 did not affect significantly the increase in the percentage of hypodiploid cells, revealing that the PI3K/AKT pathway is not involved in the induction of apoptosis.

2.7. HY-CHAL Downregulated β -Catenin, c-Myc and p21^{Cip1/WAF1} and Inhibited NF- κ B Pathway in Human Melanoma SK-MEL-1 Cells

The effect of HY-CHAL on the β -catenin levels was investigated, since the Wnt/ β -catenin pathway plays a key role in the regulation of proliferation and apoptosis in melanoma cells [33,34]. SK-MEL-1 cells express nuclear β -catenin under resting conditions and treatment with HY-CHAL reduced the levels of this transcription factor in a time- and concentration-dependent manner (Figure 6a). This result is surprising in terms of the effects of HY-CHAL on GSK-3 β enzyme activity (see Figure 5b). GSK-3 β is part of the multiprotein destruction complex which regulates the turnover of the free pool of cytoplasmic β -catenin. Targeting β -catenin by phosphorylation determines its proteasomal degradation. Therefore, it would be expected that the GSK-3 β inhibition would block β -catenin degradation and allow its migration to the nucleus to activate the transcription of specific pro-oncogenic proteins. A possible explanation could be the existence of different pools of this protein kinase that would reflect an imbalance between oncogenic (nuclear) and pro-apoptotic (cytoplasmic) GSK-3 β , as previously reported [35]. The results showed a clear downregulation of β -catenin starting at 6 h of treatment with 10 μ M HY-CHAL. This effect may be caused by proteolytic cleavage of β -catenin and could be related to caspase-3 activation. Additional studies are necessary to confirm the cleavage of β -catenin by this executioner caspase as proposed previously [36–41].

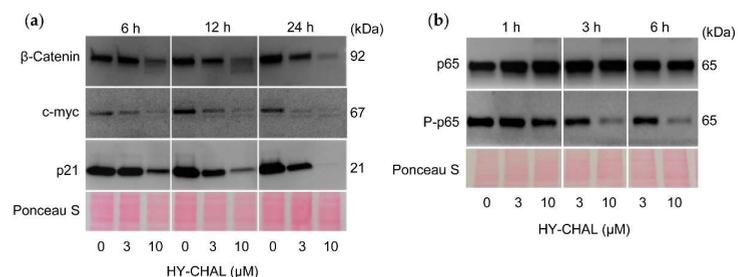


Figure 6. HY-CHAL downregulated β -catenin, c-myc and p21^{Cip1/WAF1}, and inhibited NF- κ B. (a,b) Cells were treated with the specified concentrations of HY-CHAL for the indicated times and cell lysates were probed with the specified antibodies. Equal loading was controlled by staining the membrane with Ponceau S.

Next, we examined the level of the transcription factor c-myc, an end product of the Wnt signaling pathway that is regulated by β -catenin/Tcf-Lef transactivation. To this end, cells were treated during different time periods and with increasing concentrations of HY-CHAL. As shown in Figure 6a, c-myc levels were downregulated and this effect was time- and concentration-dependent. The search for compounds able to suppress c-myc expression is of great interest since this transcription factor regulates the expression of many genes involved in multiple cellular processes including cell cycle [42], plays a key role in the development of a wide variety of cancers and it is upregulated in approximately 70% of human tumors [43,44]. Previous work has also described that the downregulation of c-myc increases the sensitivity of melanoma cells to cisplatin [45].

The cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{Cip1/WAF1} may cause cell cycle arrest but also it may act as an inhibitor of apoptosis. For example, the reduction of endogenous p21^{Cip1/WAF1} expression in cells that express high levels, such as MCF-7 cells, attenuates the growth arrest and promotes cell death [46]. In addition, it seems that the normal function of p21^{Cip1/WAF1} is to protect thymic tumor cells against apoptosis, since loss of p21^{Cip1/WAF1} enhances the apoptotic response [47]. As shown in Figure 6a, SK-MEL-1 cells express high levels of p21^{Cip1/WAF1} and the treatment with HY-CHAL decreased the levels in a time- and concentration-dependent manner. p21^{Cip1/WAF1} may be a target of caspase-3 which is activated after treatment with HY-CHAL, as shown above. Previous studies have demonstrated that human cancer cell lines treated with DNA-damaging agents undergo cell cycle arrest mediated by p21^{Cip1/WAF1} and this was followed by apoptosis after caspase-3-mediated cleavage of this cell cycle inhibitor [48]. These authors suggested that the inactivation of p21^{Cip1/WAF1} mediated by caspase-3 is a consequence of the removal of the C-terminal domain, which is essential for its interaction with the proliferating cells nuclear antigen and the nuclear localization. In addition, it has been proposed that compounds that downregulate p21^{Cip1/WAF1} may improve the action of anticancer agents, since the loss of p21^{Cip1/WAF1} usually enhances the sensitivity of tumor cells to apoptosis induced by different chemotherapeutic drugs [49].

