Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Rol del receptor ROR1 y de la proteína BCL2L10 en la progresión de melanoma

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. María Josefina Quezada

Director de Tesis: Dr. Pablo Lopez Bergami
Consejero de Estudios: Dr. Martín Monte

Lugar de trabajo: Laboratorio de Señalización en Melanoma, Centro de Estudios Biomédicos, Básicos, Aplicados y Desarrollo (CEBBAD), Universidad Maimónides.

Buenos Aires, 2025

La ignorancia genera confianza más frecuentemente que el conocimiento. Son los que saben poco, y no los que saben más, quienes afirman que este o aquel problema nunca será resuelto por la ciencia.

CHARLES DARWIN

Los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

- BCL2L10 Is Overexpressed in Melanoma Downstream of STAT3 and Promotes Cisplatin and ABT-737 Resistance. **Quezada MJ**, Picco ME, Villanueva MB, Castro MV, Barbero G, Fernández NB, Illescas E, Lopez-Bergami P. Cancers (Basel). 2020 Dec 30;13(1):78. doi: 10.3390/cancers13010078.
- Bcl-2-like protein-10 increases aggressive features of melanoma cells. Del Bufalo D, Di Martile M, Valentini E, Manni I, Masi I, D'Amore A, Filippini A, Nicoletti C, Zaccarini, M, Cota C, Castro MV, **Quezada MJ**, Rosanò L, Lopez-Bergami P, D'Aguanno S. Explor Target Antitumor Ther. (2022) 3:11–26. doi: 10.37349/etat.2022.00068.
- Bioinformatic analysis reveals shared and distinctive functions of the Wnt four tyrosine kinase receptors. **Quezada MJ**, Lopez-Bergami P. Enviado para su publicación.
- ROR1 enhances cell survival of melanoma by promoting the expression of Bcl2 family anti-apoptotic proteins. **Quezada MJ**, Picco ME, Alvarez, C, Lopez-Bergami P. En preparación.

Rol del receptor ROR1 y de la proteína BCL2L10 en la progresión de melanoma

Resumen

El receptor huérfano de tipo tirosina quinasa 1, ROR1, es un receptor del ligando WNT5A que se expresa en forma aberrante en distintos tipos de cánceres. La sobreexpresión de ROR1 ha sido asociada a una mayor progresión tumoral, transformándolo en un nuevo potencial blanco terapéutico. Su expresión y función en melanoma no ha sido estudiada en profundidad.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se pudo determinar que ROR1 se expresa en más del 90% de los pacientes con melanoma, en distintos estadios de la enfermedad. También se determinó que ROR1 regula positivamente proteínas de vías moleculares activadas e implicadas habitualmente en cáncer como AKT, ERK, p65 y STAT3. Además, mediante análisis bioinformático, se identificó que ROR1 se asocia con la expresión de genes que promueven la transición epitelio-mesenquimal (TEM) y la inhibición de la respuesta inmune y la apoptosis. Esta última observación fue confirmada experimentalmente al observar que ROR1 disminuye la exposición de fosfatidilserina, detectada mediante unión de Anexina V, en células de melanoma tratadas con distintos fármacos inductores de la muerte celular. Concordantemente, ROR1 aumentó la expresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, tales como BCL2, BCL-XL, MCL1 y BCL2L10. Se determinó que ROR1 regula a BCL2, BCL-XL y BCL2L10 mediante STAT3. Cabe mencionar que si bien se ha visto que ROR1 presenta un papel anti-apoptótico en distintos tipos de cánceres, no se había descripto hasta la fecha ninguna función en el proceso apoptótico en melanoma.

BCL2L10 es la proteína más recientemente identificada y menos estudiada de la subfamilia de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2. Estas proteínas son blancos terapéuticos importantes ya que están implicadas en la resistencia a muchos medicamentos anticancerígenos. La función de BCL2L10 solo se comprende parcialmente; se han descrito actividades tanto pro-apoptóticas como anti-apoptóticas y, dependiendo del tipo tumoral se la ha asociado tanto a un aumento de la supervivencia general y la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes, como a un mal pronóstico de la enfermedad. No se han determinado las razones de estas discrepancias en el papel de BCL2L10 en cáncer.

Este trabajo describe por primera vez la expresión y el rol de BCL2L10 en el melanoma. BCL2L10 se expresa frecuente y fuertemente en melanoma. Se determinó que su transcripción es activada por STAT3, por unión a su promotor. También se determinó que puede desempeñar funciones similares y distintas a BCL2, BCL-XL y/o BCL-W; y no tendría superposición con la función de MCL1. Además, se observó que BCL2L10 es un factor pro-supervivencia en melanoma, pudiendo proteger a las células del efecto citotóxico de la dacarbazina, cisplatino, y ABT-737, incluso cuando estos dos últimos medicamentos se combinan con inhibidores de BRAF, como el PLX-4032.

Interesantemente, las dos proteínas estudiadas en esta Tesis Doctoral, se encuentran interconectadas por el factor de transcripción STAT3 que es activado por ROR1 y promueve la transcripción de BCL2L10. De esta forma, se ha caracterizado una nueva vía de señalización: ROR1/STAT3/BCL2L10 que cumple un rol altamente relevante en la inhibición de la apoptosis y la quimioresistencia de melanoma. En resumen, dada la expresión aberrante de ROR1 y BCL2L10 en melanoma y sus funciones asociadas a la progresión y supervivencia tumoral, ambas proteínas representan dos nuevos y atractivos blancos terapéuticos en melanoma.

Palabras claves: melanoma, apoptosis, ROR1, BCL2L10, STAT3, TEM, quimioresistencia, supervivencia

Role of the ROR1 receptor and the BCL2L10 protein in melanoma progression

Abstract

The orphan receptor tyrosine kinase 1 receptor, ROR1, is a WNT5A ligand receptor that is aberrantly expressed in different types of cancers. Overexpression of ROR1 has been associated with increased tumor progression, making it a new potential therapeutic target. Its expression and function in melanoma have not been extensively studied.

In this Doctoral Thesis, it was determined that ROR1 is expressed in more than 90% of melanoma patients at different stages of the disease. It was also determined that ROR1 positively regulates proteins from activated molecular pathways commonly implicated in cancer, such as AKT, ERK, p65, and STAT3. Furthermore, bioinformatics analysis identified that ROR1 is associated with the expression of genes that promote epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the inhibition of immune response and apoptosis. This latter observation was confirmed experimentally by observing that ROR1 decreases phosphatidylserine exposure, detected by Annexin V binding, in melanoma cells treated with different cell death-inducing drugs. Concordantly, ROR1 increased the expression of anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family, such as BCL2, BCL-XL, MCL1, and BCL2L10. ROR1 was determined to regulate BCL2, BCL-XL, and BCL2L10 through STAT3. It is worth mentioning that while ROR1 has been shown to play an anti-apoptotic role in various cancers, no role in the apoptotic process in melanoma has been described to date.

BCL2L10 is the most recently identified and least studied protein of the Bcl-2 subfamily of anti-apoptotic proteins. These proteins are important therapeutic targets because they are implicated in resistance to many anticancer drugs. The function of BCL2L10 is partially understood; both pro- and anti-apoptotic activities have been described, and, depending on the tumor type, it has been associated with both increased overall and disease-free survival, as well as poor disease prognosis. The reasons for these discrepancies in the role of BCL2L10 in cancer have not been determined.

This work describes for the first time the expression and role of BCL2L10 in melanoma. BCL2L10 is frequently and strongly expressed in melanoma. It was determined that its transcription is activated by STAT3, through binding to its promoter. It was also determined that it may perform similar and distinct functions to BCL2, BCL-XL and/or BCL-W; and it appears to have no overlap with the function of MCL1. Furthermore, BCL2L10 was observed to be a pro-survival factor in melanoma, potentially protecting cells from the cytotoxic effects of dacarbazine, cisplatin, and ABT-737, even when the latter two drugs are combined with BRAF inhibitors, such as PLX-4032.

Interestingly, the two proteins studied in this Doctoral Thesis are interconnected by the STAT3 transcription factor, which is activated by ROR1 and promotes the transcription of BCL2L10. Thus, a new signaling pathway has been characterized: ROR1/STAT3/BCL2L10, which plays a highly relevant role in the inhibition of apoptosis and chemoresistance in melanoma. In summary, given the aberrant expression of ROR1 and BCL2L10 in melanoma and their functions associated with tumor progression and survival, both proteins represent two new and attractive therapeutic targets in melanoma.

Keywords: melanoma, apoptosis, ROR1, BCL2L10, STAT3, EMT, chemoresistance, survival

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi director de tesis, Pablo, quién me brindó la posibilidad de trabajar en su laboratorio. Al Dr. Vitullo por aceptarnos en el CEBBAD, a Alejandra Fisz y Ruth por estar siempre atentas a nuestras necesidades, y a todos los miembros del instituto que permiten realizar más fácilmente las tareas del día a día. A mis compañeros de laboratorio Vicky, Gastón, Belén, Paula y Jesús por haber hecho más ameno el camino.

A la Dra. Marisa Gomez por la inmensa ayuda para realizar las citometrías de flujo. A la Dra. Edith Illescas por las largas horas de charla y ayuda con el análisis de las inmunohistoquímicas. A Sara y a Diego por siempre estar dispuestos a ayudarnos con las preparaciones y montajes de las muestras para inmunohistoquímica. Al Hospital Austral y al Hospital Curie por habernos facilitado las muestras de pacientes.

A mi mamá Mary por siempre haberme apoyado en todas mis metas académicas. A mi novio Jona por ser un compañero incondicional. A mis amigas Agus P y Agus C por los momentos compartidos y los oídos prestados. Por último, pero no menos importante, a mis gatas Mumi, Ariel y Cleo, por haber sido mis compañeras de largas horas de estudio.

Índice

Resumen 1

Abreviaturas 8

1. Introducción 13

1.1 Melanoma 13

1.1.1 La piel y los melanocitos 13

1.1.2 Incidencia y características del melanoma 14

1.1.3 Modelo de progresión del melanoma 15

1.1.4 Vías de señalización desreguladas en melanoma 18

1.1.5 Clasificación y Pronóstico de melanoma 21

1.1.6 Tratamiento del melanoma metastásico 22

1.1.6.1 Terapia dirigida 23

1.1.6.2 Inmunoterapia 24

1.2 Vía de Señalización Wnt 25

1.2.1 Componentes principales de la vía Wnt 26

1.2.1.1 Ligandos Wnt 26

1.2.1.1.1 WNT5A 27

1.2.1.2 Receptores y co-receptores 28

1.2.1.2.1 FZD 28

1.2.1.2.2 LRP5/6 28

1.2.1.2.3 RTKs 29

1.2.1.3 DVL 32

1.2.2 Vía canónica 32

1.2.3 Vias no-canónica clásicas 33

1.2.3.1 Vía PCP 33

1.2.3.2 Vía de Ca^{2+} 34

1.2.4 Vias no-canónicas alternativas 35

1.3 ROR1 37

1.3.1 Isoformas y localización subcelular de ROR1 37

1.3.2 Expresión de ROR1 en tejido normal y cáncer 37

1.3.3 Vías de señalización reguladas por ROR1 en cáncer 38

1.3.3.1 ROR1 regula a STAT3 y NF-κB en cáncer 41

1.3.4 Rol de ROR1 en cáncer 43

1.3.4.1 Rol de ROR1 en melanoma 45

1.3.5 ROR1 como blanco terapéutico 46

1.4 Apoptosis 49

1.4.1 Vía apoptótica intrínseca 51

1.4.1.1 Proteínas anti-apoptóticas 54

1.5 BCL2L10 55

2. Hipótesis y Objetivos 57

2.1 Hipótesis 57

2.2 Objetivos generales y específicos 57

3. Materiales y métodos 59

3.1 Reactivos y Buffers 59

3.2 Construcciones y Plásmidos 59
3.2.1 Preparación de bacterias competentes 59
3.2.2 Transformación bacteriana 60
3.2.3 Purificación de plásmidos 60

3.3 Cultivos celulares 61
3.3.1 Mantenimiento de células en cultivo 61
3.3.2 Métodos de desprendimiento de células adherentes 61
3.3.3 Generación de líneas celulares estables por transfección 62

3.4 Muestras de pacientes 62

3.5 Análisis de la expresión proteica 62
3.5.1 Extracción de proteínas 63
3.5.2 Técnica de Bradford 63
3.5.3 Western Blot 63
3.5.4 Inmunohistoquímica 64

3.6 Ensayos celulares y funcionales 65
3.6.1 Ensayo de Luciferasa 65
3.6.2 Tratamiento con inhibidores y drogas quimioterapéuticas 66
3.6.3 Ensayo de Proliferación Celular 66
3.6.4 Ensayo de citotoxicidad con Cristal Violeta 67
3.6.5 Cuantificación de muerte celular apoptótica por Citometría de flujo 67

3.7 Análisis Bioinformático 68

3.8 Estadística 69

4. Resultados 70

4.1 Rol de ROR1 en melanoma 70
4.1.1 ROR1 se expresa en melanoma 70
4.1.1.1 Puesta a punto de la técnica de IHQ para detectar ROR1 70
4.1.1.2 ROR1 se expresa en pacientes con melanoma 72

4.1.2 Vías de señalización reguladas por ROR1 en melanoma 76
4.1.2.1 Generación de líneas celulares con sobreexpresión y silenciamiento de ROR1 76
4.1.2.2 ROR1 regula positivamente a AKT, ERK, p65 y pSTAT3 77
4.1.3 Análisis bioinformático funcional y comparativo de ROR1 con otros RTKs de WNT5A en melanoma 82
4.1.3.1 Identificación de los DEGs asociados a ROR1, ROR2, RYK y PTK7 en muestras de pacientes con melanoma 82
4.1.3.2 Análisis comparativo de DEGs y Procesos Biológicos asociados a ROR1 con respecto a ROR2, RYK y PTK7 en muestras de pacientes con melanoma 85
4.1.3.3 Análisis de ROR1 vs ROR2 en TEM 91
4.1.3.4 Análisis de ROR1 vs ROR2 en Apoptosis 94
4.1.4 ROR1 protege contra la muerte celular apoptótica en melanoma 95
4.1.4.1 ROR1 disminuye la apoptosis en melanoma 95
4.1.4.2 ROR1 regula positivamente a proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 108
4.1.4.3 ROR1 regula a BCL2, BCL-XL y BCL2L10 vía STAT3 110

4.2 Rol de BCL2L10 en melanoma 115
4.2.1 BCL2L10 se expresa en melanoma 115
4.2.1.1 BCL2L10 se expresa en líneas celulares de melanoma 115
4.2.1.2 Puesta a punto de la técnica de IHQ para detectar BCL2L10 115
4.2.1.3 BCL2L10 se expresa en pacientes con melanoma 118
4.2.2 STAT3 regula la expresión de BCL2L10 activándolo transcripcionalmente 121
4.2.2.1 pSTAT3 colocaliza con BCL2L10 121
4.2.2.2 STAT3 activa transcripcionalmente a BCL2L10 por unión a su promotor 123
4.2.3 BCL2L10 contribuye a la supervivencia celular en melanoma 126
4.2.3.1 Generación de líneas celulares con sobreexpresión y silenciamiento de BCL2L10 126
4.2.3.2 BCL2L10 aumenta la supervivencia de células de melanoma tratadas con agentes que dañan el DNA 127
4.2.3.3 BCL2L10 promueve la resistencia a ABT-737 132
4.2.3.4 BCL2L10 aumenta la supervivencia de células de melanoma tratadas con PLX-4032 y Cisplatino o ABT-737 135

5. Conclusiones 136

6. Discusión 138

7. Bibliografía 150

ANEXOS 179

A. Recetas de soluciones y buffers 179

B. Plásmidos 180
B.1 Vector Vir-SP 180
B.2 Vector pSUPER.retro.puro 181
B.3 Vector pCDNA3-myc 182
B.4 Vector pLKO.1 183

C. Anticuerpos 184
C.1 Anticuerpos primarios 184
C.2 Anticuerpos secundarios 184

D. Resultados suplementarios del Análisis Bioinformático 185
D.1 Gráficos de Venn de los DEGs UP y DN de TCGA-PRI vs DEGs TCGA-MET para ROR1, ROR2, RYK y PTK7 185
D.2 Enriquecimientos en las categorías "Biological Process", "Hallmark" y "Oncogenic MSigDb" para ROR1, ROR2, RYK y PTK7 de datasets de pacientes con melanoma primario 186
D.3 Enriquecimientos en las categorías "Biological Process", "Hallmark" y "Oncogenic MSigDb" para ROR1, ROR2, RYK y PTK7 de datasets de pacientes con melanoma metastásico 211
D.4 Enriquecimiento de los DEGs UP y DN de ROR2, RYK y PTK7 para la categoría "Biological Process" 236
D. 5 Enriquecimiento de los DEGs UP y DN de ROR2, RYK y PTK7 para la categoría "Oncogenic MSigDb" 240

Abreviaturas

aa: Aminoácidos
AC: *Adenylyl Cyclase*
ACs: Anticuerpos Conjugados
ADN: Ácido Desoxirribonucleico
ADNc: ADN copia
AJCC: *American Joint Committee on Cancer*
AKT: PKB (*Protein Kinase B*)
amb.: Ambiente
Ap.: Apoptosis
APAF1: *Apoptotic Protease-Activating Factor 1*
APC: *Adenomatous Polyposis Coli*
aPKC: *atypical Protein Kinase C*
ARHGEF1: *Rho/Rac Guanine nucleotide Exchange Factor 1*
ARHGEF2: *Rho/Rac Guanine nucleotide Exchange Factor 2*
ARHGEF6: *Rho/Rac Guanine nucleotide Exchange Factor 6*
ARN: Ácido Ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ATF2: *Activating Transcription Factor 2*
ATP: *Adenosine Tri-Phosphate*
AXL: *AXL Receptor Tyrosine Kinase*
β-TrCP: *Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase*
BAD: *BCL2 Associated agonist of cell Death*
BAK: *BCL2 Antagonist/Killer*
BAX: *BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator*
Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*
BCL2: *BCL2 apoptosis regulator*
BCL2L10: *BCL2 Like 10*
BCL-XL: BCL2L1 (*BCL2 Like 1*)
BCL-W: BCL2L2 (*BCL2 Like 2*)
BFL1: BCL2A1 (*BCL2 Related Protein A1*)
BH: *Bcl-2 homology domain*
biAbs: Anticuerpos biespecíficos
BID: *BH3 Interacting Domain Death Agonist*
BIK: *BCL2 Interacting Killer*
Bim: BCL2L11 (*BCL2 Like 11*)
BIM1: *BMI1 proto-oncogene*
BiTE: *Biespecific T cell-Engager*
BMF: *Bcl2 Modifying Factor*
BMP2: *Bone Morphogenetic Protein 2*
BOK: *BCL2 Family Apoptosis Regulator BOK*
BP: *Biological Process*
BRAF: *v-Raf murine sarcoma viral oncogone*
BRAFi: *BRAF inhibitors*
BTK: *Bruton Tyrosine Kinase*
c-Jun: *Jun oncogene*
C-terminal: Carboxilo-terminal
CALD1: *Caldesmon 1*
CaMKII: *Ca^{2+}/CaM-dependent protein kinase II*
cAMP: *cyclic Adenosine MonoPhosphate*
Camp: Camptotecina
CAR-T: *Chimeric Antigen Receptor T-cell*

CASP3: *Caspase-3*
CASP8: *Caspase-8*
Caspasa: Cisteína-aspártico proteasa
CAV1: *Caveolin 1*
Cavin-1: *Caveolae Associated Protein 1*
Cavin-3: *Caveolae Associated Protein 3*
CCNB1: *Cyclin B1*
CCNE1: *Cyclin E1*
CCND1: *Cyclin D1*
CDC42: *Cell Division Cycle 42 protein*
CDK4: *Cyclin Dependent Kinase*
CDKN2A: *Cyclin-Dependant-Kinase Inhibitor 2A*
Cis: Cisplatino
CK1: *Casein Kinase 1*
CCL19: *C-C Motif Chemokine Ligand 19*
CCL2: *C-C Motif Chemokine Ligand 2*
CRD: *Cystein Rich Domain*
CREB: *cAMP Response Element-Binding Protein*
CREBBP: *CREB Binding Protein*
CTLA-4: *Cytotoxic T-Lymphocite-associated Protein 4*
CXCL12: *C-X-C Motif Chemokine Ligand 12*
DAC: Dacarabazina
DAG: DiAcylGlycerol
DEGs: Genes diferencialmente expresados
DEP: *Dishevelled-EGL-10-Pleackstrin domain*
DIABLO: *Diablo IAP-binding mitochondrial protein*
DIX: *Dishevelled and Axin domain*
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO: Dimetilsulfóxido
DOCK2: *Dedicator Of Cytokinesis 2*
Dox: Doxorrubicina
DVL: *Dishevelled*
ERBB: *Erb-B Receptor Tyrosine Kinase*
EGF: *Epidermal Growth Factor*
EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*
EIF4EBP1: *Eukaryotic translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1*
EMT: *Epithelial-Mesenchymal Transition*
EPHA2: *EPHrin type A Receptor*
ERBB3: *Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3*
ERBB4: *Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4*
ERK: *Extracellular signal-Regulated Kinase*
EZR: *Ezrin*
FC: *FoldChange*
FGF1: *Fibroblast Growth Factor 1*
FGFR: *Fibroblast Growth Factor Receptor*
Fig.: Figura
FOXO1: *Forkhead box O1*
FT: Factor de Transcripción
FZD: *Frizzled*
GEF: *Guanine nucleotide Exchange Factor*
GI: Grado de Inhibición
GSK3: *Glycogen Synthase Kinase 3*
GSK3β: *Glycogen Synthase Kinase 3β*

GTP: *Guanosine-5'-TriPhosphate*
Hif-1α: *Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha*
HRK: *Harakiri, BCL2 Interacting Protein*
IAPs: *Inhibitors of Apoptosis*
IGF1R: *Insulin like Growth Factor Receptor*
IHQ: Inmunohistoquímica
IKK: *IκB Kinase*
IL2: *Interlekin 2*
IL6: *Interlekin 6*
IL8: *Interlekin 8*
IL10: *Interlekin 10*
IL11: *Interlekin 11*
IFN: *Interferon*
INT1: *Integration 1*
IP: Ioduro de Propidio
IP3: *Inositol-1,4,5-trisPhophate*
IκB: Inhibitor of kappa B
JNK: *c-Jun N-terminal Kinase*
JAK: *Janus Kinase*
kDa: Kilo Daltons
KIT: *Mast/stem cell growth factor receptor Kit*
KRD: *Kringle Domain*
LATS: Large Tumor Suppressor kinase
Lgl: *Lethal giant larvae*
LLC: Leucemia Linfocítica Crónica
LRP: *Low-density lipoprotein Receptor-related Protein*
LT: Lifoncito T
mAbs: anticuerpos monoclonales humanizados
MAP1B: *Microtubule-Associated Protein 1B*
MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MCL1: *MCL1 Apoptosis Regulator, BCL2 Family Member*
MCP-1: *Monocyte Chemoattractant Protein 1*
MEK: *MAPK + ERK kinase*
MEKi: *MEK inhibitors*
MET: Melanoma Metastásico
Mitf: *Microphthalmia-associated transcription factor*
MME: Membrana Mitocondrial Externa
MMP2: *Matrix Metallopeptidase 2*
MPIs: Moléculas Pequeñas Inhibitorias
MTOR: Mammalian Target Of Rapamycin
MTORC1: *Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1*
MyD88: *Myeloid Differentiation primary response protein MyD88*
NANOG: *Nanog Homeobox*
N-terminal: Amino-terminal
NCCD: *Committe on Cell Death*
NFAT: *Nuclear Factor Associated with T cells*
NF-κB: *Nuclear Factor enhancer of immunoglobulin Kappa light chain of activated B cells*
NF1: *Neurofibromin 1*
NGF: *Nerve Growth Factor*
NOXA: PMAIP1 (*Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1*)
NTRKR1: *Neurotrophic Tyrosine Kinase, Receptor-related 1*
Ig: Inmunuglobulina
LIF: *Leukemia Inhibitory Factor*

LLC: Leucemia linfocítica crónica
NP: *Alsoneuropoietin*
NRAS: *NRAS Proto-Oncogene, GTPase*
NRG1: *Neuregulin-1*
OE: Objetivo Específico
OG: Objetivo General
$p16^{INK4A}$: *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*
PAR: *Partitioning-defective*
PARP1: *Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1*
PBS: *Phosphate-Buffered Saline*
PCP: *Planar Cell Polarity*
PD-1: *Programmed cell Death-1 receptor*
PDGF: *Platelet-derivated Growth Factor*
PDGFRA: *Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha*
PDK1: *3-Phosphoinositide-Dependant Kinase 1*
PDZ: *PSD95, Dlg1 and Zo-1 domain*
PFA: Paraformaldehído
PI3K: *PhopholnosIte 3-Kinase*
PIP2: *PhosphatidylInositol-3,4,-biPhosphate*
PIP3: *PhosphatidylInositol-3,4,5-triPhosphate*
PKA: *Protein Kinase A*
PKC: *Protein Kinase C*
PLC: *PhosphoLipase C*
PLX: PLX-4032 (Vemurafenib)
PRD: *Proline-Rich Domain*
PRI: Melanoma Primario
PUMA: BBC3 (*BCL2 Binding Component 3*)
PTEN: *Phosphatase and TENsin homolog*
PTK7: *Protein Tyrosine Kinase 7*
RAC: *Rac Family Small GTPase*
RAMC: Registro Argentino de Melanoma Cutáneo
RDX: *Radixin*
RGP: *Radial Growth Phase*
RHOA: *Ras Homolog Family Member A*
ROCK: *Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase*
ROR1: *Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 1*
ROR2: *Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2*
RPS6KA1: *Ribosomal Protein S6 Kinase Alpha-1* (RSK1)
RPS6KB2: *Ribosomal Protein S6 Kinase B2*
RPTOR: *Regulatory associated Protein of MTOR complex 1*
RTK: *Receptor Tirosina Quinasa*
RYK: *Receptor-like Tyrosine Kinase*
SCR: *Scramble*
SFB: Suero Fetal Bovino
SH3: Dominio de homología SRC 3
shARN; *Short Hairpin RiboNucleic Acid* (shRNA)
SMAC: *Second Mitochondrial Activator of Caspases*
SNAI1/2: *Snail family transcriptional repressor 1 and 2*
SOS: *SOS Ras/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor*
SOX2: *SRY-Box Transcription Factor 2*
SRC: *SRC proto-oncogene*
SRE: Elementos de respuesta a STAT3
STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*

STAT3: *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*
STAT5: *Signal Transducer and Activator of Transcription 5*
STS: Estaurosporina
TCF/LEF: *T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer binding Factor*
TCL1A: *TCL1 family AKT coactivator A*
TEM: Transición Epitelio-Mesenquimal
Temp.: Temperatura
TK: *Tyrosine Kinase*
TKD: *Tyrosine Kinase-like Domain*
TLR: *Toll-Like Receptor*
TNM: Tumor, Nódulos y Metástasis
TP53: *Tumour Protein P53*
TSC2: *Tuberous Sclerosis Complex 2*
TWIST: *Twist family BHLH transcription factor*
UV: Ultravioleta
VEGF: *Vascular and Endothelial Growth Factor*
VGP: *Vertical Growth Phase*
VIM: *Vimentin*
WB: *Western Blot*
WIF: *WNT-Inhibitory Factor*
WNT1: *Wnt Family Member 1*
WNT11: *Wnt Family Member 11*
WNT16: *Wnt Family Member 16*
WNT3A: *Wnt Family Member 3A*
WNT4: *Wnt Family Member 4*
WNT5A: *Wnt Family Member 5A*
WNT5B: *Wnt Family Member 5B*
WNT7A: *Wnt Family Member 7A*
WNT8: *Wnt Family Member 8*
wt: *wild type*
YAP: *Yes Associated Transcriptional Regulator*
XIAP: *X-linked Inhibitor of Apoptosis*
ZEB1: *Zinc finger E-box Binding homeobox 1*

Introducción

1. Introducción

1.1 Melanoma

El melanoma es un tipo de cáncer de piel generado a partir de la transformación maligna de los melanocitos; involucra principalmente a la piel (melanoma cutáneo), ya que constituye el 90% de los casos de cáncer de piel, pero puede también originarse en el ojo (úvea, conjuntiva y cuerpo ciliar), meninges y en distintas superficies mucosas. La exposición solar es el mayor factor de riesgo para el melanoma cutáneo debido al efecto mutagénico de la radiación ultravioleta (UV) sobre el ADN.

1.1.1 La piel y los melanocitos

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y actúa como barrera protectora que aísla al organismo del medio que lo rodea. Está formada por dos capas principales: la epidermis y la dermis (**Fig. 1**). La epidermis es la capa más externa de la piel, corresponde a un epitelio escamoso estratificado en continua renovación, y está compuesta principalmente por queratinocitos y, en menor proporción por melanocitos. La dermis se encuentra ubicada por debajo de la epidermis y está formada por abundantes fibras de colágeno que le dan a la piel su consistencia y elasticidad característica. Es 20 - 30 veces más gruesa que la epidermis. En ella se encuentran otros componentes de la piel como pelos, uñas y glándulas sebáceas y sudoríparas (1).

Los melanocitos otorgan pigmentación a la piel mediante la síntesis de un pigmento proteico denominado melanina, la cual es almacenada en melanosomas. La producción de melanina es regulada por factores secretados por los queratinocitos en respuesta a la radiación UV (2). La melanina es un eficiente fotoprotector, ya que absorbe más del 99.9% de radiación UV y disipa la energía en forma de calor. A su vez, los melanosomas son transportados desde los melanocitos a los queratinocitos adyacentes, donde forman una estructura protectora sobre el núcleo, protegiéndolo de los efectos nocivos de la luz UV. Por lo tanto, en respuesta a la exposición a luz UV aumenta la producción de melanina, que protegerá tanto a los melanocitos como a los queratinocitos de dicha radiación (3).

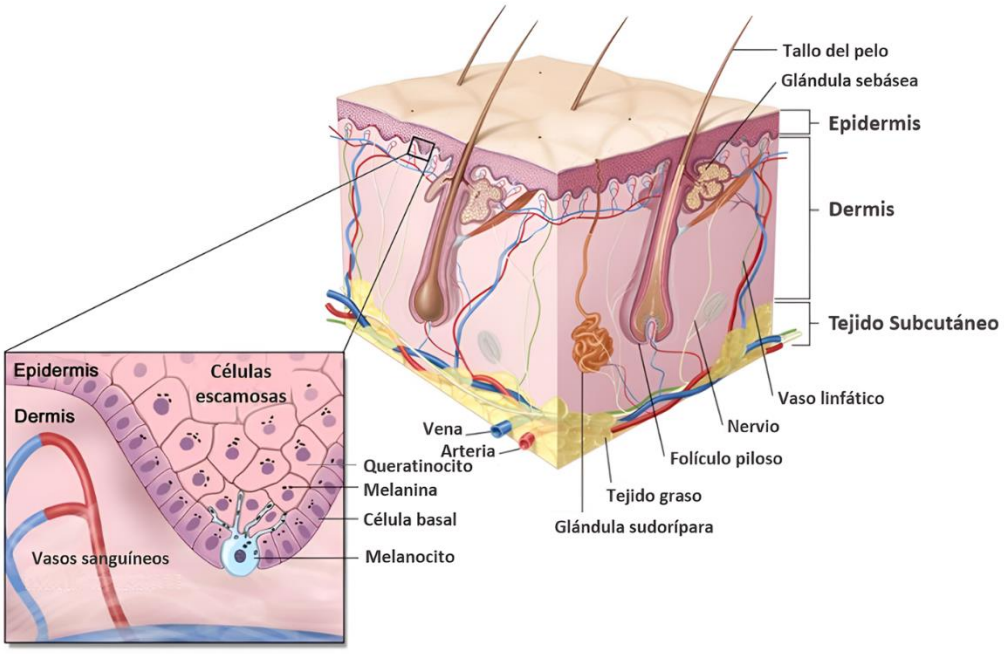


Fig. 1. Representación de la piel y sus capas. *Modificado de www.cancer.gov.*

Los melanocitos se encuentran distribuidos uniformemente en la capa de células basales en la parte más profunda de la epidermis (**Fig. 1**) y su proliferación y diferenciación es controlada estrictamente por los queratinocitos a través de la secreción de distintos factores solubles.

1.1.2 Incidencia y características del melanoma

El melanoma representa un importante problema sanitario, se ha visto que su **incidencia** ha ido en franco aumento a nivel mundial (mayor al 3% anual) y a mayor tasa que cualquier otro cáncer. Este tipo de cáncer se caracteriza por ser un tumor sumamente agresivo debido a su alta capacidad metastásica y su gran resistencia a las terapias convencionales, lo que genera una elevada tasa de mortalidad cuando no es diagnosticado en estadios tempranos (4). La supervivencia varía dependiendo del estadio, llegando a 30% de sobrevida a 5 años en melanomas en los últimos estadios (www.cancer.org).

Dado que los datos oficiales en Argentina son escasos y deficientes, se desconoce con exactitud cuál es la incidencia de melanoma en nuestro país. Por este motivo, en el año 2003 La Sociedad Argentina de Dermatología y la Fundación del Cáncer de Piel acordaron la creación del Registro Argentino de Melanoma Cutáneo (RAMC) para tener información epidemiológica nacional. En un estudio realizado por el RAMC en el año 2010, donde evaluaron 3832 casos (abarcando desde enero del 2003 hasta abril del 2009), se determinó que la tasa de incidencia de nuevos casos diagnosticados por año en Argentina es de 3 pacientes cada millón de habitantes. Además, reportó que entre los casos detectados, el

49.4% correspondía a mujeres y el 50.6% a varones, con una edad promedio de aparición del tumor de 55.1 y 58.5 años, respectivamente (5).

Así mismo, dado el origen caucásico de gran parte de nuestra población y a su localización en una latitud geográfica similar, resulta útil evaluar datos estadísticos de países desarrollados como Australia o Estados Unidos, que poseen un buen registro de los casos. En EE. UU. la tasa de incidencia es de 20 a 30 casos nuevos de melanoma cada 100000 habitantes y en Australia, donde se observa una incidencia muy alta, de 50 a 60 cada 100000 habitantes. En EE. UU., el melanoma es el quinto tipo tumoral más frecuente, detrás de cáncer de próstata, mama, pulmón y colon (6), y, según las estadísticas de la *Skin Cancer Foundation*, uno de cada cinco estadounidenses desarrollará cáncer de piel a lo largo de su vida.

El melanoma maligno es la principal causa de muerte por cáncer de piel. Un gran número de estudios indican que el riesgo de melanoma maligno se correlaciona con las características genéticas, personales y a la exposición a los rayos UV de una persona. Según la OMS, los principales factores de riesgo son, a grandes rasgos:

- Un alto número de nevos atípicos (lunares), factor de riesgo más importante de melanoma maligno en poblaciones de piel clara.
- Tez pálida, ojos azules y cabello pelirrojo o rubio. Estudios experimentales han demostrado una dosis mínima eritematosa más baja y un eritema más prolongada en pacientes con melanoma que en los controles.
- Exposición alta e intermitente a los rayos UV solares.
- Habitar latitudes bajas. La incidencia de melanoma maligno en poblaciones blancas generalmente aumenta al disminuir la latitud, la incidencia más alta registrada se produce en Australia, donde las tasas anuales son 10 y más de 20 veces las tasas en Europa para mujeres y hombres, respectivamente.
- Antecedentes de quemaduras solares, especialmente quemaduras solares a una edad temprana.
- Antecedentes de cánceres de piel no melanoma y de queratosis solar, los cuales son indicadores de exposición acumulativa a los rayos UV.

1.1.3 Modelo de progresión del melanoma

La trasformación maligna del melanocito comprende la acumulación de mutaciones y alteraciones en diferentes genes, producto del daño al ADN generado por la luz UV. La mutación de ciertos genes les permitirá evadir el control que ejercen los queratinocitos, mencionado anteriormente, y poder proliferar y extenderse formando los lunares (nevos). Estos lunares generalmente son benignos, pero eventualmente pueden progresar hacia la formación de un melanoma. Debido a que la mayoría de estas células aún producen melanina, los melanomas a menudo son de color marrón o negro (7) (**Fig. 2**).

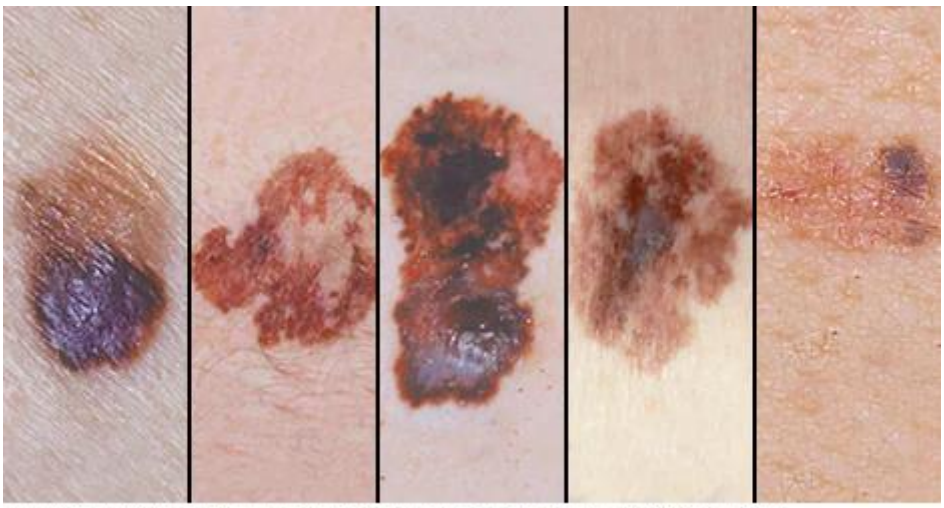


Fig. 2. Imágenes representativas de diferentes tipos de melanomas cutáneos.

Si bien no existe al momento un mecanismo canónico establecido que explique cómo se origina el tumor, muchos genes y vías metabólicas han sido asociados a la progresión del melanoma. Durante la primera década del siglo, se pudo entender mejor las bases genéticas del melanoma, ya que se pudo identificar mutaciones en genes comunes en un número significativo de pacientes, que afectan la señalización celular del melanocito contribuyendo a la transformación y desarrollo tumoral. Dichas alteraciones genéticas se han ido correlacionando a cambios histológicos que acompañan la progresión gradual de los melanocitos normales a melanoma, planteados en el modelo de progresión de Clark (8,9). En otras palabras, el modelo de Clark brinda un marco teórico didáctico para estudiar la enfermedad y nos permite relacionar cambios histológicos, descriptos en el modelo, con alteraciones genéticas particulares. Estas alteraciones pueden ser cambios en la secuencia de ADN (mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, translocaciones o amplificaciones); o epigenéticos (cambios en la metilación del ADN o en la acetilación de histonas, que modifican la transcripción de los genes) (**Fig. 3**). Cabe mencionar que, no todos los melanomas muestran los mismos eventos, pero algunos son más comunes que otros (7,10).