The transcription factor NF- κ B is a potential target in antimelanoma therapy because it is constitutively activated in this cancer [50] and regulates the expression of genes involved in cell proliferation, survival, angiogenesis, metastasis, and inhibition of apoptosis [51]. To investigate the effect on NF- κ B, cells were treated for different time periods with increasing concentrations of HY-CHAL and total p65 and phospho-p65 were determined by western blot. As shown in Figure 6b, SK-MEL-1 cells showed basal phosphorylation of p65 indicating a basal activity of this transcription factor. Phospho-p65 levels were decreased by HY-CHAL, while total p65 amounts remained unchanged, indicating inhibition of the NF- κ B canonical pathway.

2.8. HY-CHAL Increased Reactive Oxygen Species (ROS) Generation and Glutathione Blocked ROS Formation and Cell Death in Human SK-MEL-1 Melanoma Cells

Increased reactive oxygen species production is known to induce cell death and many anticancer agents are known to increase ROS levels and causing cell death [20,52]. To determine whether HY-CHAL induces ROS, cells were analyzed using the fluorochrome H₂DCF-DA. The results revealed that HY-CHAL (3 μ M) induced a fast (1 h) elevation of ROS (Figure 7a). To further confirm the relevance of these chemical species in the mechanism of cell death triggered by the chalcone, different antioxidants were used including ascorbic acid (100 μ M), an analogue of vitamin E (trolox, 2 mM), *N*-acetyl-L-cysteine (NAC, 5 mM), catalase (500 units/mL) and glutathione (GSH, 5 mM). The results showed that catalase, NAC, and GSH were able to block apoptosis, being the tripeptide glutathione the most effective (Figure 7b). The levels of ROS increased ~2.5-fold after treatment with 3 μ M HY-CHAL and these decreased in the presence of glutathione (Figure 7c). These results indicate that cell death induced by the chalcone is dependent on ROS generation.

Many reports have emphasized that chalcones may be an alternative and safe approach in the prevention and treatment of cancer. Previous studies have shown that isoliquiritigenin (4,2',4'-trihydroxychalcone) decreases the viability of LNCaP and C4-2 prostate

cancer cells, without sparing normal IEC-6 epithelial cells [53]. An analog containing a *N*-methylindole similar to HY-CHAL, JAI-51, selectively inhibits cancer cells in comparison to normal human nucleated blood cells and normal human skin fibroblasts cells [54]. This chalcone displayed antitumor activity in an *in vivo* glioblastoma model and has potential against taxane-resistant cancers [55]. Hydroxysafflor yellow A was well tolerated and non-toxic in humans and had reasonable pharmacokinetic properties [56]. A naturally occurring chalcone, millepachine, had antitumor activity in a HepG2 tumor-bearing xenograft mice model *in vivo* and showed less toxicity than doxorubicin [57]. Licochalcone A has been reported to inhibit cisplatin-induced kidney and liver damage [58] and similar results were obtained with isoliquiritigenin which was able to reduce chemotherapy-induced kidney and liver toxicity [59]. Interestingly, this chalcone induced a significant reduction in metastatic nodules in the lung in a renal mouse cell carcinoma model without causing leukocytopenia, a common feature of chemotherapeutic drugs [60]. Future studies to determine the potential of HY-CHAL in human medicine are needed to address its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties.

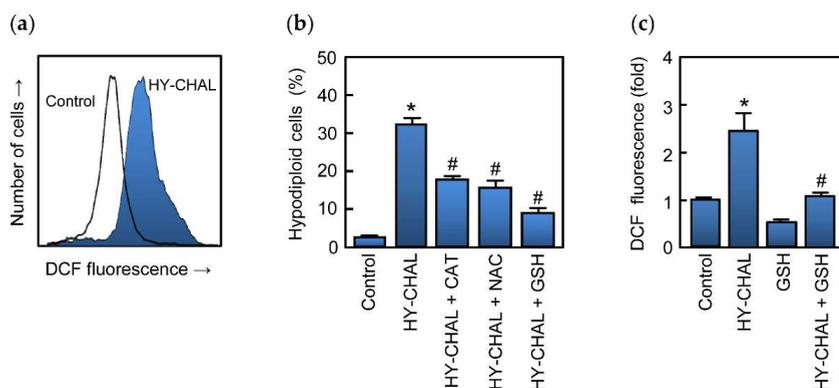


Figure 7. Role of ROS in HY-CHAL-induced cell death. (a) Representative histogram obtained by flow cytometry of the fluorescence of oxidized H_2DCF after treatment of SK-MEL-1 with $3 \mu M$ HY-CHAL for 1 h; (b) Cells were preincubated with catalase (500 units/mL), *N*-acetyl-L-cysteine (5 mM), or glutathione (5 mM) and then treated with HY-CHAL ($3 \mu M$) for 24 h and thereafter the percentage of hypodiploid cells was determined by flow cytometry; (c) Fluorescence obtained by the oxidation of H_2DCF of cells preincubated with glutathione (5 mM) for 2 h and then incubated with HY-CHAL ($3 \mu M$) as in (a). * Indicates $p < 0.05$, significantly different from untreated control. # Indicates $p < 0.05$, significantly different from HY-CHAL.

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals and Antibodies

The hybrid chalcone HY-CHAL was prepared by the condensation of α -bromoacrylic acid and a 5-aminoindole chalcone derivative as previously described [24]. HY-CHAL was dissolved in DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma, St. Louis, MO, USA) and kept under dark conditions at $-20^\circ C$. Before each experiment HY-CHAL was dissolved in culture media at $37^\circ C$ and the final concentration of DMSO did not exceed 0.3% (*v/v*). The inhibitor benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe) fluoromethyl ketone (z-VAD-fmk, Calbiochem, Darmstadt, Germany) was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). The inhibitors benzyloxycarbonyl-Asp(OMe)-Glu(O-Me)-Val-Asp(O-Me) fluoromethyl ketone (z-DEVD-fmk), benzyloxycarbonyl-Ile-Glu-Thr-Asp(OMe) fluoromethyl ketone (z-IETD-fmk), and benzyloxycarbonyl-Leu-Glu-His-Asp(OMe) fluoromethyl ketone (z-LEHD-fmk) were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). The inhibitors PD98059, U0126, SP600125, and SB203580 were purchased from Tocris (Bristol, UK). Acrylamide, bisacrylamide, ammonium persulfate and *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine were

from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). PVDF membranes and Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate were from Millipore (Billerica, MA, USA). All other chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA).

The primary antibodies used for Western blots were purchased from the following companies: anti-PARP [poly(ADP-ribose) polymerase, #551024, 1:5000 dilution], BD Pharmingen (San Diego, CA, USA), anti-caspase-3 (#ADI-AAP-113, 1:2000 dilution) from Enzo (Ann Arbor, MI, USA); anti-caspase-7 (#9494, 1:1000 dilution), anti-caspase-8 (#9746, 1:1000 dilution) and anti-caspase-9 (#95025, 1:1000 dilution) from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA); anti-cytochrome *c* (556433, 1:1000 dilution) from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA); anti-Bcl-2 (#4223, 1:1000 dilution), anti-Bax (#2772, 1:1000 dilution), anti-Bcl-x_L (#2764, 1:1000 dilution), anti-Bak (#12105, 1:1000 dilution), anti-Mcl-1 (#4572, 1:1000 dilution), anti-Bid (#2002, 1:1000 dilution), anti-Bim (#2933, 1:1000 dilution), anti-JNK/SAPK (#9252, 1:1000 dilution), antiphospho-JNK/SAPK (phosphor T183 + Y185) (#9251, 1:1000 dilution), anti-p44/42 MAP Kinase (ERK1/2) (#9102, 1:1000 dilution), anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (#9101, 1:1000 dilution), anti-p38MAPK (#9212, 1:1000 dilution), anti-phospho-p38MAPK (T180/Y182) (#9211, 1:1000 dilution); GSK-3β (#9315, 1:1000 dilution), anti-Phospho-GSK-3β (Ser9) (#9322, 1:1000 dilution), anti-Phospho-Akt (Ser473) (#9271, 1:1000 dilution), anti-β-actin (#4967, 1:1000 dilution); anti-p65 Phospho-NF-κB p65 (ser536) (#3033, 1:1000 dilution); anti-NF-κB p65 (#8242, 1:1000 dilution); anti-p21 (1:1000 dilution) antibodies from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Anti-AKT (SC-1618, 1:1000 dilution) anti-c-myc (SC-40, 1:500 dilution) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-TRAIL (ab9959, 1:1000 dilution), anti-DR4 (ab8414, 1:1000 dilution) and anti-DR5 (ab47179, 1:1000 dilution) were from Abcam (Cambridge, UK). Anti-β-actin (clone AC-74, A2228, 1:1000 dilution) was from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA); Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (NA9310 and NA9340, 1:10,000 dilution) were from GE Healthcare (Little Chalfont, UK).

3.2. Cell Culture and Viability Assays

Human melanoma cell lines SK-MEL-1 (ACC-303) and MEL-HO (ACC-62) were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). SK-MEL-1 are mostly round cells growing singly or in clumps in suspension [61]. They grow very slowly with a doubling time of several days, but with rapid medium acidification. Cells were described to produce pigment [62]. MEL-HO are epithelial-like adherent cells with doubling times of ca. 24 h. This cell line has significant tyrosinase mRNA expression and has been recently used as a model of TRAIL-sensitive cell lines that may still develop inducible TRAIL resistance [63]. Both cell lines have been reported to contain the BRAF V600E mutation [25,64]. Cells were cultured in RPMI 1640, 2 mM L-glutamine supplemented with 10% (*v/v*) heat-inactivated fetal bovine serum and 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin and maintained at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere. Cell viability was assessed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, cells were seeded at a density of 5000 cells per well into a 96-well plate and incubated with increasing concentrations of HY-CHAL for 72 h. The supernatant was removed and 0.5 mg/mL MTT was added and incubated for 4 h at 37 °C. The reaction products were solubilized with sodium dodecyl sulfate (10% *w/v*) in 0.05 M HCl overnight under dark conditions. Absorbance was measured at 570 nm with a reference wavelength of 570 nm using an ELISA reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Each experimental condition was analyzed in triplicate. The IC₅₀ values were determined graphically for each experiment by a nonlinear regression using the curve-fitting routine implemented within the software Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