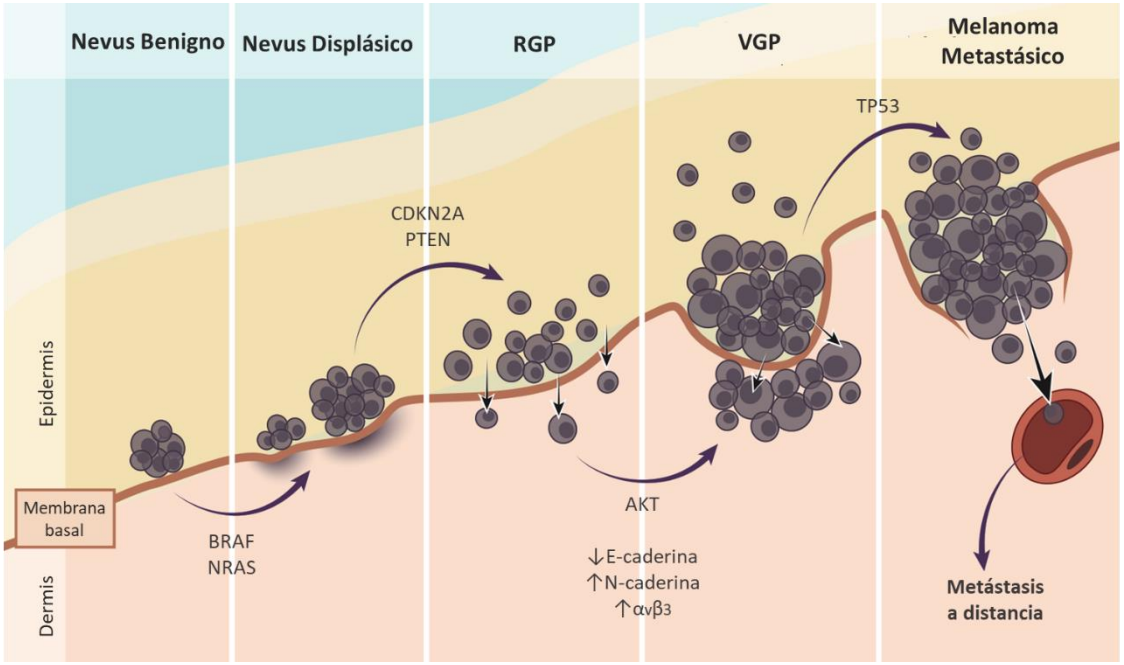


Fig. 3. Modelo de Progresión de Melanoma basado en el Modelo de Clark. *Se ilustran las etapas de iniciación y progresión tumoral desde un melanocito a un melanoma maligno y metastásico, indicando en cada etapa las alteraciones genéticas y epigenéticas más frecuentes (imagen adaptada de http://www.pathophys.org/melanoma).*

Este modelo inicia con una población de melanocitos normales que proliferan controladamente dando origen a una lesión hiperplásica denominada **nevo** (o lunar) **benigno**. Pasado cierto punto de crecimiento los melanocitos ingresan en un período de senescencia, deteniendo así el progreso de la lesión. El nevo puede permanecer en este estadio por varios años o décadas, pero eventualmente puede superar la barrera de senescencia y reanudar la proliferación formando un **nevo displásico** o atípico. Este evento suele evidenciarse por la aparición de máculas planas de bordes irregulares y pigmentación variable. Posteriormente, el lunar puede progresar hacia una etapa de expansión superficial (horizontal) o **Fase de Crecimiento Radial** (RGP -*Radial Growth Phase*-) que está confinada a la epidermis y tiene un bajo potencial invasivo (melanoma *in situ*). Esta etapa, histológicamente muestra atipia continua. La proteína E-caderina ayuda a confinar a las células intraepidérmicamente, pero algunas células pueden invadir la dermis. Posteriormente, numerosos eventos bioquímicos, incluidos la pérdida de E-caderina y el aumento de expresión de N-caderina, permiten que las células malignas invadan la membrana basal y proliferen verticalmente en la dermis, formando un nódulo expansivo con potencial metastásico. Esta nueva etapa se conoce como **Fase de Crecimiento Vertical** (VGP -*Vertical Growth Phase*-). Si bien esta fase suele seguir a la RGP, en algunos tipos de melanoma, como es el caso de melanomas más agresivos que a menudo presentan úlceras y sangrado, la VGP puede ocurrir desde el inicio (7). Por último puede desarrollarse **Metástasis**, en donde las células malignas se disocian de la lesión original, y adquieren

capacidad invasiva, que les permite migrar al estroma circundante e invadir vasos arteriales y linfáticos pudiendo diseminarse a otras áreas del cuerpo (11).

Generalmente, la formación del nevo displásico se inicia con mutaciones en los oncogenes BRAF o NRAS que, junto con mutaciones adicionales en genes supresores de tumores como CDKN2A (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*) y PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), y otros asociados a proliferación y migración celular, favorecen la progresión del nevo hacia un fenotipo más invasivo (12–14).

1.1.4 Vías de señalización desreguladas en melanoma

Por lo descripto en la sección anterior, cuando se analiza a nivel molecular un melanoma avanzado es muy frecuente observar la activación constitutiva y simultánea de distintas vías de transducción de señales oncogénicas.

Entre las vías que se encuentran activas en melanoma, la más notoria es la **vía de MAPK/ERK** (*Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase*) debido a mutaciones en las serina/treonina quinasas BRAF o NRas que causan su activación constitutiva, estas mutaciones afectan del 50 al 70% de los pacientes (15). En el 90% de los casos, la mutación es en BRAF y consiste en la sustitución de Valina por Ácido Glutámico en el residuo 600 (V600E), lugar donde se encuentra su dominio quinasa. La mutación genera un cambio conformacional que imita la fosforilación S598/T601 y genera una alta actividad catalítica, promoviendo así una activación desregulada y constante de la vía que afecta el crecimiento celular (16,17). Otras mutaciones menos frecuentes de BRAF en melanoma son la sustitución de Valina por Lisina en el codón 600 o de Glicina por Arginina en el codón 469 (18). La quinasa ERK una vez fosforilada, activará alguno de sus más de 50 sustratos citoplasmáticos y nucleares, incluyendo factores de transcripción (FTs) como c-Myc, c-Fos, Mitf, ETS y Hif-1α, estos FTs controlan la expresión de genes que regulan numerosos procesos celulares (19,20) (**Fig. 4**).

Cabe mencionar que, si bien $BRAF^{V600E}$ es la mutación más frecuentemente observada, es una característica típica de la formación benigna del nevus, es decir un evento temprano en la evolución de melanoma. Una progresión hacia lesiones intermedias y melanomas *in situ* requiere mutaciones adicionales. El 50% de los melanomas posee deleciones en el locus del gen CDKN2A que codifica para una proteína inhibidora del ciclo celular, $p16^{INK4A}$ (21); y en otros casos, $p16^{INK4A}$ se encuentra silenciada (22). Además, los genes de CDK4 y Ciclina D1 también presentan frecuentes mutaciones y amplificaciones en melanoma (22,23) (**Fig. 4**).

Por otra parte, en melanomas más avanzados una vía que se encuentra frecuentemente desregulada es la **vía de PI3K/AKT**, hallándose niveles elevados de AKT (*AKT serine/threonine kinase*) activo en casi el 70% de los casos de melanomas metastásicos, lo cual, a su vez, correlaciona con un aumento en la progresión del tumor (24). La unión de diversos factores a Receptores Tirosina Kinasa (RTK), provoca la activación de la quinasa PI3K (*Phophoinosite*

3-Kinase), que fosforilará y convertirá a PIP2 (*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate*) en PIP3 (*Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphate*). PIP3 recluta a la membrana plasmática a PDK1 (*3-Phosphoinositide-Dependent Kinase 1*) y AKT, permitiendo así que PDK1 fosforile a AKT en su dominio quinasa (25). Una vez activa AKT podrá fosforilar a numerosos sustratos, los cuales regulan procesos tales como supervivencia, migración, progresión del ciclo celular y metabolismo (26,27) (**Fig. 4**). La activación de PI3K en melanoma puede ocurrir por mutaciones que activan NRAS, mutaciones que inactivan NF1, o por la pérdida funcional de PTEN. La pérdida funcional de PTEN, una fosfatasa que convierte PIP3 en PIP2 (antagonizando la función de PI3K), por deleciones, mutaciones o alteraciones epigenéticas potencian la actividad de PI3K en el 30% de los melanomas (28) (**Fig. 4**). En muchos de estos casos, las mutaciones en PTEN se encuentran asociadas con la mutación V600E de BRAF, pero no con las de NRAS. Dado que las mutaciones NRAS activan tanto la vía de MAPK como la de PI3K, se considera que la activación de ambas vías es necesaria para la progresión de melanoma (23,29). Mutaciones adicionales que pueden desencadenar la activación de AKT son las activadoras de PI3K (observadas en un bajo porcentaje de melanomas metastásicos) (30).

Sumadas a éstas, otras alteraciones que pueden desencadenar la activación de esta vía como también la de ERK, son las halladas en los genes que codifican para diversos RTK, tales como EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), ERBB3 y 4 (*Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3 and 4*), EPHA2 (*EPHrin type A Receptor*), FGF1 (*Fibroblast Growth Factor 1*), IGF1R (*Insulin like Growth Factor Receptor*), c-KIT, PDGFRA (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha*), entre otros (31). Cualquiera de estas mutaciones conduce a la sobre-expresión y/o aumento de la fosforilación de los RTKs y, en consecuencia, a la activación de las vías previamente mencionadas (32).

Cabe señalar, que además de mutaciones en PTEN asociadas a la progresión del melanoma hacia un fenotipo metastásico, se encuentran también mutaciones en TP53 (*Tumour Protein P53*) asociadas al mismo (33) (**Fig.4**).

Es importante mencionar que además de las vías de MEK/ERK y PI3K/AKT, muchas otras vías de señalización se encuentran activas en melanoma y contribuyen al desarrollo de esta enfermedad, entre ellas se encuentran Wnt , PKC, JNK, JAK/STAT3, NF-κB y Eph/ephrin (15,34–36). A continuación, se abordará la vía de STAT3 y, más adelante se tratará con mayor detalle la vía **Wnt**, en una sección exclusiva.

STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) es un FT que constituye un punto de convergencia de distintas vías de señalización tumorigénicas. STAT3 también puede regular la expresión génica mediante mecanismos epigenéticos, como metilación del ADN y modulación de la cromatina. La familia de FTs de STAT, está compuesta por siete miembros distintos (37). STAT3 muestra actividad baja o nula en células normales no estimuladas, pero se encuentra activado constitutivamente en muchos tipos de cáncer, provocando la inducción de la supervivencia celular, ejerciendo su regulación sobre procesos de proliferación, angiogénesis, invasión, inmunosupresión y anti-apoptóticos (38–43). Dado

el efecto de STAT3 en el aumento en la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis se lo puede considerar un oncogén. STAT3 se encuentra fosforilado y constitutivamente activo entre 50 y 90% de frecuencia en diversos cánceres humanos, incluido el melanoma (44–49). En melanoma, los niveles de pSTAT3 son más altos en metástasis (particularmente en cerebro y pulmón) que en los melanomas cutáneos primarios (47,49). Además pSTAT3 es un factor de pronóstico negativo para la supervivencia en pacientes con melanoma que no desarrollaron metástasis en el sistema nervioso central (47,49). Por otra parte, se ha demostrado que la activación de STAT3 es un importante mecanismo de resistencia a las terapias dirigidas contra BRAF mutante (50–53).

STAT3 es regulado por fosforilación, la cual puede ser inducida por la vía de señalización **JAK/STAT** (*Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription*). Dicha vía es sumamente relevante en mamíferos para la actividad de un amplio número de ligandos extracelulares conformados por factores de crecimiento y citoquinas (54), tales como interferones (IFNs), interleuquinas como IL6 (*Interleukin 6*), NP (*Alsoneuropoietin*), LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), BMP2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*), EGF y PDGF (55,56). La unión del ligando a su receptor correspondiente provoca la activación de las JAKs asociadas que fosforilarán residuos Tyr en el receptor, lo que provoca la creación de sitios de unión para STAT y su activación. La activación de STAT conduce a la formación de homo- o hetero-dímeros, que translocarán al núcleo e inducirán o reprimirán la transcripción de distintos genes blanco (57), pertenecientes a vías implicadas en apoptosis y crecimiento celular (54,58–61) (**Fig. 4**).

Además de la vía JAK/STAT, la proteína SRC (SRC proto-oncogene) puede inducir la fosforilación de STAT3 (**Fig. 4**). SRC es una tirosina quinasa no-receptora citoplasmática que actúa como proto-oncogén (62) y que puede ser fosforilada por distintos RTKs. En células de melanoma se ha visto que la inhibición de las quinasas SRC disminuye los niveles de STAT3 fosforilado y promueve la apoptosis (46). Además, en estudios pre-clínicos se ha reportado que la inhibición de SRC suprime el crecimiento tumoral y la metástasis en melanoma (63).

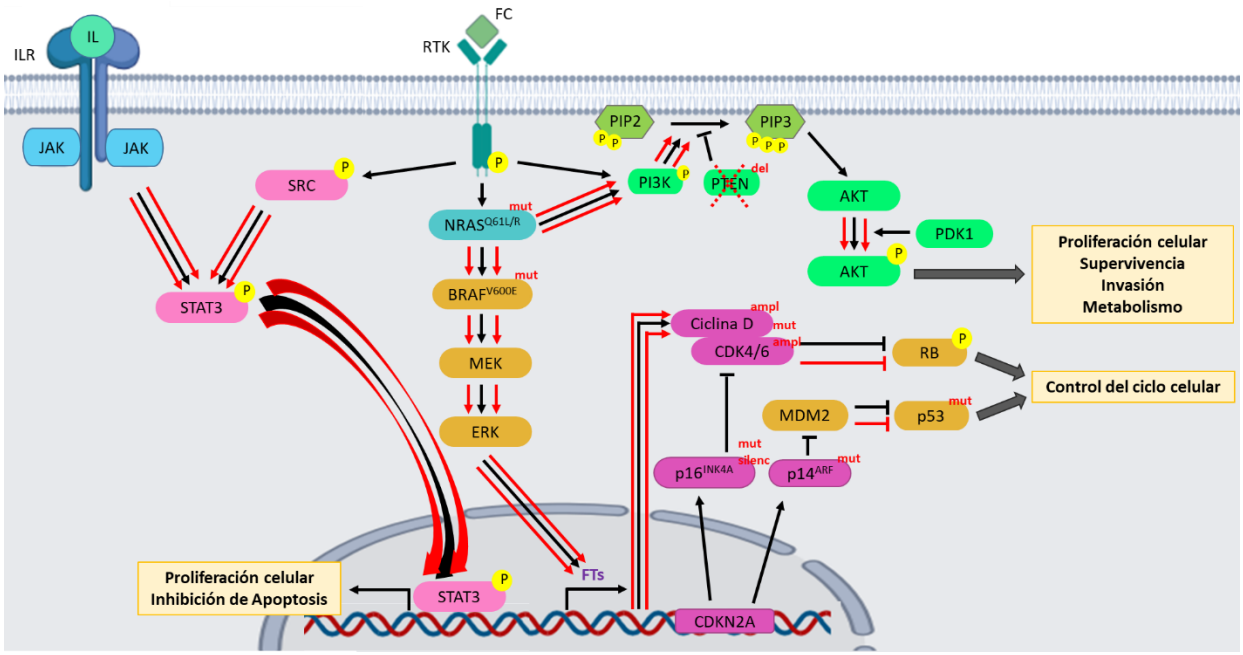


Fig. 4. Vías de señalización en melanoma. *AKT, ERK y STAT3. En negro se representa el curso normal de la vía molecular y en rojo se representa la exarcebación de las vías debido a las alteraciones genéticas observadas en el melanoma (del, ampl, mut y silen). del: deleción, ampl: amplificación, mut: mutación, silen: silenciamiento.*

1.1.5 Clasificación y Pronóstico de melanoma

Según su origen, el melanoma puede ser cutáneo, de mucosas, uveal (u ocular) o leptomeningeo (derivado de los melanocitos presentes en las meninges). Los melanomas cutáneos representan el 90% de los casos y se clasifican como melanoma *in situ* cuando se encuentra confinado dentro de la epidermis, o invasivo cuando los melanocitos atípicos invaden progresivamente la dermis. Se han identificado 4 subtipos de melanoma invasivo que tradicionalmente se distinguen por características clínico-patológicos: Melanoma Superficial Difuso, Melanoma Lentigo Maligno, Melanoma Nodular Maligno y Melanoma Lentiginoso Acral (64–67).

La aplicación clínica de estos subtipos es muy limitada, debido a que, aun tratándose de tumores de grosor similar, presentan distinta evolución y respuesta a los tratamientos (68). Además, cada uno de estos subtipos de melanoma puede ser definido por múltiples características, tales como su aspecto morfológico o lugar de aparición, resultando en una gran variedad de presentaciones posibles (69). Por ello, muchas veces se ha cuestionado la existencia de varios subtipos de melanoma, sugiriendo que las diferencias morfológicas son una consecuencia del sitio de origen del tumor (70).

Dada esta problemática, en el año 2009, el *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* (71) desarrolló el sistema de clasificación de melanomas cutáneos denominado TNM, que incorpora características del Tumor, de Nódulos y de Metástasis. Este sistema reúne distintos rasgos del tumor de manera tal de poder describir el nivel de "agresividad" del

mismo y su estado de diseminación en el cuerpo. Los parámetros que evalúa el sistema TNM son los siguientes: espesor, presencia de ulceración e índice mitótico en el tumor primario; presencia de metástasis en tránsito, satélites y/o microsatélites; grado de invasión de los ganglios linfáticos (regionales o distantes) y la presencia de metástasis. En función de dichos parámetros se definen los estadios 0, I, II, III y IV que representan el estado de progresión del melanoma (**Tabla 1**). A grandes rasgos, en el estadio 0 se encuentran los pacientes con melanoma *in situ* (aquel confinado en la epidermis), en el estadio I o II los pacientes con melanoma localizado según su grosor (espesor medible) y, la presencia o no de ulceración histológica e índice mitótico; en el estadio III los que presentan satelitosis, lesiones metastásicas en tránsito o tienen metástasis en los ganglios regionales y, por último, en el estadio IV los que exhiben metástasis a distancia.

Estadío AJCC	Espesor (mm)	Ulceración y/o Mitosis (Cel/mm²)			Metástasis regional	Metástasis a distancia
0	In situ	-			No detectada	No detectada
IA	≤1.0	No	y	<1	No detectada	No detectada
IB	≤1.0 1.01-2.0	Si No	o y	≥1 No	No detectada	No detectada
IIA	1.01-2.0 2.01-4.0	Si No	y y	* *	No detectada	No detectada
IIB	2.01-4.0 >4.0	Si No	y y	* *	No detectada	No detectada
IIC	>4.0	Si	y	*	No detectada	No detectada
III	*	*			Si	No detectada
IV	*	*			*	Si

Tabla 1. Estadificación clínica del melanoma según la AJCC. ** Puede ser cualquier valor/estado.*

Si bien para realizar el **pronóstico de melanoma** actualmente se utiliza este método, adoptado en nuestro país en el Consenso Nacional Inter-Sociedades sobre Melanoma Cutáneo en junio del 2011; está claro que solo permite determinar el grado de evolución del melanoma, pero es claramente insuficiente, debido a sus limitaciones, para predecir el avance de la enfermedad. Por este motivo, existe un amplio consenso en que este sistema debe ser mejorado a través de la incorporación de marcadores moleculares y de parámetros que midan la respuesta inmune anti-tumoral del paciente.

1.1.6 Tratamiento del melanoma metastásico

Si los tumores primarios son detectados en forma temprana, lo que ocurre en el 80% de los casos, la enfermedad puede ser resuelta por extirpación quirúrgica. Por el contrario, si el tumor presenta cierto grado de avance (por ej. grosor mayor a 1 mm) existen riesgos de

metástasis. Una vez iniciada la metástasis, el pronóstico es malo debido a que las terapias disponibles actualmente no son completamente eficaces (72,73).

Las primeras terapias utilizadas contra melanoma metastásico durante la última parte del siglo pasado fueron la radioterapia y la quimioterapia, agentes que provocan distintas agresiones citotóxicas, como por ej. daño al ADN, y funcionan como inductores de apoptosis. A diferencia de la efectividad de estas terapias en otros tipos de canceres, estas demostraron ser completamente ineficaces en melanoma. Investigaciones posteriores demostraron que el melanoma metastásico es intrínsecamente resistente a los compuestos quimioterapéuticos. Esta resistencia intrínseca del melanoma se debe a la profunda desregulación de las vías de muerte celular que se observa en melanoma, en parte debido a la expresión aberrante de proteínas de la familia Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) que regulan la vía apoptótica intrínseca o mitocondrial (74). Esto será explicado en mayor detalle en la **sección 1.4**.

Por ello, en melanoma se careció de tratamientos eficaces hasta la aparición, durante la última década, de las inmunoterapias y terapias dirigidas con inhibidores de BRAF y MEK (75). No obstante, estas terapias no están exentas de inconvenientes, dado que, si bien han demostrado ser más eficaces y menos tóxicas que las terapias anteriores, proporcionando importantes avances mejorando la supervivencia de los pacientes, para muchos pacientes siguen siendo ineficaces debido al desarrollo de resistencia. Por lo tanto, es imperioso mejorar las estrategias terapéuticas, haciendo uso de las terapias combinadas y caracterizando nuevos blancos terapéuticos para esta enfermedad, y establecer pautas para adecuar cada tratamiento según la necesidad de cada paciente.

A continuación, se describirán las terapias comúnmente utilizadas, que comprende las terapias dirigidas y las inmunoterapias.

1.1.6.1 Terapia dirigida

Se han desarrollado varias terapias moleculares dirigidas contra diversos blancos moleculares, para inhibir la vía de MEK/ERK o PI3K/AKT, tales como BRAF V600E, MEK o PI3K, cuya sobre-expresión o activación constitutiva por mutaciones está implicada en la tumorigénesis y progresión tumoral (76). En pacientes con enfermedad irresecable o metastásica, las estrategias terapéuticas disponibles de terapia dirigida con inhibidores de BRAF mutado (BRAFi) e inhibidores de MEK (MEKi) han conducido a una mejora significativa en la sobrevida general y libre de progresión. Sin embargo, a pesar de los avances logrados, la sobrevida a 5 años no supera el 60% (77).