3.3. Evaluation and Quantification of Apoptosis

Fluorescence microscopy and flow cytometric analysis of propidium iodide-stained nuclei and of annexin V-FITC and propidium iodide-stained cells was carried out using

a BD FACSVerserTM cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) were performed as previously described [65].

3.4. Western Blot Analysis

Immunoblot analysis of whole cell lysates and for cytosolic fraction was performed as previously described. For whole cell lysates, cell pellets were resuspended in lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 2 mM tetrasodium pyrophosphate, 20 mM sodium β -glycerophosphate, 10 mM sodium fluoride, 2 mM sodium orthovanadate], containing the protease inhibitors phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSE, 1 mM), leupeptin, aprotinin, and pepstatin A (5 μ g/mL each) for 15 min at 4 °C. Lysates were homogenized by a sonifier (five cycles) and centrifuged at 11,000 \times *g* for 10 min at 4 °C. Equal quantities of proteins from supernatants were boiled in SDS-sample buffer for 5 min before loading on an SDS-polyacrylamide gel (10% for MAPKs and 12.5% for caspases). Proteins were electrotransferred to poly(vinylidene difluoride) (PVDF) membranes and detected by enhanced chemiluminescence. For subcellular fractionation, cells were washed twice with PBS and then resuspended in ice-cold buffer [20 mM HEPES (pH 7.5), 250 mM sucrose, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM PMSE, and 5 μ g/mL aprotinin, leupeptin, and pepstatin A]. After 15 min on ice, cells were lysed by pushing them several times through a 22-gauge needle, and the lysate was centrifuged at 1000 \times *g* for 5 min at 4 °C to eliminate nuclei and unbroken cells. This pellet was used as a nuclear fraction. The supernatant fraction was centrifuged at 105,000 \times *g* for 45 min at 4 °C, and the resulting supernatant was used as the soluble cytosolic fraction.

3.5. Assay of Caspase Activity

Caspase activity was determined in cell lysates using specific colorimetric substrates. Briefly, cells were treated with increasing concentrations of HY-CHAL for 12 or 24 h, harvested by centrifugation at 1000 \times *g* for 5 min at 4 °C and washed with PBS, and the cell pellets were kept on ice. The cells were resuspended in lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1% Chaps) and held on ice for 5 min. Lysates were centrifuged at 17,000 \times *g* for 10 min at 4 °C and the supernatants were collected. The total protein concentration in the supernatants was determined using the Bradford dye-binding assay. Equal quantities of protein from different treatments were used, and the assays were set up on the ice. The net increase of absorbance at 405 nm after incubation at 37 °C was indicative of enzyme activity. Specific colorimetric substrates for caspase-3/7, -8 and -9 activities were DEVD-*p*NA (*N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroaniline), IETD-*p*NA (*N*-acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-*p*-nitroaniline) and LEHD-*p*NA (*N*-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-*p*-nitroaniline), respectively.

3.6. Analysis of Mitochondrial Membrane Potential $\Delta\Psi_m$ and Detection of Intracellular Reactive Oxygen Species (ROS)

The membrane potential and intracellular ROS production were determined by flow cytometry. The fluorochrome 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1, 5 μ g/mL) was used to measure mitochondrial membrane depolarization. The fluorochrome 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂-DCF-DA, 10 μ M) was used to determine ROS.

3.7. Statistical Analysis

Two-way ANOVA was used to test for differences between concentrations and between cell types, with a Tukey post-hoc test used to compare between treatment concentrations and the control. The standard significance level (s.l.) of 0.05 was used. The GraphPad Prism 5 software was used.

4. Conclusions

We have evaluated the effects of a specific chalcone containing indole and pyridine heterocyclic rings on cell viability and apoptotic pathways in human melanoma cell lines. This hybrid chalcone, HY-CHAL, was a potent cytotoxic compound and an apoptotic inducer in SK-MEL-1 and MEL-HO melanoma cells. The fact that both melanoma cell lines were sensitive to HY-CHAL might be interesting given that melanoma is the most aggressive and lethal form of skin cancer and frequently resists chemotherapy. Here we explored the mechanism of cell death by investigating apoptotic pathways. In both cell lines, the antiproliferative effect of HY-CHAL was associated with the release of cytochrome *c* and a mechanism dependent of caspases. Futures studies will be necessary to determine whether additional pathways of cell death are involved in SK-MEL-1 and MEL-HO melanoma cells. The sensitivity of melanoma cells to HY-CHAL suggests that it should be considered for further preclinical and in vivo testing. The exploration of the signal transduction pathway of cell death using SK-MEL-1 cells as a model revealed that this compound induced (i) cell death by a mechanism that involves the intrinsic and the extrinsic pathways, (ii) activation of the MAPK pathway and the blockade of MEK/ERK cascade amplified the cell death, and (iii) downregulation of β -catenin, *c-myc*, p21^{Cip1/WAF1}, and Mcl-1 and (iv) inhibition of NF- κ B. In addition, cell death was dependent on the generation of reactive oxygen species since HY-CHAL induced an increase in ROS levels, and pre-incubation with glutathione suppressed the increase of ROS and inhibited significantly the cell death. The studies described here may open new avenues of research to understand the safety and full potential of HY-CHAL in human health.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms222413462/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, F.E.; methodology, I.R., E.S., H.d.R., J.P., F.P., P.O., R.R., J.Q. and F.E.; software, I.R., E.S., H.d.R., J.P., J.Q. and F.E.; validation, R.R., J.Q. and F.E.; formal analysis, J.Q. and F.E.; investigation, I.R., E.S., H.d.R., J.P., J.Q., F.P., P.O., R.R. and F.E.; resources, J.Q. and F.E.; data curation, J.Q. and F.E.; writing—original draft preparation, F.E.; writing—review and editing, J.Q. and F.E.; visualization, I.R., E.S., H.d.R., J.P., J.Q., F.P., P.O., R.R. and F.E.; supervision, J.Q. and F.E.; project administration, F.E.; funding acquisition, F.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by AGENCIA CANARIA DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y SOCIEDAD DE LA INFORMACIÓN (Consejería de Economía, Industria, Comercio y Conocimiento del Gobierno de Canarias), grant number CEI2019/05.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or supplementary material.

Acknowledgments: E.S. was supported by the Fundación Instituto Canario de Investigación del Cáncer.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