Dentro de los inhibidores de BRAF V600E se encuentra el Vemurafenib, aprobado en el 2012, el cual induce rápidas respuestas efectivas y regresión tumoral, inicialmente mejoró la sobrevida del 84% en los pacientes tratados (78,79). Sin embargo, al cabo de 6-9 meses de tratamiento, los tumores retoman su crecimiento por la aparición de mecanismos de

resistencia a la droga (80), poniendo de manifiesto la gran plasticidad de la célula de melanoma. En el año 2013, se aprobó el uso de un inhibidor alternativo, el Dabrafenib, que actúa compitiendo con el ATP por la unión al sitio catalítico (81). Esta droga mostró una mejor tasa de respuesta y mayor sobrevida libre de eventos adversos en comparación con agentes quimioterapéuticos clásicos como la Dacarbazina (82).

En la actualidad, la combinación de estos BRAFi con algunos MEKi ha logrado aumentar la sobrevida libre de progresión a 14 meses y la tasa de sobrevida a 5 años a más del 20% (83). Sin embargo, las respuestas observadas son de corta duración por la aparición de resistencias al tratamiento luego del primer año. Los análisis a nivel molecular demostraron el surgimiento de numerosos mecanismos de resistencia, muchos de los cuales están vinculados con la reactivación de diferentes componentes de la vía de MAPK (72).

Las alteraciones genómicas y genéticas que conducen a la reactivación de la vía MAPK se observan en hasta el 60% de los melanomas que desarrollan resistencia a BRAFi (84). Estas alteraciones incluyen la mutación de NRAS; amplificación, fusión o alteración en el *splicing* alternativo de BRAF; mutación de MEK1 o MEK2; y pérdida de NF1 (85–87). Sumado a ello, las alteraciones genéticas que conducen a la regulación positiva de la vía PI3K-PTEN-AKT y receptores de factores de crecimiento (EGFR, PDGFR, EPHA2, AXL, NGF) también ocurren en un porcentaje menor de casos (88).

La terapia combinada con MEKi surge como complemento para disminuir la posibilidad de desarrollar resistencia inducida por la reactivación de la vía MAPK. Aunque esta terapia combinada ofrece beneficios de sobrevida, la recaída y aparición de resistencia es casi universal (88).

1.1.6.2 Inmunoterapia

El sistema inmunitario desempeña un importante papel en la inmunidad antitumoral, aunque no ha sido tan exitosa en la erradicación del tumor dado los complejos mecanismos que les permiten a las células tumorales evadir la respuesta inmunitaria (89). Es sabido que los tumores se desarrollan en el contexto de un sistema inmunológico desregulado (90), donde el tumor induce la destrucción de las células inmunes antitumorales y promueve un ambiente pro-tumorigénico. Una característica saliente del melanoma es su inmunogenicidad y la persistencia en el paciente de linfocitos T (LTs) dirigidos contra antígenos de melanoma. Esta característica ha buscado ser explotada, desde hace más de una década, con el objetivo de desarrollar inmunoterapias contra esta enfermedad (91). Por todo ello, hacer foco en el sistema inmunológico representa una opción atractiva para el desarrollo del tratamiento anticancerígeno.

En este grupo de terapias, encontramos al Ipilimumab, un anticuerpo monoclonal que bloquea la función de CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4*), regulador negativo de la activación de los LTs. De esta manera, al bloquear la actividad de CTLA-4,

aumentará la activación y proliferación de células T que podrán atacar y ayudar a eliminar el tumor (92). Por otro lado, se han desarrollado anticuerpos bloqueantes de PD-1 (*Programmed cell Death-1 receptor*), un receptor inhibitorio de la activación de LTs. Entro ellos se encuentran Nivolumab, Lambrolizumab y Pembrolizumab que bloquean la función de PD-1, favoreciendo la actividad de los linfocitos, similar a lo observado al bloquear CTLA-4 (93).

El tratamiento con anti-PD-1 y anti-CTLA-4 conduce a respuestas duraderas en hasta el 40% de los pacientes, a diferencia de los tratamientos previamente disponibles para el melanoma, que proporcionaban un 5% de sobrevida a largo plazo. La inmunoterapia también ha mostrado ser beneficiosa como tratamiento adyuvante para el melanoma en estadio III (94). Sin embargo, muchos pacientes no muestran una respuesta a la terapia por presentar una resistencia innata a estas terapias, mientras que aproximadamente el 40% con una buena respuesta finalmente recae, por el desarrollo de una resistencia adquirida (95).

1.2 Vía de señalización Wnt

Como se mencionó anteriormente, la vía de señalización Wnt se encuentra activa en melanoma. Esta vía es muy importante durante el desarrollo embrionario, en donde regula una diversidad de procesos celulares, los cuales incluyen proliferación, diferenciación, polaridad, adhesión y motilidad; luego en el tejido adulto disminuye su actividad y se ha descripto que contribuye al mantenimiento y autorrenovación de células madre en los tejidos, regulando así la homeostasis del organismo (96). Esta diversidad de regulación de procesos biológicos se debe a una expresión diferencial en tiempo y espacio de diferentes ligandos y receptores (97).

En el año 1982, se descubrió que un virus inducía tumores en la glándula mamaria de ratón activando la expresión de un gen desconocido, al que llamaron INT1 (*Integration 1*) (97), conocido a la fecha como WNT1. Cinco años después, en 1987, se describió una mutante sin alas de *Drosophila melanogaster*, debido a la mutación del gen *Wingless* (Wg) (98), el cual resulto ser homólogo de Int1 (99,100). El nombre con el que conocemos actualmente a esta vía surgió de la fusión “Int1” y “Wingless”, resultando en Wnt (101).

Esta vía se ha visto desregulada en distintas patologías, como en desórdenes metabólicos, trastornos neurodegenerativos y varios tipos de canceres como de colon, mama y melanoma (102–106).

Se distinguen dos vías de señalización Wnt bien diferenciadas, denominadas canónica y no-canónicas, las cuales son activadas por distintos ligandos Wnt. A grandes rasgos, los ligandos Wnt se unen a los receptores FZD (*Frizzled*) y co-receptores de un paso transmembrana afines, activando así a la proteína DVL (*Dishevelled*) en el citoplasma, la cual transducirá la señal río abajo desencadenando la activación de las distintas vías de señalización (**Fig. 5**). Además de las vías canónica y no-canónicas, se encuentran descriptas

vías Wnt alternativas. En la siguiente sección se describirá en mayor detalle los distintos componentes de la vía, para luego tratar cada vía por separado en las **secciones 1.2.2**, **1.2.3** y **1.2.4**.

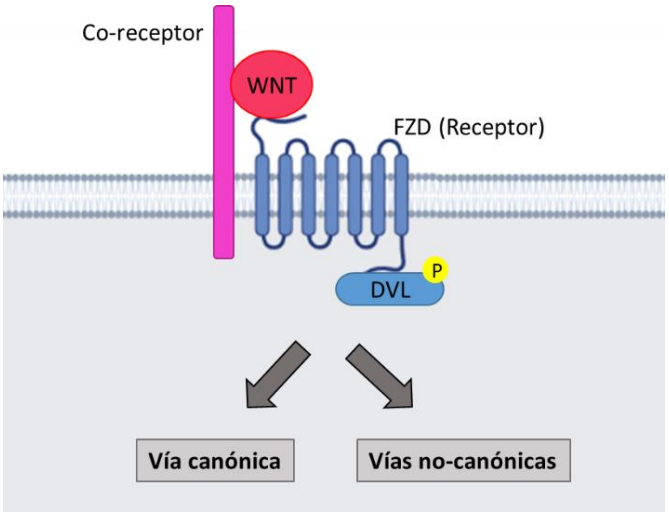


Fig. 5. Inicio de la Vía Wnt. *La unión de los distintos ligandos WNT induce la activación de la vía Wnt canónica o no-canónica.*

1.2.1 Componentes principales de la vía Wnt

1.2.1.1 Ligandos Wnt

Los ligandos Wnt pertenecen a una familia de 19 glicoproteínas altamente relacionadas estructuralmente; poseen una secuencia consenso de asparaginas, a la cual se unen los oligosacáridos, y 22 regiones ricas en cisteína. Su composición varía de 350 a 400 aa (aminoácidos), con un péptido señal hidrofóbico en el extremo amino-terminal (107). Por otra parte, la glicosilación y palmitoilación de las proteínas Wnt es de suma importancia para su correcto plegamiento, secreción y actividad biológica (108,109).

Estos ligandos, una vez secretados al espacio extracelular, pueden estimular a las células de forma autócrina y parácrina uniéndose a diferentes familias de receptores y co-receptores que, a su vez, transducen las señales a distintas vías de señalización (**Fig. 5**) (110). Estas vías pueden ser clasificadas en señalización Wnt canónica (dependiente de β-Catenina) y no-canónicas (independientes de β-Catenina). La actividad y función de los Wnts depende del contexto celular, y de la combinación entre los ligandos y sus receptores/co-receptores, determinando así, qué vía de señalización será activada rio abajo del receptor. Generalmente, la vía canónica es activada por WNT1, WNT3A y WNT8 y las vías no-canónicas por WNT4, WNT5A y WNT11 (110).

1.2.1.1.1 WNT5A

WNT5A es el ligando principal de las vías no-canónicas, puede actuar tanto como oncogén o como supresor tumoral dependiendo del tipo de cáncer estudiado, el contexto celular y la presencia de receptores en las células tumorales (111).

La acción de WNT5A como supresor tumoral ha sido descripta en varios tipos de cáncer (112), tales como colorrectal (113), ductal de mama (114) y neuroblastoma (115) . En estos casos, se observó que la pérdida o disminución en la expresión de WNT5A correlacionó con una menor sobrevida del paciente; otros estudios demostraron su función como inhibidor de la proliferación, migración e invasión celular (111,116). Pero, en otros tipos de cáncer se observó un papel totalmente opuesto, como es el caso de los cánceres de piel (117), mama (118), gástrico (119), páncreas (120) y próstata (121), en los cuales WNT5A actúa como un oncogén, estimulando la proliferación, migración e invasión celular. Esto lo logra regulando los complejos de adhesión focal y modulando la expresión de genes asociados a la TEM (transición epitelio-mesenquimal), un proceso en el que las células experimentan un cambio de fenotipo epitelial a uno mesenquimal, por pérdida de marcadores epiteliales, tales como citoqueratinas específicas del tejido y moléculas de adhesión como E-cadherina, junto con la adquisición de marcadores típicos de las células mesenquimales, como vimentina y N-cadherina (120).

En melanoma, WNT5A es el ligando mejor caracterizado. Se encuentra sobreexpresado en la mayoría de las líneas celulares de melanoma (principalmente en las derivadas de tumores más agresivos) y su expresión, determinada por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes, correlaciona con una peor prognosis y menor sobrevida (117,122,123). La mayoría de los estudios se centran en su rol como promotor de la motilidad y la invasión. Por otra parte, se observó que WNT5A, secretado por las células de melanoma, induce a la liberación de exosomas que contienen factores pro-angiogénicos (IL8, VEGF y MMP2) e inmunosupresores como IL6 (124). También se ha correlacionado la invasión y progresión de melanoma con la expresión elevada de WNT5A e IL6 en un modelo de regulación positiva en el que WNT5A promueve la liberación de IL6 fomentando, así, la proliferación celular y a su vez IL6 favorece la transcripción de WNT5A (125). Además, Barbero y col. (2019) reportaron que la unión de WNT5A al receptor ROR1 (*Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor 1*) induce la activación de NF-κB en líneas celulares de melanoma, induciendo a su vez la producción de numerosas citoquinas pro-inflamatorias como IL6, IL8, IL11 y MCP-1 (CCL2).

Existen evidencias que WNT5A otorga resistencia a los tratamientos en pacientes con melanoma. Algunos estudios mostraron que en melanoma WNT5A activa PKC y STAT3, lo que reduciría la expresión de distintos antígenos asociados a tumores generando alteraciones en la respuesta inmune de los pacientes a tratamientos con inmunoterapia (126). Además, se ha visto que WNT5A pertenece a la firma transcripcional de pacientes con Resistencia Innata anti-PD-1 (datos de ARNm) (127). Por otra parte, también se ha reportado que células de melanoma resistentes a inhibidores de BRAF sobreexpresan WNT5A, como así

también las resistentes a Vemurafenib; y más aún, su elevada expresión lleva a la activación de PI3K/AKT, fomentando así el crecimiento tumoral (128).

Como se dijo anteriormente, dado que numerosos tipos tumorales expresan y secretan abundantes cantidades de WNT5A, el cual a través de un efecto autócrino o parácrino regula múltiples procesos celulares en cáncer (como proliferación, transición epitelial-mesenquimal, angiogénesis, quimioresistencia, migración e invasión y metástasis), ha sido propuesto como blanco terapéutico (129).

1.2.1.2 Receptores y co-receptores

Los ligandos Wnt pueden unirse a receptores y co-receptores o receptores alternativos afines.

1.2.1.2.1 FZD

La familia de receptores FZD, receptores acoplados a proteínas G, fueron los primeros receptores descriptos para WNTs (130), en humanos existen 10 miembros FZD (131). Estructuralmente se caracterizan por la presencia de 3 regiones: una región N-terminal extracelular, altamente glicosilada, de 120 aa, la cual contiene un dominio rico en cisteína (CRD, *Cystein Rich Domain*) que permite la interacción con los distintos WNTs y otros ligandos; una región de siete pasos transmembrana, característicos de los receptores acoplados a proteínas G; y un extremo C-terminal citoplasmático que transduce la señal río abajo (132–134).

Además de los receptores FZD, las vías de señalización de Wnt requieren de la presencia de proteínas de un paso transmembrana, como LRP 5/6 (*Low-density lipoprotein Receptor-related Proteins 5 and 6*) y RTKs, que pueden funcionar como co-receptores o receptores de los distintos ligandos WNTs. Los ligandos WNTs canónicos interactúan con miembros de la familia FZD y LRP 5/6, mientras que los WNTs no canónicos interactúan con las proteínas FZD y RTKs (110,135).

1.2.1.2.2 LRP5/6

Los receptores LRP 5/6 han sido asociados a FZD frecuentemente ya que, la unión de los ligando WNTs provoca la formación del complejo FZD-LRP5/6 o “señalosoma” fundamental para la formación de un complejo-receptor activo (136,137). La importancia de este receptor en la vía Wnt fue corroborada mediante la obtención de fenotipos similares en ratones *knockout* para WNT o LRP (138).

1.2.1.2.3 RTKs

Los miembros RTKs que participan en la vía Wnt pertenecen a una familia de glicoproteínas de un paso transmembrana, entre ellos se encuentran los receptores ROR (*Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor*), ROR1 y ROR2, RYK (*Receptor-Like Tyrosine Kinase*) y PTK7 (*Protein Tyrosine Kinase 7*) (139,140); los cuales median la señalización Wnt no-canónica.

Estos receptores presentan una arquitectura molecular similar (139), poseen dominios de unión a ligandos en la región extracelular, seguidos de una única hélice transmembrana, y una región citoplasmática con el dominio yuxtamembrana catalítico TKD (*Tyrosine Kinase-like Domain*) (**Fig. 6**).

ROR1 y **ROR2** fueron descubiertos en el año 1992 en una línea celular de neuroblastoma, en donde se observó que en su porción citoplasmática poseían un dominio con alta homología con el dominio tirosina quinasa de los receptores de factores de crecimiento, y por ello, se los incluyó dentro de la familia de los RTKs. (141). Entre los 4 RTK mencionados ROR1 y ROR2 son los más estudiados y serán descriptos en mayor profundidad; particularmente en esta tesis doctoral se hará foco en ROR1, el cual será discutido con más detalle en la **sección 1.3**. Inicialmente fueron caracterizados como receptores huérfanos, de allí parte de su nombre "*Orphan Receptor*", por desconocerse sus ligandos; posteriormente, se determinó su unión a diversos ligandos WNTs. Estructuralmente, más similares entre sí que con el resto de los miembros, ROR1 y ROR2 comparten una identidad general de aa del 58% (141). En la región extracelular, ambos receptores poseen un dominio similar a inmunoglobulina (Ig); un dominio CRD, similar al de los receptores FZD, el cual ha sido identificado como esencial para la unión de los ligandos WNT (133,142); y un dominio *kringle* (KRD), que se ha demostrado que es esencial para la hetero-oligomerización de ROR1/ROR2 (143) (**Fig. 6**). En la región intracelular, además del dominio TKD, los RORs presentan un dominio rico en prolina (PRD), que se encuentra entre dos dominios ricos en serina-treonina (141) (**Fig. 6**). Si bien, en su región intracelular, ROR1 posee 19 Tyr fosforilables (144), la secuencia aminoacídica correspondiente al dominio TKD presenta 6 desviaciones de la secuencia TK (tirosina quinasa) canónica, y particularmente 3 (C482G, K614R y L634F) se encuentran en el centro catalítico (144). En relación a esto último, se observó una autofosforilación insignificante de ROR1 (144–146). En cambio, la secuencia TK de ROR2 muestra mucha mayor similitud con la secuencia TK canónica. Esto sugiere, una diferencia en la actividad catalítica entre ROR1 y ROR2 (147), presentando ROR1 una actividad quinasa más débil que ROR2. Por otra parte, el dominio PRD puede ser reconocido por proteínas que posean un dominio de homología SRC 3 (SH3), permitiendo así su interacción; cabe mencionar que este dominio muestra una baja homología entre ROR1 y ROR2 (141), sugiriendo que cada receptor ROR podría mediar distintas interacciones río abajo.

La proteína **RYK** fue identificada en mamíferos, en el año 1993, por un "*screening"* de homología (148). En cuanto a su estructura, posee en la región extracelular un dominio factor inhibidor de WNT (WIF, *WNT-Inhibitory Factor*) (**Fig. 6**), dominio compartido con el

modulador WNT secretado WIF-1, el cual media la unión directa de los WNTs (149,150). Los dominios WIF son antagonistas de WNTs (151). Se puede decir que la topología de dominio de la región extracelular de RYK es la más disímil respecto a los otros RTKs (**Fig. 6**). En su región yuxtamembrana intracelular, RYK posee un dominio de función desconocida caracterizado por un alto contenido de serina y treonina. En tanto, en su dominio TKD posee residuos atípicos en múltiples sitios críticos para la actividad quinasa, careciendo así, de dicha actividad, lo cual ha sido probado en distintos ensayos (148,152–155).

Por último, **PTK7**, fue identificado por primera vez en melanocitos en el año 1993, en un *screening* de TKs por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (156), y luego en el año 1995 se lo reconoció como un gen regulado positivamente en células de carcinoma de colon y, por ello denominado "*colon carcinoma kinase 4*" (CCK-4) (157). Cabe mencionar que es el miembro menos estudiado y que su función en la señalización aún no está clara. Estructuralmente, PTK7 posee, en su región extracelular, siete dominios Ig (**Fig. 6**), de los cuales los dominios del 4 al 7 son necesarios para una unión óptima de los ligandos WNT (158,159). En su región intracelular, si bien su dominio TKD, al igual que con RYK, carece de actividad catalítica (160,161), le permite interaccionar con distintas proteínas (162–164). Además, se ha reportado que este receptor puede interactuar tanto con receptores WNT canónicos como no-canónicos (140), indicando que podría afectar ambas vías de señalización.

Es necesario señalar que tanto RYK como PTK7 pueden requerir de condiciones particulares para la actividad quinasa que aún no se han identificado.