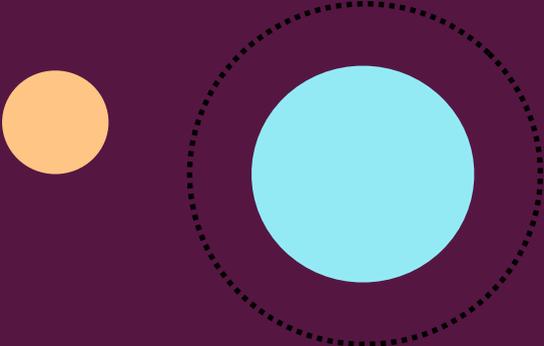
References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2021. American Cancer Society: Atlanta, 2021. Available online: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2021.html> (accessed on 29 October 2021).
3. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 7–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Miller, K.D.; Fidler-Benaoudia, M.; Keegan, T.H.; Hipp, H.S.; Jemal, A.; Siegel, R.L. Cancer statistics for adolescents and young adults, 2020. *CA A Cancer J. Clin.* **2020**, *70*, 443–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Malissen, N.; Grob, J.-J. Metastatic Melanoma: Recent Therapeutic Progress and Future Perspectives. *Drugs* **2018**, *78*, 1197–1209. [[CrossRef](#)]
6. Mohammadpour, A.; Derakhshan, M.; Darabi, H.; Hedayat, P.; Momeni, M. Melanoma: Where we are and where we go. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 3307–3320. [[CrossRef](#)]
7. Fujimura, T.; Hidaka, T.; Kambayashi, Y.; Aiba, S. BRAF kinase inhibitors for treatment of melanoma: Developments from early-stage animal studies to Phase II clinical trials. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2018**, *28*, 143–148. [[CrossRef](#)]
8. Payandeh, Z.; Yarahmadi, M.; Nariman-Saleh-Fam, Z.; Tarhriz, V.; Islami, M.; Aghdam, A.M.; Eyvazi, S. Immune therapy of melanoma: Overview of therapeutic vaccines. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 14612–14621. [[CrossRef](#)]
9. Simões, M.C.F.; Sousa, J.J.S.; Pais, A.A.C.C. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer Lett.* **2015**, *357*, 8–42. [[CrossRef](#)]
10. Berk-Krauss, J.; Stein, J.; Weber, J.; Polsky, D.; Geller, A.C. New Systematic Therapies and Trends in Cutaneous Melanoma Deaths Among US Whites, 1986–2016. *Am. J. Public Health* **2020**, *110*, 731–733. [[CrossRef](#)]
11. Mason, R.; Au, L.; Garces, A.I.R.; Larkin, J. Current and emerging systemic therapies for cutaneous metastatic melanoma. *Expert Opin. Pharmacother.* **2019**, *20*, 1135–1152. [[CrossRef](#)]
12. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)]
13. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 486–541. [[CrossRef](#)]
14. Kalkavan, H.; Green, D. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 46–55. [[CrossRef](#)]
15. Ashkenazi, A. Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: Lessons learned and future directions. *J. Clin. Investig.* **2015**, *125*, 487–489. [[CrossRef](#)]
16. Garnett, M.J.; Marais, R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* **2004**, *6*, 313–319. [[CrossRef](#)]
17. Tsao, H.; Yang, G.; Goel, V.; Wu, H.; Haluska, F.G. Genetic Interaction Between NRAS and BRAF Mutations and PTEN/MMAC1 Activation in Melanoma. *J. Investig. Dermatol.* **2004**, *122*, 337–341. [[CrossRef](#)]
18. Pappalardo, F.; Russo, G.; Candido, S.; Pennisi, M.; Cavalieri, S.; Motta, S.; McCubrey, J.A.; Nicoletti, F.; Libra, M. Computational Modeling of PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathways in Melanoma Cancer. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0152104. [[CrossRef](#)]
19. Moloney, J.N.; Cotter, T.G. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**, *80*, 50–64. [[CrossRef](#)]
20. Pelicano, H.; Carney, D.; Huang, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist. Updates* **2004**, *7*, 97–110. [[CrossRef](#)]
21. Shukla, S.; Sood, A.K.; Goyal, K.; Singh, A.; Sharma, V.; Guliy, N.; Gulati, S.; Kumar, S. Chalcone Scaffolds as Anticancer Drugs: A Review on Molecular Insight in Action of Mechanisms and Anticancer Properties. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2021**, *21*, 1650–1670. [[CrossRef](#)]
22. Jandial, D.; Blair, C.; Zhang, S.; Krill, L.; Zhang, Y.-B.; Zi, X. Molecular targeted approaches to cancer therapy and prevention using chalcones. *Curr. Cancer Drug Targets* **2014**, *14*, 181–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Marquina, S.; Maldonado-Santiago, M.; Sánchez-Carranza, J.N.; Antúnez-Mojica, M.; González-Maya, L.; Razo-Hernández, R.S.; Alvarez, L. Design, synthesis and QSAR study of 2'-hydroxy-4'-alkoxy chalcone derivatives that exert cytotoxic activity by the mitochondrial apoptotic pathway. *Bioorganic Med. Chem.* **2019**, *27*, 43–54. [[CrossRef](#)]
24. Romagnoli, R.; Prencipe, F.; Lopez-Cara, L.C.; Oliva, P.; Baraldi, S.; Baraldi, P.G.; Estévez-Sarmiento, F.; Quintana, J.; Estévez, F. Synthesis and biological evaluation of alpha-bromoacryloylamido indolyl pyridinyl propenones as potent apoptotic inducers in human leukaemia cells. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2018**, *33*, 727–742. [[CrossRef](#)]
25. Martin, M.J.; Hayward, R.; Viros, A.; Marais, R. Metformin Accelerates the Growth of BRAFV600E-Driven Melanoma by Upregulating VEGF-A. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 344–355. [[CrossRef](#)]
26. Margolin, N.; Raybuck, S.A.; Wilson, K.P.; Chen, W.; Fox, T.; Gu, Y.; Livingston, D.J. Substrate and Inhibitor Specificity of Interleukin-1 β -converting Enzyme and Related Caspases. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 7223–7228. [[CrossRef](#)]
27. Eskes, R.; Antonsson, B.; Osen-Sand, A.; Montessuis, S.; Richter, C.; Sadoul, R.; Mazzei, G.; Nichols, A.; Martinou, J.-C. Bax-induced Cytochrome C Release from Mitochondria Is Independent of the Permeability Transition Pore but Highly Dependent on Mg²⁺ Ions. *J. Cell Biol.* **1998**, *143*, 217–224. [[CrossRef](#)]
28. O'Connor, L.; Strasser, A.; O'Reilly, L.A.; Hausmann, G.; Adams, J.; Cory, S.; Huang, D. Bim: A novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* **1998**, *17*, 384–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Shain, A.H.; Yeh, I.; Kovalyshyn, I.; Sriharan, A.; Talevich, E.; Gagnon, A.; Dummer, R.; North, J.P.; Pincus, L.B.; Ruben, B.S.; et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1926–1936. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Diehl, J.A.; Cheng, M.; Roussel, M.F.; Sherr, C.J. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 3499–3511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Zhou, B.P.; Liao, Y.; Xia, W.; Spohn, B.; Lee, M.-H.; Hung, M.-C. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 245–252. [[CrossRef](#)]
32. Dajani, R.; Fraser, E.; Roe, M.; Young, N.; Good, V.; Dale, T.; Pearl, L.H. Crystal Structure of Glycogen Synthase Kinase 3 β : Structural Basis for Phosphate-Primed Substrate Specificity and Autoinhibition. *Cell* **2001**, *105*, 721–732. [[CrossRef](#)]
33. De Herreros, A.G.; Duñach, M.; De Herreros, G. Intracellular Signals Activated by Canonical Wnt Ligands Independent of GSK3 Inhibition and β -Catenin Stabilization. *Cells* **2019**, *8*, 1148. [[CrossRef](#)]

34. Zhan, T.; Rindtorff, N.; Boutros, M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* **2017**, *36*, 1461–1473. [[CrossRef](#)]
35. Patel, S.; Doble, B.; Woodgett, J. Glycogen synthase kinase-3 in insulin and Wnt signalling: A double-edged sword? *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 803–808. [[CrossRef](#)]
36. Jaiswal, A.S.; Marlow, B.P.; Gupta, N.; Narayan, S. β -Catenin-mediated transactivation and cell–cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* **2002**, *21*, 8414–8427. [[CrossRef](#)]
37. Brancolini, C.; Sgorbissa, A.; Schneider, C. Proteolytic processing of the adherens junctions components β -catenin and γ -catenin/plakoglobin during apoptosis. *Cell Death Differ.* **1998**, *5*, 1042–1050. [[CrossRef](#)]
38. Chen, S.; Guttridge, D.C.; You, Z.; Zhang, Z.; Fribley, A.; Mayo, M.W.; Kitajewski, J.; Wang, C.-Y. WNT-1 Signaling Inhibits Apoptosis by Activating β -Catenin/T Cell Factor–Mediated Transcription. *J. Cell Biol.* **2001**, *152*, 87–96. [[CrossRef](#)]
39. Ling, Y.-H.; Zhong, Y.; Pérez-Soler, R. Disruption of Cell Adhesion and Caspase-Mediated Proteolysis of β - and γ -Catenins and APC Protein in Paclitaxel-Induced Apoptosis. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 593–603. [[CrossRef](#)]
40. Schmeiser, K.; Grand, R.J. The fate of E- and P-cadherin during the early stages of apoptosis. *Cell Death Differ.* **1999**, *6*, 377–386. [[CrossRef](#)]
41. Steinhilber, U.; Weiske, J.; Badock, V.; Tauber, R.; Bommert, K.; Huber, O. Cleavage and Shedding of E-cadherin after Induction of Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 4972–4980. [[CrossRef](#)]
42. Stasevich, E.; Murashko, M.; Zinevich, L.; Demin, D.; Schwartz, A. The Role of Non-Coding RNAs in the Regulation of the Proto-Oncogene MYC in Different Types of Cancer. *Biomedicines* **2021**, *9*, 921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dang, C.V. MYC on the Path to Cancer. *Cell* **2012**, *149*, 22–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kalkat, M.; De Melo, J.; Hickman, K.A.; Lourenco, C.; Redel, C.; Resetca, D.; Tamachi, A.; Tu, W.B.; Penn, L.Z. MYC Deregulation in Primary Human Cancers. *Genes* **2017**, *8*, 151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Leonetti, C.; Biroccio, A.; Candiloro, A.; Citro, G.; Fornari, C.; Mottolise, M.; Del Bufalo, D.; Zupi, G. Increase of cisplatin sensitivity by c-myc antisense oligodeoxynucleotides in a human metastatic melanoma inherently resistant to cisplatin. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 2588–2595.
46. Gorospe, M.; Shack, S.; Guyton, K.Z.; Samid, D.; Holbrook, N.J. Up-regulation and functional role of p21Waf1/Cip1 during growth arrest of human breast carcinoma MCF-7 cells by phenylacetate. *Cell Growth Differ.* **1996**, *7*, 1609–1615.
47. Wang, Y.A.; Elson, A.; Leder, P. Loss of p21 increases sensitivity to ionizing radiation and delays the onset of lymphoma in atm-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 14590–14595. [[CrossRef](#)]
48. Zhang, Y.; Fujita, N.; Tsuruo, T. Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene* **1999**, *18*, 1131–1138. [[CrossRef](#)]
49. Gartel, A.L.; Tyner, A.L. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 639–649.
50. Melnikova, V.O.; Bar-Eli, M. Transcriptional control of the melanoma malignant phenotype. *Cancer Biol. Ther.* **2008**, *7*, 997–1003. [[CrossRef](#)]
51. Baud, V.; Karin, M. Is NF- κ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 33–40. [[CrossRef](#)]
52. Moldogazieva, N.T.; Mokhosoev, I.M.; Feldman, N.B.; Lutsenko, S.V. ROS and RNS signalling: Adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. *Free. Radic. Res.* **2018**, *52*, 507–543. [[CrossRef](#)]
53. Zhang, X.; Yeung, E.D.; Wang, J.; Panzhinskiy, E.E.; Tong, C.; Li, W.; Li, J. Natural Antioxidant-Isoliquiritigenin Selectively Inhibits Proliferation of Prostate Cancer Cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2010**, *37*, 841–847. [[CrossRef](#)]
54. Champelovier, P.; Chauchet, X.; Puch, F.; Vergnaud, S.; Garrel, C.; Laporte, F.; Boutonnat, J.; Boumendjel, A. Cellular and molecular mechanisms activating the cell death processes by chalcones: Critical structural effects. *Toxicol. Vitro.* **2013**, *27*, 2305–2315. [[CrossRef](#)]
55. Boumendjel, A.; McLeer-Florin, A.; Champelovier, P.; Allegro, D.; Muhammad, D.; Souard, F.; Derouazi, M.; Peyrot, V.; Toussaint, B.; Boutonnat, J. A novel chalcone derivative which acts as a microtubule depolymerising agent and an inhibitor of P-gp and BCRP in in-vitro and in-vivo glioblastoma models. *BMC Cancer* **2009**, *9*, 242. [[CrossRef](#)]
56. Yang, Z.; Yang, J.; Jia, Y.; Tian, Y.; Wen, A. Pharmacokinetic properties of hydroxysafflor yellow A in healthy Chinese female volunteers. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *124*, 635–638. [[CrossRef](#)]
57. Wu, W.; Ye, H.; Wan, L.; Han, X.; Wang, G.; Hu, J.; Tang, M.; Duan, X.; Fan, Y.; He, S.; et al. Millepachine, a novel chalcone, induces G2/M arrest by inhibiting CDK1 activity and causing apoptosis via ROS-mitochondrial apoptotic pathway in human hepatocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* **2013**, *34*, 1636–1643. [[CrossRef](#)]
58. Lee, C.K.; Son, S.H.; Park, K.K.; Park, J.H.Y.; Lim, S.S.; Kim, S.-H.; Chung, W.Y. Licochalcone A Inhibits the Growth of Colon Carcinoma and Attenuates Cisplatin-Induced Toxicity without a Loss of Chemotherapeutic Efficacy in Mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2008**, *103*, 48–54. [[CrossRef](#)]
59. Lee, C.K.; Son, S.H.; Park, K.K.; Park, J.H.Y.; Lim, S.S.; Chung, W.Y. Isoliquiritigenin Inhibits Tumor Growth and Protects the Kidney and Liver Against Chemotherapy-Induced Toxicity in a Mouse Xenograft Model of Colon Carcinoma. *J. Pharmacol. Sci.* **2008**, *106*, 444–451. [[CrossRef](#)]
60. Yamazaki, S.; Morita, T.; Endo, H.; Hamamoto, T.; Baba, M.; Joichi, Y.; Kaneko, S.; Okada, Y.; Okuyama, T.; Nishino, H.; et al. Isoliquiritigenin suppresses pulmonary metastasis of mouse renal cell carcinoma. *Cancer Lett.* **2002**, *183*, 23–30. [[CrossRef](#)]
61. Oettgen, H.F.; Aoki, T.; Old, L.J.; Boyse, E.A.; De Harven, E.; Mills, G.M. Suspension Culture of a Pigment-Producing Cell Line Derived from a Human Malignant Melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **1968**, *41*, 827–843. [[CrossRef](#)]