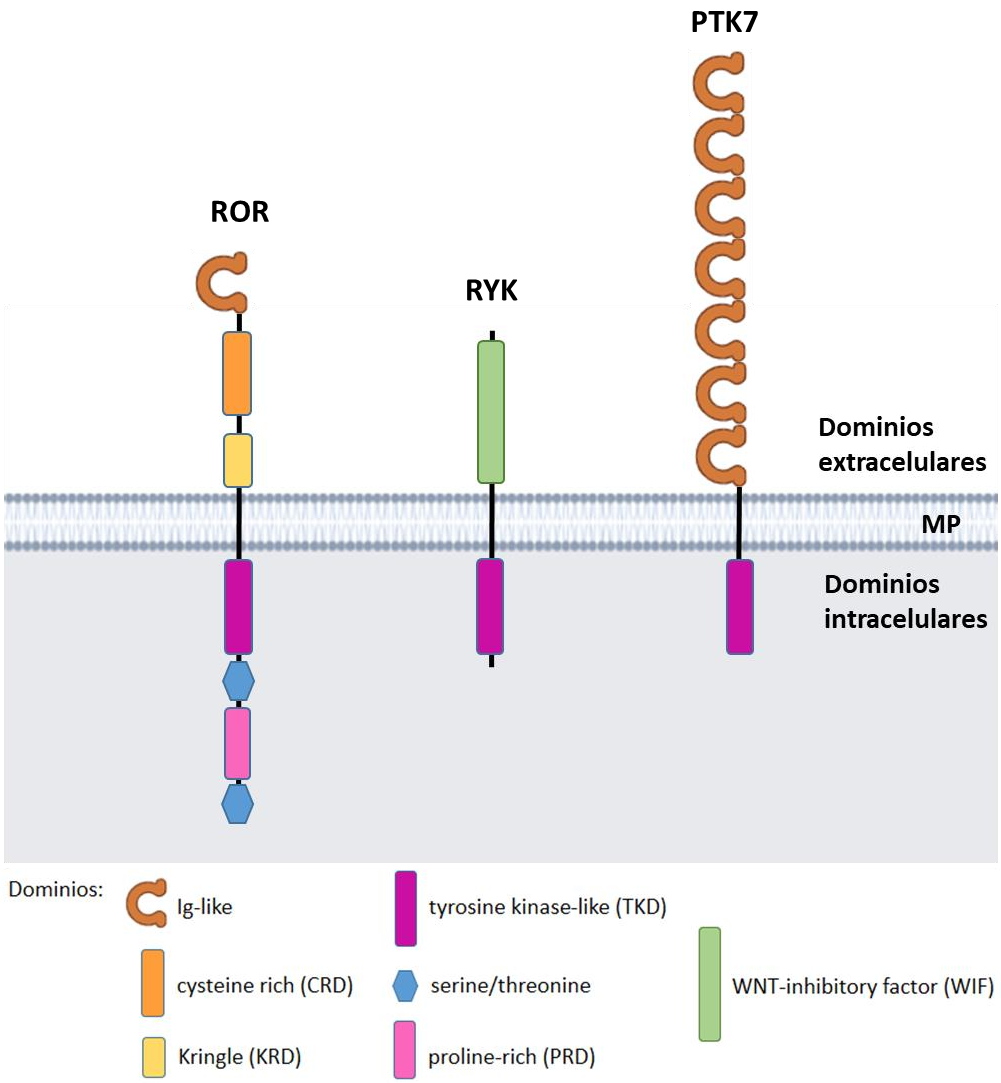


***Fig. 6. Dominios de los miembros RTKs de la Vía Wnt**. La estructura molecular de los RTKs consta de distintos dominios; los RORs (ROR1 y ROR2) constan de una parte extracelular compuesta por un Ig, un CRD y un KRD, y una parte intracelular compuesta por un TKD, dos dominios de serina/treonina y un PRD. RYK posee un dominio WIF extracelular y un TKD intracelular. PTK7 posee siete dominios Igs extracelulares y un TKD intracelular. Ig: dominio similar a inmunoglobulina, CRD: dominio rico en cisteína, KRD: dominio Kringle, TKD: dominio similar a tirosina quinasa, PRD: dominio rico en prolina, WIF: dominio factor inhibidor de WNT.*

Cabe mencionar que el ligando WNT5A puede interaccionar con los cuatro receptores RTKs, ROR1, ROR2, RYK y PTK7 (159,165). La unión de WNT5A a ROR1 y/o ROR2 puede inducir la homo- o hetero-dimerización de los receptores para activar la señalización de AKT/ERK, Vías Rho GTPasas, NF-κB y STAT3; dando como resultado supervivencia, proliferación, diferenciación y migración celular (166,167). Es pertinente señalar que muchas enfermedades, incluidas el cáncer, son el resultado de cambios o anomalías genéticas que en general aumentan la actividad de estos RTKs, por lo que resulta importante el desarrollo de fármacos que bloqueen o atenúen su actividad.

1.2.1.3 DVL

DVL es la primera proteína intracelular que será activada en respuesta a la interacción de los diferentes ligandos WNTs con las distintas combinaciones de receptores y/o co-receptores, tanto de la vía canónica como las no-canónicas (**Fig. 5**). En humanos, se han detectado 3 isoformas de la misma con un alto grado de homología, llamadas DVL1, DVL2 y DVL3, siendo DVL2 la más abundante (168). Estas proteínas poseen 3 dominios altamente conservados (168,169), en el extremo C-terminal se encuentra DEP, compuesto por 75 aa, el cual permite la unión de DVL a los lípidos de membrana; en la región central, PDZ conformado por 73 aa, proporciona un sitio de anclaje para diversas proteínas tales como fosfatasas, quinasas y adaptadores de interacciones proteicas; y DIX, en el extremo N-terminal, de 82-85 aa, que suele estar unido a la proteína Axina. La actividad de estos dominios dependerá de la vía de señalización activada, siendo DIX y PDZ los dominios que intervienen en la vía canónicas, mientras que PDZ y DEP intervienen en las vías no-canónicas (170).

1.2.2 Vía canónica

La vía de señalización Wnt canónica (dependiente de β-Catenina), es una vía mediada por la acción de la β-Catenina, la cual es una proteína de unión a cadherinas que regula la adhesión celular mediante el establecimiento de uniones con los filamentos de actina (171,172).

Cuando la vía Wnt canónica se encuentra inactiva, por ausencia de los ligandos WNTs canónicos, la β-Catenina citoplasmática se encuentra asociada a un complejo de destrucción con otras proteínas como APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), CK1 (*Casein Kinase*), AXIN1 y GSK3β (*Glycogen Synthase Kinase 3β*). En este contexto, la β-Catenina es degradada vía ubiquitina-proteosoma, luego de ser fosforilada por las quinasas GSK3-β y CK1 en sitios reguladores específicos del extremo N-terminal y ubiquitinada por β-TrCP (173,174) (**Fig. 7A**).

Cuando la vía Wnt canónica es inducida por distintos WNTs, como WNT1, WNT3A y WNT8, por la unión a sus respectivos receptores FZD y co-receptores LRP, las proteínas Gαo y Gαq son activadas (175) y transducen la señal, la cual se inicia con la activación de la proteína DVL, que será reclutada en la membrana plasmática. DVL será hiperfosforilada por diversas quinasas tales como CK1a (176), resultando en la inhibición de GSK3β y, por ende, impedirá la fosforilación y posterior degradación de β-Catenina (177,178). Con la estabilización de la β-Catenina, esta se acumulará en el citoplasma, permitiendo así su translocación al núcleo y asociación a TCF/LEF (*T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer binding Factor*), regulando así la transcripción de diversos genes, como c-Myc, AXIN2, y Ciclina D1 (179–181) (**Fig. 7B**).

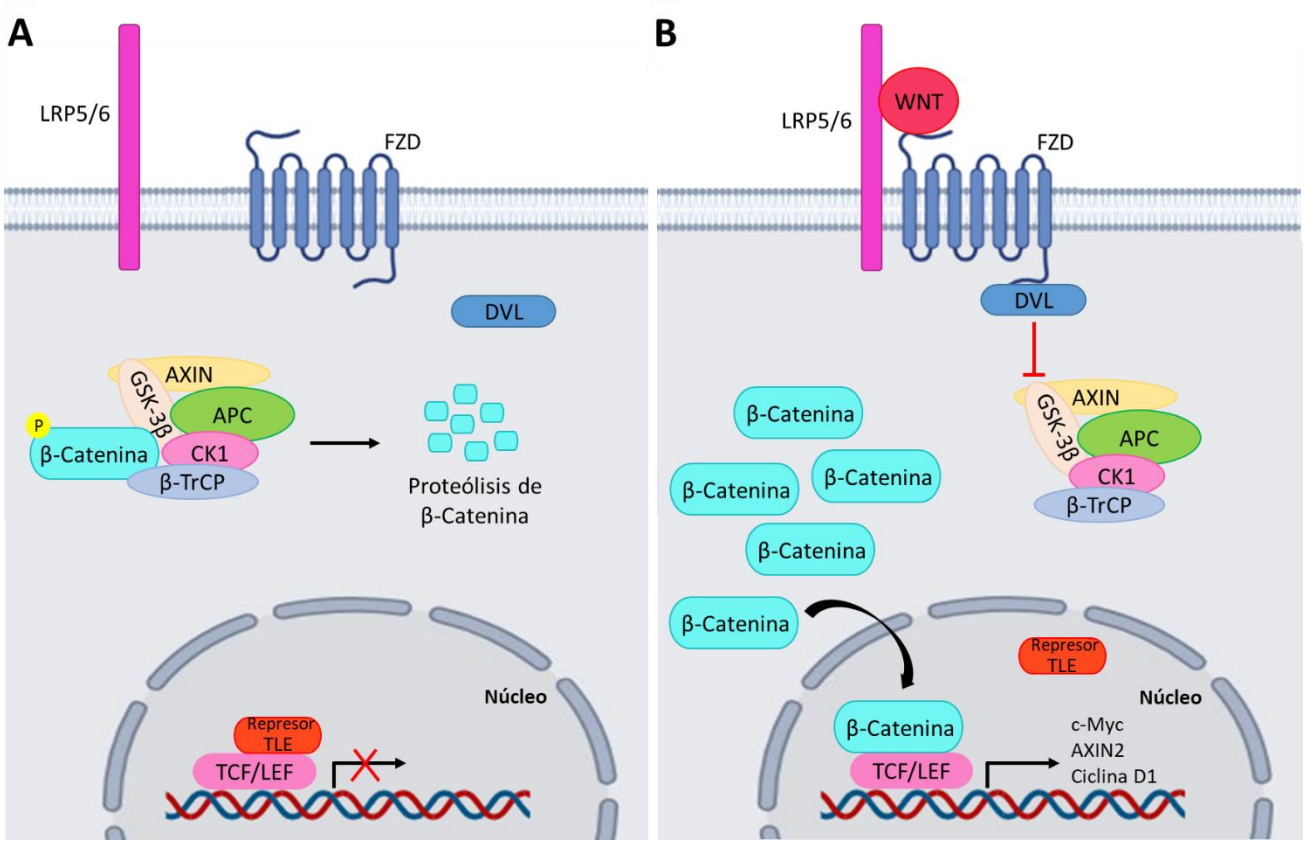


Fig. 7. Vía de señalización Wnt canónica. *A) En ausencia de WNTs la vía se encuentra inactiva y la β–catenina sufre degradación proteolítica en el proteasoma. B) En presencia de WNTs, se forma el complejo WNT-FZD-LRP en la membrana, se activa DVL, se acumula β–catenina y transloca al núcleo.*

1.2.3 Vías no-canónicas clásicas

Las vías de señalización Wnt no-canónicas, son vías independientes de β-Catenina, activadas por distintos WNTs que se unen a receptores FZD, RYK o ROR1 y 2, y conducen a una señalización río abajo más compleja que está fuertemente afectada por el contexto celular y la combinación ligando-receptor (110). Estas vías se han identificado en diversos estudios genéticos, moleculares y bioquímicos realizados en los últimos años en humanos, como también en ranas, peces y ratones. Las vías clásicas no-canónicas más estudiadas, son la vía de Polaridad Celular Plana (PCP, *Planar Cell Polarity*) (182) y la vía de Ca^{2+} (183), activadas comúnmente por WNT4, WNT5A, y WNT11. Asimismo, se han descripto diversas vías alternativas activadas por estos WNTs, la mayoría de ellas vinculadas a la regulación de la proliferación y adhesión celular (184).

1.2.3.1 Vía PCP

La vía PCP en modelos de animales vertebrados regula procesos como la regulación de la dinámica del citoesqueleto, las decisiones de destino celular y la orientación de las divisiones celulares. A nivel molecular, la interacción de WNT con los receptores FZD lleva a la

fosforilación de las proteínas DVL. DVL activa a las pequeñas GTPasas RAC y/o RHOA, las cuales regulan la actividad de proteínas quinasas, tales como JNK y ROCK (*Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase*) (**Fig. 8A**). En respuesta a ello, se activarán FTs, como ATF2 (*Activating Transcription Factor*), encargados de regular los procesos relacionados con la estructura del citoesqueleto, la polaridad y la migración celular (135,185).

1.2.3.2 Vía de Ca^{2+}

La capacidad de algunos ligandos WNTs, como WNT5A y WNT11, de inducir oscilaciones transitorias de Ca^{2+} (calcio) intracelular fue originalmente descripta en 1997 (131). La unión de dichos ligandos a los complejos FZD-DVL, median la activación de proteínas G heterotriméricas. Éstas, a su vez, activan a PLC (*PhosphoLipase C*) la cual se transloca a la membrana plasmática, estimula al segundo mensajero DAG (*DiAcylGlycerol*) y promueve la producción de IP3 (*Inositol-1,4,5-trisPhosphate*) (186). El aumento de IP3 induce la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares, lo cual permite regular la actividad de enzimas quinasas dependientes de Ca^{2+}, como CaMKII (*Ca^{2+}/CaM-dependent protein kinase II*), PKC y Calcineurina (131,187). En respuesta a la activación mediada por Ca^{2+}, PKC se transloca a la membrana plasmática donde puede interaccionar con otras proteínas, como CDC42 (*Cell Division Cycle 42 protein*). Finalmente, en respuesta a esto, se activará el regulador transcripcional NFAT (*Nuclear Factor Associated with T cells*) (135) (**Fig. 8B**). Algunas de las funciones reguladas por esta vía de señalización involucran tanto cambios en el citoesqueleto, en la movilidad celular y la morfogénesis, como también en la intervención en los procesos de inflamación y neurodegeneración (135,188).

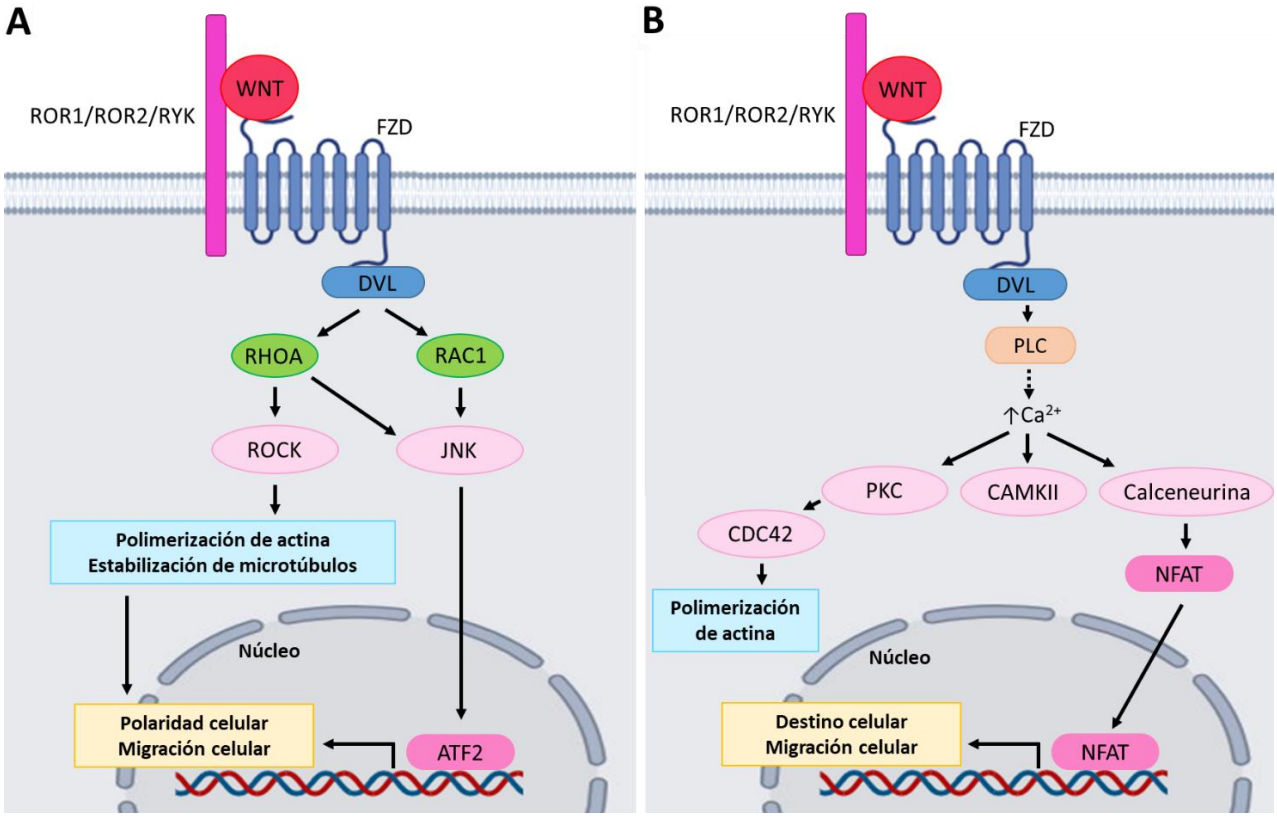


Fig. 8. Vías de señalización no-canónicas de Wnt. *A) Vía de Polaridad Celular Plana. Se induce la activación de las GTPasas RAC y RHOA, quienes activan a las quinasas ROCK y JNK, llevando a la polimerización de actina y estabilización de los microtúbulos. B) Vía de Ca^{2+}. Se induce la activación de PLC, lo que provoca la liberación de Ca^{2+} intracelular, conduciendo a la activación de CAMKII, PKC y Calcineurina, quien a su vez activa al factor de transcripción NFAT.*

1.2.4 Vías no-canónicas alternativas

Además de las vías clásicas independientes de β-Catenina, se han descripto vías de señalización no-canónicas alternativas activadas por distintos ligandos WNTs (189), las cuales implican la activación de distintos intermediarios dependiendo del contexto celular. Algunas de estas vías son:

- Vía Wnt-PKA: los ligandos WNT1 y WNT7A pueden activar esta vía uniéndose a FZD, activando a su vez a la enzima AC (*Adenylyl Cyclase*), la cual transformará el ATP en cAMP (*cyclic Adenosine MonoPhosphate*). El aumento en los niveles de cAMP activa a PKA (*Protein Kinase A*) y en consecuencia al FT CREB (*cAMP Response Element-Binding Protein*), induciendo la expresión de genes miogénicos (**Fig. 9A**).
- Vía Wnt-aPKC: la unión WNT-FZD activa a DVL e induce la activación de aPKC (*atypical Protein Kinase C*), posiblemente a través de la asociación de DVL con el complejo aPKC/PAR3/PAR6 (PAR: *partitioning-defective*). aPKC fosforilada inhibe a la quinasa PAR1 encargada de la regulación de los microtúbulos. Además, DVL puede asociarse con Lgl (*Lethal giant larvae*), un antagonista de aPKC, regulando así la polaridad celular (**Fig. 9B**).

- Vía Wnt-GSK3-microtúbulos: la unión WNT-FZD activa a DVL (posiblemente asociada a microtúbulos), complejo que luego activa la fosforilación de JNK e inhibe la fosforilación de GSK3, favoreciendo la activación de MAP1B (*Microtubule-Associated Protein 1B*), resultando en una mayor estabilidad de los microtúbulos (**Fig. 9C**).
- Vía Wnt-MTOR: la unión de WNT a LRP y FZD, vía DVL y AXIN, puede inhibir a GSK3, y por ende a TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex 2*), favoreciendo así la activación de la regulación traduccional mediada por MTOR (*Mammalian Target Of Rapamycin*) en la tumorigénesis (**Fig. 9D**).
- Vía Wnt-ROR2: la unión de WNT5A a ROR2 puede activar la vía PI3K-CDC2-MKK7-JNK, resultando en la activación de los FTs ATF2 y c-Jun (*Jun oncogene*) (**Fig. 9E**).
- Vía Wnt-RYK: la unión WNT-RYK puede inducir la activación de la quinasa SRC (**Fig. 9F**).

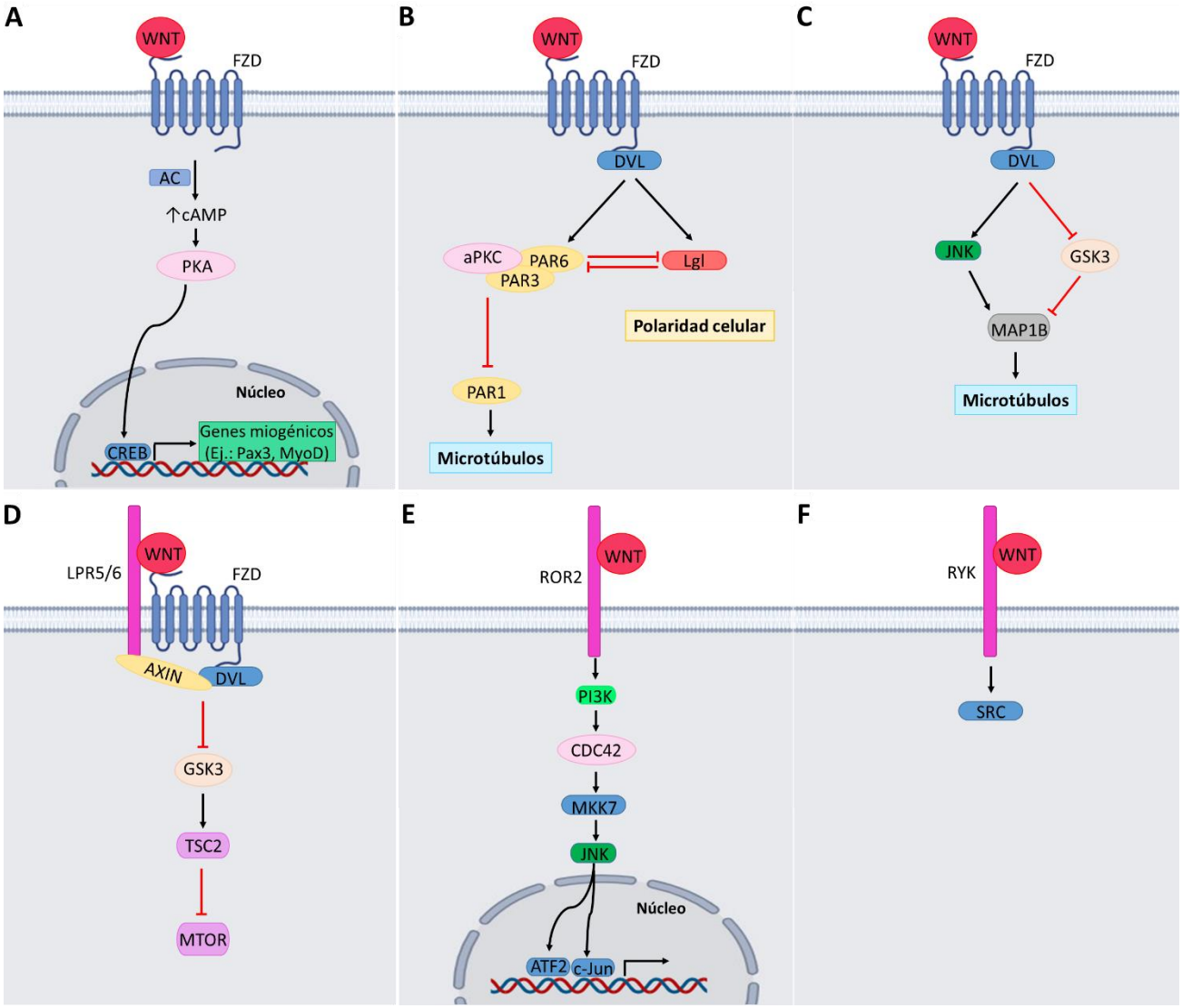


Fig. 9. Vías de señalización Wnt no-canónicas alternativas. *A) Vía Wnt-PKA. B) Vía Wnt-aPKC. C) Vía Wnt-GSK3-microtúbulos. D) Vía Wnt-MTOR. E) Vía Wnt-ROR2. F) Vía Wnt-RYK.*

1.3 ROR1

ROR1, también conocido como NTRKR1 (*Neurotrophic Tyrosine Kinase, Receptor-related 1*) fue identificado en el año 1992 en una línea celular de neuroblastoma (141). El gen que codifica para ROR1 fue localizado en el cromosoma 1p31.3 (190).

1.3.1 Isoformas y localización subcelular de ROR1

ROR1 se expresa predominantemente en la membrana plasmática, aunque varios trabajos han descripto, además, una ubicación citoplasmática y nuclear (191–193). Las ubicaciones subcelulares también pueden derivar de la expresión de isoformas de distinto peso molecular (190), siendo su peso predictivo (con péptido señal) de 104 kDa.

La isoforma más abundante, que se expresa como una proteína de transmembrana, posee aproximadamente 130 kDa y consta de un polipéptido de 937 aminoácidos que es glicosilado y mono-ubiquitinado (194). También se ha descripto una variante de ROR1 de 64 kDa de expresión nuclear y una variante de 260 kDa que probablemente representa un homodímero o un heterodímero con ROR2 dimerizado (195). Asimismo, se pudo observar que todas estas variantes (de 64, 130 y 260 kDa) estaban fosforiladas en los residuos de Tyr y Ser, y una expresión diferencial dependiendo del estado de progresión de los pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) (195).

1.3.2 Expresión de ROR1 en tejido normal y cáncer

En tejidos humanos adultos sanos como esófago, estómago, duodeno, colon, vejiga, útero, testículos, pulmón y paratiroides, así como también fibroblastos primarios, el nivel de expresión de ROR1 se encuentra en niveles muy bajos. Por otro lado, se encuentra una mayor expresión de ROR1 en páncreas y tejido adiposo (166,193). En estos tejidos, la expresión de ROR1 fue detectada en la superficie celular y en algunos casos, también en el citoplasma; la razón de esta diferencia aún no está clara, dado que no se sabe si es debida a diferencias técnicas en los ensayos o al uso de distintos anticuerpos contra ROR1 que reconocen diferentes variantes de la proteína (166).

Por el contrario, se ha demostrado que ROR1 se sobreexpresa en diferentes tipos de cáncer, como, cáncer de mama, colorrectal, endometrio, gástrico, ovario, páncreas, distintos cánceres hematológicos y melanoma (166). A diferencia de lo que ocurre con ROR2, que presenta menor expresión en ciertos tipos de tumores, ROR1 se encuentra en niveles elevados en la mayoría de tumores (166). Más aún, se ha visto que la expresión aberrante de ROR1 posee valor pronóstico y que ROR1 se ha asociado a una mayor agresividad y peor prognosis de los pacientes con cáncer (166).

Por lo tanto, ROR1 se considera un blanco terapéutico prometedor, y, por ende, existe un interés creciente en desarrollar estrategias terapéuticas relacionadas a ROR1. Por todo esto, resulta fundamental conocer y comprender la complejidad de las vías de señalización activadas por ROR1 en cáncer.

1.3.3 Vías de señalización reguladas por ROR1 en cáncer

El principal ligando WNT estudiado utilizado para analizar las vías de señalización dependientes de ROR1 es WNT5A; pero esto no quita que ROR1 pueda activarse al unirse a otros ligandos WNTs, como WNT5B y WNT16, los cuales se han reportado que pueden interaccionar con dicho ligando (196,197). De todos modos, es importante tener en cuenta que también es posible la señalización río debajo de ROR1 independiente de WNTs (198).

Entre los eventos iniciales para la activación de ROR1 se encuentra la formación de un complejo conformado por ROR1 (como homo- o hetero-dímero con ROR2), WNT5A, FZD y DVL (198) (**Fig. 10**). El ligando WNT5A se une a FZD y al dominio CRD de ROR1, induciendo la homo- o hetero-dimerización con ROR2; esto induce la fosforilación de ROR1 en residuos de Ser y Tyr (**Fig. 10**). Cabe mencionar que dada la débil actividad de ROR1 como quinasa, estas fosforilaciones pueden ser llevadas a cabo por otras quinasas (198). Posteriormente, DVL es reclutado a la membrana plasmática uniéndose al dominio PDZ de FZD, lo que induce la fosforilación y activación de DVL. Un punto importante de ramificación en las vías de señalización que resultan activadas río abajo se encuentra en la proteína DVL activada (DVL1, DVL2 o DVL3).

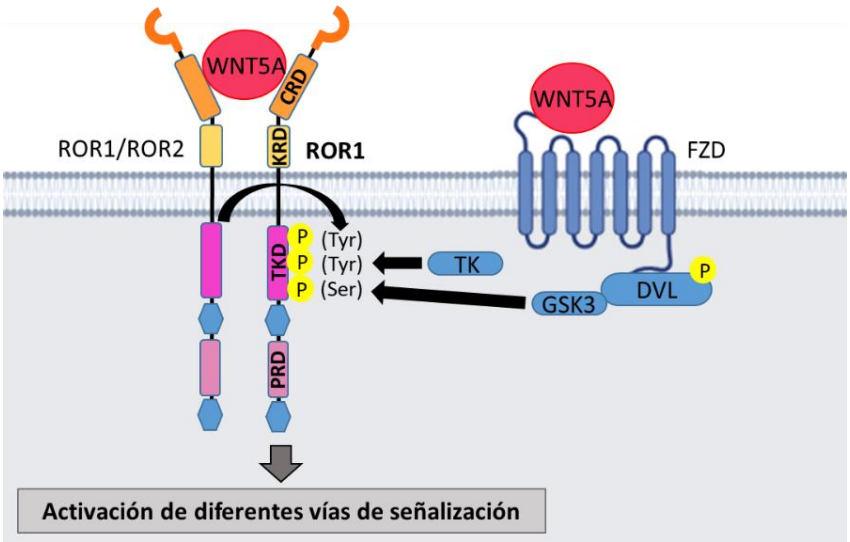


Fig. 10. Activación del receptor ROR1 por vía de señalización Wnt no-canónica. *El ligando WNT5A induce la formación de un complejo entre ROR1-ROR1/2 y el receptor FZD-DVL-GSK3. La transducción de señales está mediada por la fosforilación de ROR1 en Tyr o Ser por las quinasas ROR1/2, GSK3 y una quinasa desconocida (TK). CRD: dominio rico en cisteína, KRD: dominio Kringle, TKD: dominio similar a tirosina quinasa, PRD: dominio rico en prolina. Adaptada de Quezada y Lopez-Bergami, 2023.*

Como se explicó en el párrafo anterior, luego de su activación mediante la unión del ligando y la formación de complejos con otros receptores y DVL, ROR1 regula la actividad de distintas vías de señalización, como PI3K/AKT, NF-κB, STAT3 (detallada en la **sección 3.3.1**), Hippo y diversas Rho GTPasas y MAPKs, en cáncer (198). Todas estas vías, las cuales serán descriptas a continuación, regulan procesos celulares que promueven el desarrollo del cáncer.

ROR1 activa a las Rho GTPasas RHOA, RAC1/2 y CDC42 (**Fig.11**) en distintos tipos de cáncer (198). El mecanismo de acción, en todos los casos, consiste en el reclutamiento de factores intercambiadores de nucleótido de guanina (GEFs), mediado por el dominio PRD o Ser/Thr, que regulan la función de la GTPasa catalizando el intercambio de GDP por GTP citosólico libre. RAC1/2 puede ser activado por ROR1 a través de varios GEFs, incluidos DOCK2 (*Dedicator Of Cytokinesis 2*), ARHGEF2 (*Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor 2*) y ARHGEF6. Por su parte, ARHGEF1 y ARHGEF2 participan en la activación de RHOA. La activación de las distintas Rho GTPasas por ROR1 constituye un mecanismo importante en cáncer contribuyendo a la **proliferación** y **migración** celular (**Fig. 11**) (198).

Entre las vías de señalización inducidas por ROR1, la vía **PI3K/AKT** ha sido identificada como la más relevante en cáncer (198). En primer lugar, ROR1 promueve la translocación de PI3K a membrana plasmática, e induce la activación de PI3K y la inhibición de PTEN, en ambos casos por fosforilación. Esto provoca un aumento de PIP3, que induce el reclutamiento de AKT a la membrana plasmática y su posterior activación. ROR1, además, puede interactuar con TCL1A (*TCL1 family AKT Coactivator A*), un coactivador de AKT. La activación de AKT vía ROR1 conduce a la activación o inactivación de distintos blancos de AKT, como MTORC1 (*Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1*), GSK3β y los FTs FOXO1 (*Forkhead box O1*) y CREB; y a la regulación positiva de CCNE1 (*Cyclin E1*), CDK4 (*Cyclin Dependent Kinase 4*) y BIM1 (*BMI1 proto-oncogene*) (**Fig. 11**). MTORC1 resulta activado por fosforilación de MTOR y RPTOR (*Regulatory associated Protein of MTOR complex 1*). Este complejo multiproteico induce la activación de RPS6KB2 (*Ribosomal Protein S6 Kinase B2*, generalmente conocida como S6K) y la inhibición del represor de la traducción del ARNm EIF4EBP1 (*Eukaryotic translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1*), promoviendo la síntesis proteica y aumentando así la masa celular y la proliferación. Por otra parte, GSK3α/β es inactivado por fosforilación, afectando así al metabolismo de la glucosa, proliferación y migración celular. En línea con estas descripciones, proteínas relacionadas con el ciclo celular como CCNE1 y CDK4 (*Cyclin Dependent Kinase 4*), dos actores clave en la síntesis de ADN y progresión G1/fase S, resultan reguladas positivamente. Además, el efecto de ROR1 sobre la actividad de AKT le permite modular la expresión génica, mediante la fosforilación, de los FTs FOXO1 y CREB. La fosforilación de FOXO1 inactiva este FT que actúa como un importante supresor tumoral en una gran variedad de cánceres, por lo que su inhibición contribuye al crecimiento y supervivencia celular. CREB, en cambio, al ser fosforilado es activado, aumentando así su unión a CREBBP (*CREB Binding Protein*), lo que mejora la transcripción mediada por CREB de genes críticos para la supervivencia celular. De esta manera, ROR1 regula positivamente, vía CREB, genes involucrados en proliferación o

apoptosis, como CCNB1 (*Cyclin B1*), BCL2 (*BCL2 apoptosis regulator*) y CCND1 (*Cyclin D1*). BMI1 es otra proteína regulada por ROR1 de manera dependiente de AKT, por bloqueo en su degradación, lo que conduce a su acumulación en el citosol; su expresión anormal se asocia con tumorigénesis y resistencia a los medicamentos en muchos cánceres. A su vez, se cree que ROR1, vía AKT, podría promover la progresión tumoral favoreciendo la **transición epitelial-mesenquimal** (TEM). TEM es un programa celular reversible en qué las células cancerosas pierden sus características adhesivas y epiteliales, adquiriendo mayor motilidad y un fenotipo mesenquimatoso, el cual impulsa la diseminación del tumor. ROR1 promueve TEM regulando positivamente, mediante mecanismos desconocidos, la expresión de varios marcadores de la TEM como N-Caderina, VIM (*Vimentin*), SNAI1/2 (*Snail family transcriptional repressor 1 and 2*), y ZEB1 (*Zinc finger E-box Binding homeobox 1*).

En resumen, la activación de AKT por ROR1 se asocia con características celulares que promueven la malignidad, como aumento de la **proliferación** y **supervivencia** celular, disminución de la **apoptosis** y con procesos que favorecen la **invasión** celular, como la adhesión celular, motilidad y migración (**Fig.11**) (198).

Otras vías, relevantes en cáncer, asociadas a ROR1 son las tres vías **MAPKs** principales, **ERK**, **JNK** y **p38**. La activación de la vía **ERK** es un sello distintivo del cáncer y está implicado en varios procesos, incluida la proliferación celular y supervivencia, motilidad e invasión, y quimiorresistencia; si bien no se ha confirmado formalmente su participación como efector de la señalización de ROR1, muchos de los procesos mencionados junto con participantes río arriba y abajo de ERK se asociaron también con ROR1 (198). ROR1 induce la fosforilación de MEK1/2 vía GRB2 (*Growth Factor Receptor Bound Protein 2*)-Ras, activando a ERK por fosforilación. ERK, además puede ser activado por un complejo formado por DOCK2 y GRB2 y por RAC1/2 vía DOCK2. Seguidamente, vía ERK, ROR1 promovería la activación, por forforilación de RSK1 (RPS6KA1, *Ribosomal Protein S6 Kinase Alpha-1*) y CREB (**Fig. 11**). Las otras dos vías principales de MAPK, JNK y p38, se activan principalmente por factores ambientales y estrés genotóxico. ROR1 activa a **JNK** aumentando su fosforilación y la de c-Jun e inhibe a p38 (**Fig.11**) (198). Las enzimas **p38** son efectores críticos sobre las respuestas involucradas en supervivencia celular, destino celular y apoptosis después del estímulo estresante. ROR1 inhibe la fosforilación de p38 inhibiendo la fosforilación de ASK1 (en T845) y por consiguiente la fosforilación de MKK3/6. De esta manera ROR1, al inhibir la vía p38, promueve el **crecimiento celular** (**Fig. 11**).

También se ha descripto que ROR1 activa la vía **Hippo**, la cual está implicada en la regulación de la proliferación celular, tumorigénesis, quimiorresistencia y metástasis en cáncer. ROR1 aumenta la expresión y localización nuclear de YAP/TAZ, principales efectores de dicha vía, al inhibir la acción de LATS1/2 (*Large Tumor Suppressor kinase 1/2*) (**Fig.11**) (198). ROR1 activa a YAP y sus genes blancos, vía inhibición de LATS1/2, por activación de RHOA o al interactuar con ERBB3 por unión con el ligando NRG1 (*Neuregulin-1*) e inducir la metilación de MST1. Estos eventos conducen a la diferenciación de osteoclastos y la reabsorción ósea inducidas por células cancerosas. Cabe mencionar, que la vía Hippo ha sido

descubierta como efectora de ROR1 en células cancerosas recientemente, por lo que requiere de mayores estudios para esclarecer los procesos celulares involucrados.

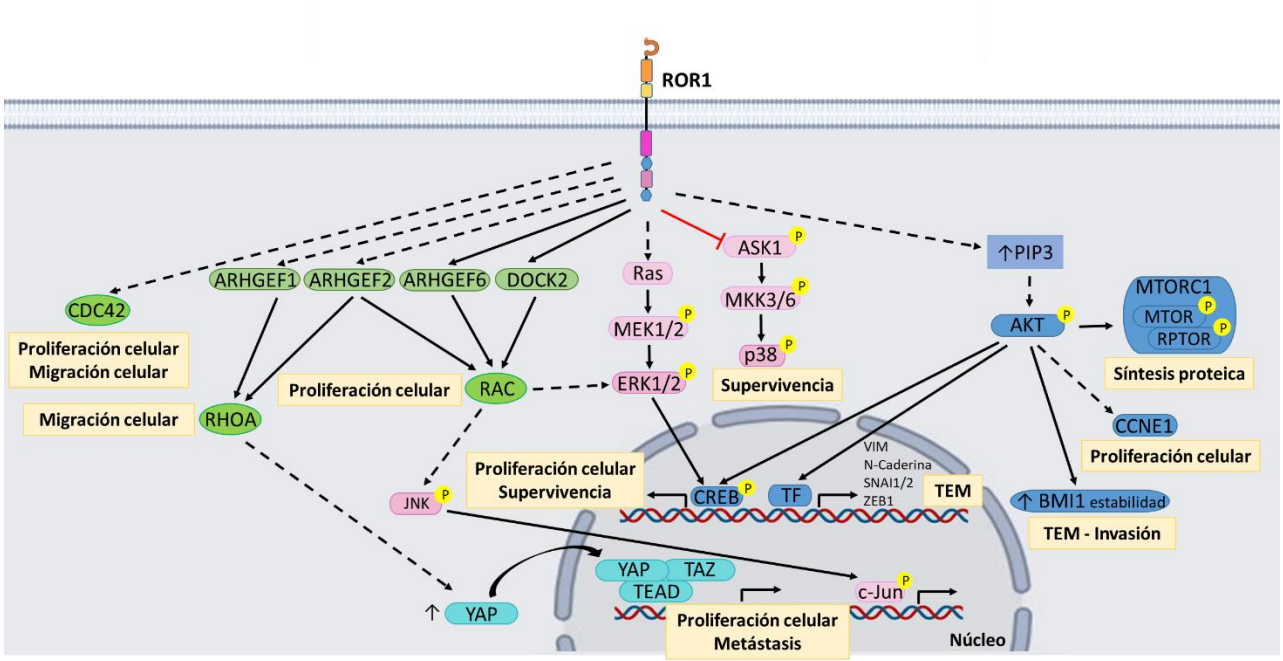


Fig. 11. Vías de señalización activadas por ROR1 en cáncer. *Las vías de señalización de RhoGTPasas (verde), PI3K/AKT (azul), Hippo (magenta) y de las MAPKs (lila) MEK/ERK, JNK y p38 son activadas por ROR1 en cáncer. En línea continua se representa regulación directa y en línea punteada regulación no directa, con intermediarios.*

1.3.3.1 ROR1 regula a STAT3 y NF-κB en cáncer

Se ha descripto que ROR1 activa la vía de **STAT3** en distintos tipos de cánceres, como en mesotelioma pleural maligno y distintos tipos de leucemias (198).