62. Perdomo, J.; Quintana, C.; González, I.; Hernández, I.; Rubio, S.; Loro, J.; Reiter, R.; Estévez, F.; Quintana, J. Melatonin Induces Melanogenesis in Human SK-MEL-1 Melanoma Cells Involving Glycogen Synthase Kinase-3 and Reactive Oxygen Species. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4970. [[CrossRef](#)]
63. Sarif, Z.; Tolksdorf, B.; Fechner, H.; Eberle, J. Mcl-1 targeting strategies unlock the proapoptotic potential of TRAIL in melanoma cells. *Mol. Carcinog.* **2020**, *59*, 1256–1268. [[CrossRef](#)]
64. Liu, R.; Zhang, T.; Zhu, G.; Xing, M. Regulation of mutant TERT by BRAF V600E/MAP kinase pathway through FOS/GABP in human cancer. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–13. [[CrossRef](#)]
65. Saavedra, E.; Estévez-Sarmiento, F.; Said, M.; Eiroa, J.L.; Rubio, S.; Quintana, J.; Estévez, F. Cytotoxicity of the Sesquiterpene Lactone Spiciformin and Its Acetyl Derivative against the Human Leukemia Cell Lines U-937 and HL-60. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2782. [[CrossRef](#)]



La Organización Mundial de la Salud estima que se diagnostican unos 132.000 nuevos casos de melanoma a nivel global cada año y la incidencia de este tipo de neoplasia se ha visto incrementada durante las últimas décadas. Algunas mutaciones inducen la adquisición de un fenotipo neoplásico que implican la inactivación del proceso apoptótico, mecanismo fisiológico que permite llevar a cabo la muerte celular programada. El presente estudio proporciona evidencias acerca de la inhibición de la viabilidad de las células de melanoma humano SK-MEL-1 y MEL-HO por una chalcona sintética. Este compuesto es más citotóxico que el antineoplásico etopósido frente a células tumorales, mientras que las células normales fueron sensiblemente más resistentes. Se han explorado las vías de señalización implicadas en la proliferación, la supervivencia y la muerte celular, específicamente las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis, los cambios en la expresión y liberación de proteínas mitocondriales, las cascadas de fosforilación y la generación de especies reactivas de oxígeno. Los resultados descritos sientan las bases científicas para la potencial utilización de este compuesto, solo o en combinación, en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en la lucha contra el cáncer.