En respuesta al estímulo WNT, SRC se activa al unirse a DVL2 y fosforilarse en Y416, desencadenando la fosforilación de FZD2. SRC es una importante quinasa de STAT3, así que una vez activa induce la fosforilación, y por ende activación, de dicho FT. Una vez activo, STAT3 puede translocar al núcleo y ejercer su actividad como FT. Cabe mencionar que entre los blancos transcripcionales de STAT3 se encuentran tanto WNT5A como ROR1, estableciendo un circuito de retroalimentación positiva (**Fig. 12**). Se ha reportado a ROR1 como blanco transcripcional de STAT3 en LLC, cáncer de pulmón de células no pequeñas y adenocarcinoma gástrico (198). Esta regulación genera un circuito de retroalimentación positiva entre ROR1, WNT5A y STAT3 (**Fig. 12**) (198).

Además de la activación directa arriba mencionada, STAT3 puede ser activado, más tardíamente, también por ROR1, de una manera indirecta por la vía NF-κB (*Nuclear Factor-κB*), mediante la secreción de IL6 (**Fig. 12**) (198). Esta doble activación de STAT3 por parte de

ROR1 resulta muy interesante, ya que indica que puede mediar tanto efectos a corto plazo (por medio de su activación directa) como también inducir efectos a largo plazo al promover los circuitos de retroalimentación positiva (tanto el correspondiente a NF-κB-IL6 como el de WNT5A-ROR1) (**Fig. 12**).

ROR1 activa a **NF-κB** al estimular con WNT5A en muchos tipos de tumores (198), incluido el melanoma (199). NF-κB es un dímero conformado por dos subunidades (por ejemplo, p50 y p65), que está retenido en el citoplasma por la interacción con la proteína inhibitoria IκBα (*Inhibitor of kappa B*). Bajo el estímulo de WNT5A, ROR1 induce la fosforilación de IKK (*IκB Kinase*) y la degradación del inhibidor IκBα, ya que su fosforilación es una señal para su ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma. De esta manera ROR1 induce la liberación y translocación al núcleo del NF-κB, mediante la fosforilación en su subunidad p65, donde ejercerá su función biológica como FT (**Fig. 12**). Entre los genes inducidos por NF-κB vía ROR1 se encuentra IL6, CCL2, CCL3/4 y CXCL1. Otros genes cuya expresión está regulada por ROR1 y NF-κB son ciertos miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, como BCL2, BCL-XL y MCL1. Todo esto pone en evidencia que a través de la activación de la vía NF-κB, ROR1 puede regular procesos inflamatorios en el microambiente tumoral y suprimir la apoptosis en las células tumorales.

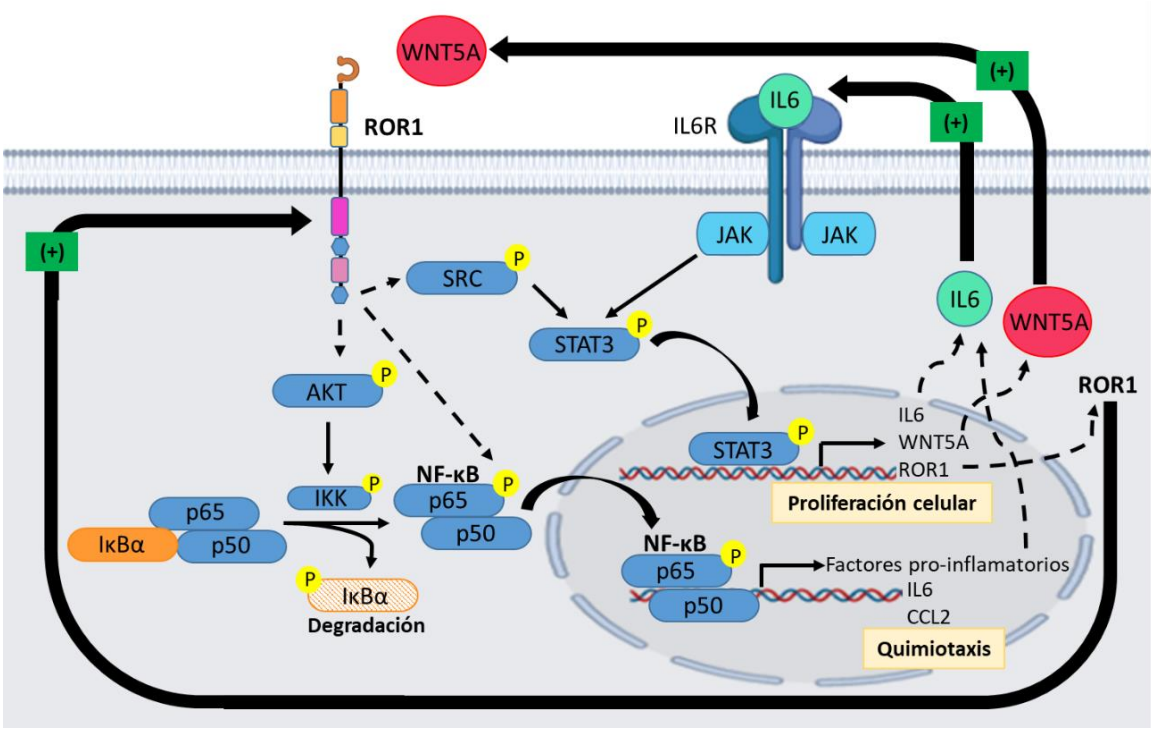


Fig. 12. Vías de señalización ROR1-NF-κβ y ROR1-STAT3 en cáncer. *ROR1 induce la fosforilación de AKT, el cual a su vez induce la fosforilación de IKK. IKK fosforila y activa la subunidad p65 de NF-κB. p65 se encuentra retenido en el citoplasma mediante la interacción con IκBα, la cual también es un sustrato para IKK. IκBα es fosforilado por IKK y así marcado para la ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma, permitiendo así la translocación nuclear del complejo NF-κB. ROR1 también promueve fosforilación de SRC que da como resultado la fosforilación, activación y translocación nuclear de STAT3. Una vez activados, STAT3 y NF-κB ejercen su actividad como FTs, que inducen la expresión de diferentes genes blanco. NF-κB induce la transcripción de factores proinflamatorios (como IL6) y factores quimiotácticos (como CCL2), mientras que STAT3 induce la transcripción de proteínas asociadas con la proliferación celular, IL6, WNT5A y ROR1. IL6 se secreta y estimula aún más a STAT3 activando la señalización IL6R/JAK (símbolo +). El aumento de la expresión de WNT5A y ROR1 promueve un circuito de retroalimentación positiva (símbolo +). Adaptada de Quezada y Lopez-Bergami, 2023.*

1.3.4 Rol de ROR1 en cáncer

Como se mencionó anteriormente, una regulación aberrante de la vía Wnt contribuye al desarrollo y la progresión de muchos cánceres. En la misma línea, la expresión desregulada de ROR1 se ha asociado con varias características celulares que promueven la malignidad, como proliferación celular, supervivencia, disminución de la apoptosis y migración/invasión. Tanto es así que la mayoría de los estudios realizados hasta el momento identificaron a ROR1 como un oncogén. En este sentido, ROR1 ha sido propuesto como nuevo marcador pronóstico en cáncer de ovario (200), pulmón (201), mama (202) y colon (203). En esta sección, se hará foco en los procesos celulares regulados por ROR1 en cáncer.

ROR1 desempeña un papel importante en la **supervivencia** de las células cancerosas al promover la **proliferación** y, al mismo tiempo, promover un efecto **anti-apoptótico**. Esto no solo se ha observado en varios estudios *in vitro* en líneas celulares tumorales, sino que también se confirmó en estudios de xenoinjertos *in vivo* (166), mostrando ser de vital importancia la vía de AKT. De manera concordante, ROR1 demostró ser regulador del **ciclo celular**, al influir en dos importantes reguladores de dicho proceso biológico (CDK4 y CCNE1) (204). Cabe mencionar que los estudios realizados mostraron que el efecto de ROR1 sobre la proliferación y la apoptosis requirió la fosforilación de su dominio PRD (144), sugiriendo una activación de ROR1 dependiente de la señalización río abajo.

En cuanto a su rol en la supervivencia celular, ROR1 regula importantes factores anti-apoptóticos (BCL2 y BCL-XL) y pro-apoptóticos (BAK, caspasa-3 y caspasa-7) críticos fomentando la actividad **anti-apoptótica** (204). Otros mecanismos que podrían contribuir al rol de ROR1 en la supervivencia son su efecto en la disminución de la actividad de **p53** (205) y la **autofagia** (204). Además, más recientemente, se observó que ROR1 podría no solo promover la supervivencia celular mediante la regulación de factores pro-mitóticos, sino también mediante el control de estructuras celulares implicados en la señalización a favor de la supervivencia. Se observó que ROR1, interactuaba con CAV1, Cavin-1 y Cavin-3, y siendo necesario para la correcta formación de caveolas, la endocitosis dependiente de caveolas y la inducción de respuestas de señalización (206,207). Lamentablemente los estudios en estos procesos en particular son escasos y requieren mayor investigación para comprender el papel de ROR1 en estos mecanismos y en el contexto general del cáncer.

De la mano de su rol en la supervivencia celular, ROR1 favorece la **resistencia a la terapia** contra el cáncer ejerciendo una regulación positiva en líneas celulares de cáncer **quimiorresistentes** como en tejidos derivados de pacientes luego de aplicada la quimioterapia o terapia dirigida (166). Cabe mencionar que, en todos los modelos de líneas celulares y células primarias, la eliminación de ROR1 mejoró la sensibilidad a varios inhibidores de moléculas pequeñas en uso clínico actual. Todo esto, hace natural que surja la pregunta de cómo ROR1 puede mediar la resistencia a la terapia. Hay varios mecanismos implicados (166):

- ROR1 induce las vías de PI3K/AKT, MEK/ERK y NF-κB.
- ROR1 regula positivamente la expresión de la translocasa dependiente de ATP ABCB1, una bomba de eflujo de múltiples fármacos que facilitan la exportación de fármacos desde las células cancerosas.
- la sobreexpresión de ROR1 se ha asociado con **células madre cancerosas resistentes** al tratamiento, donde el receptor fue asociado a distintos marcadores de células madres cancerosas como BMI1, NANOG, SOX2, etc.

Por otra parte ROR1 está asociado con cánceres altamente malignos dado que está implicado, como ya se mencionó en la sección anterior, en la **motilidad**, **TEM - invasión** y **metástasis**, lo cual fue observado en muchos estudios clínicos de pacientes con cáncer (166). ROR1 regula la **adhesión celular** (208) y permite estimular el potencial migratorio y

quimiotaxis dirigida por CXCL12/CCL19 (166). Se ha observado en varios modelos de tumores sólidos *in vitro* que ROR1 induce la **migración/invasión** celular, incluidos el sarcoma de Ewing, glioblastoma, mesotelioma, cáncer de mama, cáncer de ovario y melanoma (166). Su función pro-migratorias e invasivas ha sido asociada con la TEM, por ejemplo, como vimos anteriormente, que ROR1 vía AKT induce la transcripción de distintos factores mesenquimales como SNAIL1/2, ZEB1 y VIM. Una razón por la que ROR1 está estrechamente asociados con el programa TEM es debido a que su expresión se encuentra bajo control de FTs claves TEM, un ejemplo es el caso de TWIST (209). De todos modos, cabe mencionar que en el caso de carcinoma hepatocelular, ROR1 se asoció más con un fenotipo epitelial que con uno mesenquimatoso, lo que indica que podría desempeñar un papel opuesto aquí (210). Más estudios serán necesarios para dilucidar la razón de este resultado discrepante.

Otro punto interesante, aunque requiere de mayor estudio, es que ROR1 posee una potencial señal de localización nuclear en su dominio yuxtamembrana que podría provocar su translocación al núcleo (191). Al expresar ROR1 en el núcleo, este actuó como un modulador transcripcional (induciendo la expresión de EZR, RDX, SOS y CALD1, cuatro genes asociados con reordenamientos del citoesqueleto), que desencadenó la formación de una gran cantidad de fibras de estrés y promovió la migración celular (211). Sin embargo, aún no está claro qué papel desempeña ROR1 en el núcleo ni que factores de interacción podrían mediar su efecto. Cabe también mencionar que hasta el momento no se han reportado trabajos que informen una tinción nuclear de ROR1. Una razón podría ser que la isoforma nuclear sufra escisión y no sea detectada por los anticuerpos que en su mayoría están dirigidos contra el dominio extracelular.

1.3.4.1 Rol de ROR1 en melanoma

En melanoma, se observó que ROR1 se sobreexpresa tanto en líneas celulares como en muestras de pacientes (208).

ROR1 aumenta la **proliferación** celular en melanoma, y concordantemente regula positivamente a AKT (208). Además, ROR1 disminuye la **adhesión celular** y aumenta la **motilidad** y **migración** celular, al mismo tiempo que regula positivamente la actividad de RHOA/C (208) e induce la expresión de marcadores mesenquimales, como N-cadherina y Vimentina favoreciendo la **TEM** (208). Cabe mencionar que otro trabajo de investigación sobre melanoma reportó que ROR1 estaba asociado a un fenotipo poco invasivo, y que su eliminación aumentó la invasión *in vitro* así como la metástasis *in vivo* (212). Sin embargo, este resultado divergente podría deberse a la regulación positiva simultánea de ROR2/WNT5A, resultando un efecto compensatorio. Por otra parte, se ha observado que al estimular con WNT5A ROR1 induce la activación de NF-κB en líneas celulares de melanoma (199).

Interesantemente, en pacientes, se lo asoció a una menor Sobrevida Post-Recurrencia (208).

Por todo esto, resulta lógico pensar en ROR1 como un marcador de mal pronóstico en melanoma.

1.3.5 ROR1 como blanco terapéutico

Dadas las importantes vías de señalización y procesos celulares que regula ROR1, y que su expresión principalmente se circunscribe al tejido maligno, ROR1 se presenta como un blanco molecular ideal para la terapia contra el cáncer. Dada la heterogeneidad de cada tipo tumoral, la terapia dirigida que se ajuste a cada paciente (terapia personalizada) y el descubrimiento de nuevos blancos moleculares es de suma relevancia. Actualmente se están desarrollando diferentes enfoques, de **terapia dirigida**, para apuntar contra ROR1, por lo que en esta sección se discutirán las distintas estrategias de tratamiento anti-ROR1 que se encuentran disponibles, las cuales se resumen en la **Fig. 13**. A grandes rasgos, los distintos enfoques de terapia dirigida pueden dividirse en inmunoterapias, vacunas terapéuticas y moléculas pequeñas inhibitorias.

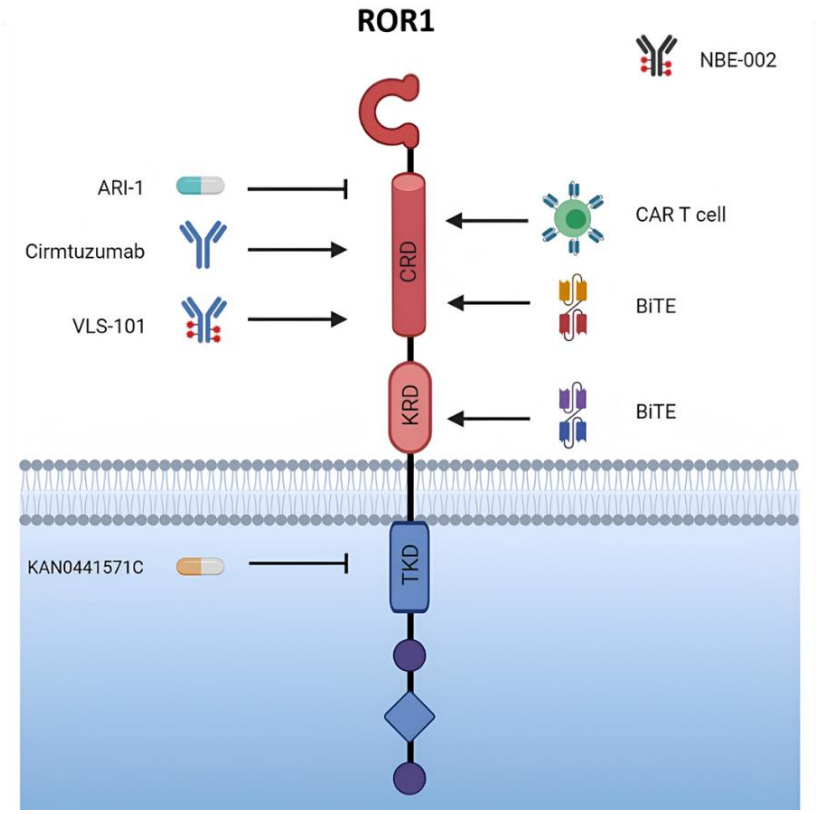


Fig. 13. Enfoques en terapia dirigida contra ROR1. *KAN0441571C funciona como un inhibidor de la actividad tirosina quinasa de ROR1. ARI-1, se une al CRD de ROR1. Cirmtuzumab inhibe a ROR1 uniéndose a su CRD y es el más avanzado en la clínica. Otras opciones inmunuterapéuticas basadas en anticuerpos comprenden VLS-101 y NBE-002, conjugados de fármaco-anticuerpo, o anticuerpos biespecíficos como ROR1 CD3 o NBE-002. ROR1 también es un blanco atractivo para receptores de antígenos quiméricos de células CAR-T. Adaptada de Menck y col. 2021.*

Un primer enfoque inmunoterapéutico a analizar consiste en el uso de **anticuerpos monoclonales** humanizados (**mAbs**), los cuales inhiben la señalización río abajo ya que bloquean la interacción ligando-receptor. El primer mAb contra ROR1 en darse a conocer fue cirmtuzumab, el cual se une al dominio extracelular de ROR1 con alta afinidad y especificidad (213). Se ha evaluado la seguridad de cirmtuzumab en ensayos clínicos de fase I y II (214) en neoplasias malignas hematológicas de células B, donde ha sido identificado como un marcador tumoral, y luego en tumores sólidos que expresan ROR1, como es el caso del cáncer de mama. El primer ensayo de fase I (NCT02222688) probó cirmtuzumab en pacientes con LLC en recaída, donde se observó que es bien tolerado, posee un limitado número de efectos adversos y no se le describió toxicidad limitante de la dosis, además se pudo ver una regulación negativa de los efectos asociados a la señalización de ROR1 detectable durante unos seis meses antes de que se produjera un aumento (214). Al evaluar el campo de los tumores sólidos caracterizados por una sobreexpresión de ROR1, una de las enfermedades malignas con mayor necesidad de nuevas terapias es el cáncer de mama. Se ha demostrado que cirmtuzumab inhibe el reinjerto de células de cáncer de mama y la formación de metástasis pulmonar en un modelo de ratón (215). En un ensayo de fase Ib de cirmtuzumab en combinación con paclitaxel realizado en pacientes con enfermedad metastásica, local avanzada o irresecable de cáncer de mama (NCT02776917) mostró que los pacientes tuvieron una enfermedad estable con mejor respuesta tumoral (216). Por otra parte, se ha probado el uso de este mAb en combinación con otras terapias. Se realizaron varios ensayos con cirmtuzumab en combinación con el inhibidor de BTK ibrutinib *in vitro* y en ratones (217). Ambos agentes inhiben vías asociadas con la señalización constitutiva de BCR, importante para la proliferación de células leucémicas. Un estudio de fase Ib/II (NCT03088878) investigó la seguridad y efectividad del tratamiento con esta combinación en pacientes con neoplasias linfoides de células B y se observó, concordantemente una buena tolerabilidad, sin toxicidad limitante de la dosis y una eficacia aceptable (218).

Entre otras opciones inmunoterapéuticas, se encuentran las opciones que buscan activar la respuesta inmune humoral contrarrestando así el crecimiento tumoral, como los anticuerpos conjugados, anticuerpos biespecíficos, y células CAR-T.

Los **anticuerpos conjugados** (**ACs**) son anticuerpos combinados a alguna droga/fármaco que una vez dada la interacción con el antígeno tumoral permite la liberación del fármaco en la célula tumoral. El mAb Cirmtuzumab fue conjugado uniéndolo al agente antineoplásico monometil auristatina E (MMAE); y dos ACs fueron desarrollados en paralelo VLS-101 y cirmtuzumab—ADC-7 (166). Cirmtuzumab—ADC-7 provocó remisión completa en células de LLC y linfoma de células del manto positivas para ROR1 en ensayos *in vivo*; y al probarlo en combinación con venetoclax se observó un importante efecto sinérgico. En el síndrome de Richter's, una rara complicación de LLC que lo convierte en más agresivo, VLS-101 mostró una alta especificidad por ROR1 al alcanzar células tumorales en sangre periférica, médula ósea y bazo, conduciendo a una regresión significativa de la enfermedad y a una mayor supervivencia del paciente (219). VLS-101 fue probado en un ensayo clínico de fase I (NCT03833180), donde se observó que este anticuerpo conjugado presenta un perfil de

seguridad tolerable y una actividad antitumoral prometedora en pacientes con distintos tipos de linfomas tratados previamente (220). Otro anticuerpo conjugado alternativo contra ROR1 es NBE-002, conjugado a antraciclina, este anticuerpo mostró citotoxicidad en distintos tumores sólidos y se observó un efecto más fuerte en células de cáncer de mama triple negativo (221).

Los **anticuerpos biespecíficos** (**biAbs**) son anticuerpos que pueden unirse a dos antígenos distintos al mismo tiempo. Un subtipo de biAbs son los BiTEs (*Biespecific T cell-Engager*), que permiten poner en contacto LTs con células tumorales que provocan la activación del LT y la destrucción de la célula tumoral, dado que poseen una región que reconoce específicamente al CD3 del LT y otra que reconoce a un antígeno de células tumorales (222). Se ha desarrollado un BiTE contra un epítope presente en el KRD de ROR1, proximal a la membrana (223), y se demostró (*in vitro* e *in vivo*) que presenta mayor actividad que biAbs que se unen a un epítope distal de la membrana, ya que facilita la formación de la sinapsis inmunológica citotóxica y la agrupación de receptores (224). Por otra parte, los BiTEs dirigidos contra el CRD de ROR1 presentaron mayor citotoxicidad contra varias líneas de células tumorales que dirigido contra el dominio Ig-like (225).

Otra forma de inducir la activación de la respuesta humoral por parte del sistema inmunológico en terapias antineoplásicas es con **células CAR-T**. Estas células son células T modificadas diseñadas para transportar receptores específicos de antígenos tumorales, en este caso para ROR1, dirigiendo así la célula T hacia la célula tumoral. Luego de la unión receptor-antígeno tumoral, la célula CAR-T se activa y ejerce su actividad citotóxica sobre la célula maligna. Las células CAR-T contra ROR1 lograron resultados preclínicos prometedores ya que se reportó su efectividad en modelos de cultivo celular tridimensionales de cáncer de pulmón y de mama. Sin embargo, este tratamiento mostró signos de agotamiento después de un corto período de tiempo, lo que podría ser superado por un segundo refuerzo (226). También mostraron eficacia en modelos de xenoinjerto de distintos sarcomas de alto riesgo (227). Un estudio de fase I con células CAR-T ROR1 (NCT02706392), que incluye pacientes con distintas neoplasias no arrojó resultados relevantes, dado que las células CAR-T no pudieron penetrar en el tumor (228). Otros ensayos clínicos con células CAR-T ROR1 se encuentran previstos (229).

Cabe mencionar que tanto los biAbs, como las células CAR-T, dado su mecanismo de acción, presentan efectos adversos graves, como el síndrome de liberación de citoquinas. Los biAbs precisan la continua administración de fármacos debida a su eliminación constante, lo que permite interrumpir su acción rápidamente en cualquier momento en caso de un evento adverso, contrastando con la expansión incontrolable de células CAR-T *in vivo*. Dado que las células CAR-T pueden proliferar, el efecto anti-neoplásico es persistente durante un período de tiempo más largo como también los eventos adversos. Hasta la fecha, la citotoxicidad en las células sanas representa uno de los principales desafíos de la terapia con las células CAR-T, entre otras razones porque requiere un antígeno adecuado y con una alta selectividad hacia células malignas (166).

Un enfoque alternativo en la inmunoterapia contra el cáncer es la **vacunación** terapéutica. En un estudio preclínico, una vacuna contra ROR1 en cáncer de ovario que expresa ROR1 indujo una alta inmunogenicidad y eficacia profiláctica (230). Aunque ROR1 podría servir como un antígeno tumoral prometedor con alta inmunogenicidad, las vacunas terapéuticas contra el cáncer aún enfrentan los desafíos de superar la inmunosupresión inducida por el cáncer y provocar una respuesta inmune adecuada (166).

Otro enfoque terapéutico involucra a las **moléculas pequeñas inhibitorias (MPIs)**, estas drogas de bajo peso molecular inhiben a su blanco por interacción. KAN0439834, la primer MPI anti-ROR1 diseñada, inhibe la fosforilación del TKD de ROR1 bloqueando así su señalización río abajo e induciendo apoptosis en células de LLC ROR1 positivas (231). Resulta interesante mencionar que en comparación con los efectos antitumorales de otros inhibidores comúnmente aplicados en el tratamiento de LLC, KAN0439834 alcanzó niveles similares de inducción de apoptosis que venetoclax (inhibidor de BCL2) y fue más eficaz que ibrutinib (inhibidor de BTK) e idelalisib (inhibidor de PI3K). Este compuesto fue también probado en el cáncer de páncreas, donde se probó su eficacia para inducir apoptosis en células tumorales dando niveles similares a erlotinib (inhibidor de EGFR) (232). A nivel molecular, KAN0439834 inhibe la fosforilación de PI3K/AKT/MTOR/CREB y SRC, tanto en LLC como en cáncer de páncreas (231,232), bloqueando así las principales vías de supervivencia inducida por ROR1. Otra MPI anti-ROR1 desarrollada, similar a KAN0439834, es KAN0441571C, solo probada en linfoma difuso de células B grandes, donde obtuvo inhibición de la señalización río abajo de ROR1, una mayor citotoxicidad que con KAN0439834 y con ibrutinib, y similar a con venetoclax (233). Por su parte, ARI-1 es una MPI que se une al dominio extracelular CRD de ROR1 (234), bloqueando la señalización río abajo vía PI3K/AKT/MTOR, inhibiendo así la proliferación y migración de células positivas a ROR1 en cáncer de pulmón de células no pequeñas. Cabe mencionar que tanto KAN0439834 como KAN0441571C se destacaron como posibles estrategias de terapias combinadas, dado que KAN0439834 con erlotinib mostró claros efectos aditivos (232), y KAN0441571C con venetoclax resultó en la muerte casi completa de las células tumorales (233).

Todas estas estrategias terapéuticas han representado importantes avances y podrían ser la respuesta para contrarrestar la acción de las células cancerígenas (235), tanto por sí solas o en diferentes esquemas de terapias combinadas según las particularidades de cada paciente.

1.4 Apoptosis

La **muerte celular** es un proceso fisiológico normal en el desarrollo de los organismos, que involucra el cese de las funciones vitales de una célula. Puede ser el resultado del proceso natural por el cual las células viejas mueren y son reemplazadas por otras nuevas, o puede resultar de factores tales como alguna enfermedad, una lesión localizada o la muerte del organismo del cual las células son parte. La clasificación tradicional en apoptosis,

necrosis y autofagia, como las tres únicas formas de muerte, es una clasificación morfológica histórica que, si bien todavía se emplea ampliamente, adolece de múltiples limitaciones. En la actualidad, el enorme avance de la ciencia en este campo ha permitido caracterizar nuevos mecanismos de muerte celular. Desde el año 2005, el *Committe on Cell Death* (NCCD) (236), se encarga de elaborar informes con el objetivo de unificar criterios y formular definiciones que describen las distintas modalidades de muerte celular. En el año 2018 el NCCD publicó la última actualización de la clasificación (237), en función de aspectos mecanísticos, genéticos, funcionales y bioquímicos de los más de diez tipos de muerte celular. El informe mantiene la clasificación en dos grupos diferentes de muerte celular: accidental y regulada. La muerte celular accidental, se caracteriza por una muerte instantánea, catastrófica e imprevista. En cambio, la muerte celular regulada, involucra una maquinaria molecular específica codificada genéticamente, lo que implica que se puede modular (retrasar o acelerar) por intervenciones farmacológicas o genéticas. Dentro del grupo de muerte celular regulada se incluyen diferentes mecanismos, entre los que se encuentran la apoptosis intrínseca, apoptosis extrínseca, necrosis impulsada por la transición de la permeabilidad mitocondrial, necroptosis, ferroptosis, piroptosis, parthanatos, muerte celular entótica, muerte celular NETótica, muerte celular dependiente de lisosomas, muerte celular dependiente de autofagia y muerte celular inmunogénica.

La **apoptosis** es uno de los mecanismos de muerte celular más ampliamente estudiado. Es un fenómeno celular importante y crítico para el desarrollo, la supervivencia y el funcionamiento de los organismos multicelulares (238), y en consecuencia, la desregulación de la apoptosis es comúnmente asociado con una amplia gama de enfermedades, que van desde el cáncer hasta trastornos degenerativos (239). Puede ser inducida por dos vías de señalización distintas pero que están interconectadas: la vía intrínseca y la vía extrínseca. Las caspasas son actores cruciales en la apoptosis; estas son proteasas que poseen cisteína en su sitio catalítico y que reconocen aspártico en el sitio donde atacarán con su actividad de proteasa (de allí su nombre Cisteína-ASPártico proteASAS). Las caspasas en su estado inactivo (procaspasa) pueden ser activadas por otras caspasas activas, pasando a su forma activa (caspasa), al clivar su prodominio (**Fig.14**).

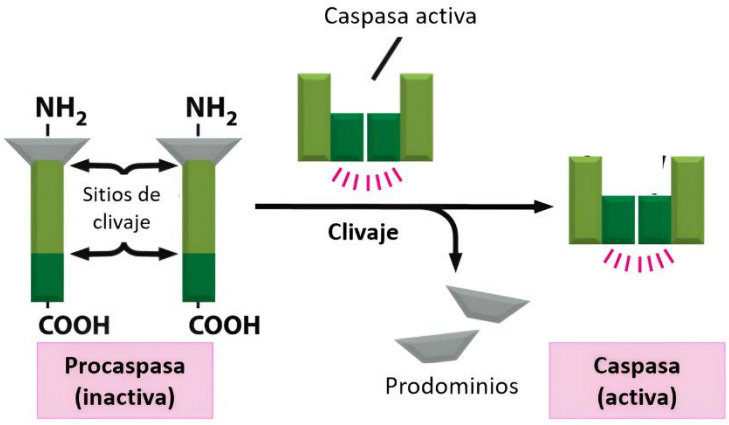


Fig. 14. Activación de caspasas. *Adaptada de Garland Science 2008.*

Tanto la vía intrínseca como la extrínseca activan caspasas iniciadoras induciendo eventos que promueven su dimerización y autoclivaje en *trans*. Estas a su vez activan a las caspasas efectoras, que están presentes en forma inactiva en las células y se activan por el clivaje de las caspasas iniciadoras. La acción de las caspasas efectoras produce las características morfológicas típicas de la apoptosis, como la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN, la exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática y la formación de cuerpos apoptóticos que poseen contenidos de la célula encerrados dentro de una membrana (**Fig. 15**) (240). En la presente tesis se hará foco en la apoptosis intrínseca, la cual será desarrollada a continuación.

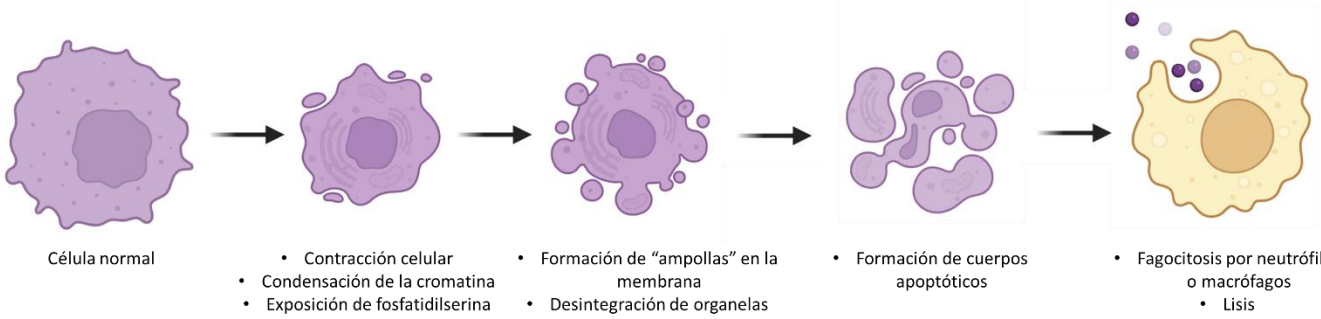


Fig. 15. Cambios celulares durante la apoptosis.

1.4.1 Vía apoptótica intrínseca

La vía apoptótica intrínseca o mitocondrial se desencadena en respuesta a varias perturbaciones internas y externas a la célula (241). La misma se puede activar por la exposición a patógenos (como hongos, bacterias o virus), por el tratamiento con estímulos dañinos como los fármacos quimioterapéuticos, el aumento de ROS, las neurotoxinas, el estrés replicativo, las perturbaciones en el citoesqueleto, el estrés del retículo endoplasmático y los defectos mitóticos. El paso crítico para la apoptosis intrínseca es la permeabilización irreversible y extendida de la membrana mitocondrial externa (MME), la cual se encuentra controlada por la familia de proteínas Bcl-2.

Las proteínas de la familia Bcl-2 comparten de uno a cuatro regiones de homología Bcl-2 (BH) (es decir, BH1, BH2, BH3 y BH4), según la homología de secuencia con la del miembro fundador BCL2. Estos dominios median las interacciones entre los distintos miembros de la familia (**Fig. 16**). Hay al menos 20 proteínas de la familia Bcl-2 que se clasifican en tres subfamilias. La subfamilia de proteínas **anti-apoptóticas** está conformada por BCL2, BCL-XL/BCL2L1, BCL-W/BCL2L2, MCL1, BFL1/BCL2A1 y BCL2L10; la subfamilia de ***BH3-only* pro-apoptóticas** conformada por BAD, BID, BIK, Bim/BCL2L11, BMF, HRK, NOXA, PUMA/BBC3, etc.; y finalmente la subfamilia de **ejecutores pro-apoptóticos** o formadores de poros conformada por BAX, BAK1 y BOK. Las proteínas anti-apoptóticas y *BH3-only* pro-apoptóticas

compiten para influir en los miembros ejecutores pro-apoptóticos por lo que el balance entre las mismas determinará la sensibilidad de las células a sufrir apoptosis (242).

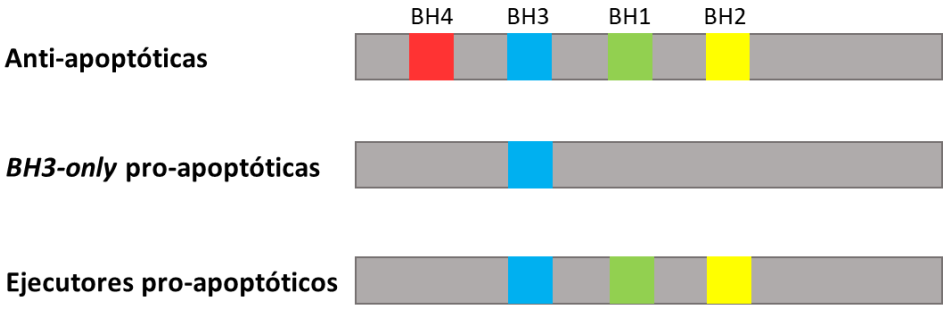


Fig. 16. Regiones de homología de secuencia de las subfamilias que conforman la familia Bcl-2. *La subfamilia anti-apoptótica contiene a los dominios de secuencia BH1, BH2, BH3 y BH4, la subfamilia BH3-only pro-apoptótica a BH3 y la subfamilia de ejecutores pro-apoptóticos a BH1, BH2 y BH3.*

Las proteínas pro-apoptóticas se expresan o activan post-traduccionalmente al perturbarse la fisiología del huésped. Los miembros ejecutores pro-apoptóticos son claves en esta vía, ya que una vez activados translocan a la MME, oligomerizan y producen poros en la MME, provocando así la pérdida del potencial mitocondrial. Estas proteínas están bajo el control tanto de los miembros anti-apoptóticos que inhiben su actividad ya sea directamente tras el secuestro físico en la MME, o indirectamente tras el secuestro de *BH3-only* pro-apoptóticos; como de miembros *BH3-only* pro-apoptóticos que las activan directamente, o antagonizan a las proteínas inhibidoras de la familia Bcl-2. La permeabilización de la membrana mitocondrial provoca la liberación de proteínas apoptóticas que normalmente residen en el espacio intermembrana mitocondrial, entre las cuales se encuentran el citocromo C e IAPs (*Inhibitors of Apoptosis*). En el caso del citocromo C, una vez en el citosol, interacciona con APAF1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor 1*) y la procaspasa-9 formando el apoptosoma. Este último promueve la oligomerización de la procaspasa-9 (caspasa iniciadora inactiva), lo que lleva a su activación por autoclivaje en *trans*, esta a su vez, cliva a las caspasas efectoras 3 y 7 para promover la apoptosis. La liberación de IAPs como SMAC/DIABLO (*Second Mitochondrial Activator of Caspases/Diablo IAP-binding mitochondrial protein*) también contribuye a la activación de la caspasa-9 y las caspasas efectoras, inactivando a XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis*), un inhibidor de la apoptosis (**Fig. 17**) (237).

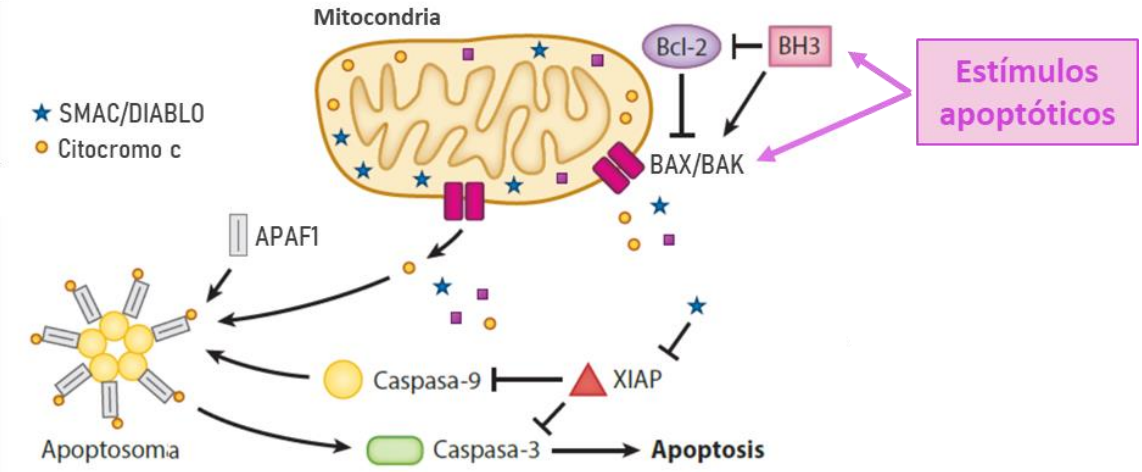


Fig. 17. Esquema simplificado de la vía de activación de la apoptosis intrínseca. Distintos estímulos apoptóticos activan a las subfamilias pro-apoptóticas. *La permeabilización de la membrana externa mitocondrial (es llevada a cabo por los miembros ejecutores pro-apoptóticos como BAX y BAK, y está controlada por el balance entre los miembros BH3-only pro-apoptóticos y anti-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2. Esta acción permite la salida del citocromo C del espacio intermembrana mitocondrial al citosol donde se une a la proteína APAF1 y a la procaspasa-9 formando el apoptosoma, lo que provoca la activación de caspasas ejecutoras y desencadena la apoptosis. Adaptada de Danthi, 2016.*

Como se mencionó más arriba, distintos agentes quimioterapéuticos usados contra el cáncer, funcionan como inductores de la apoptosis intrínseca, como el cisplatino (Cis) y la dacarbazina (DAC) (**Fig. 18**). En el caso del Cis, su mecanismo de acción tiene que ver con su capacidad de insertarse en el ADN; y en el caso de la DAC, tiene que ver con su capacidad de alquilar el ADN (74). Así ambos agentes inducen roturas en el ADN promoviendo la activación de p53, arrestando el ciclo celular e induciendo la transcripción de las proteínas *BH3-only* pro-apoptóticas, desencadenando la muerte de las células cancerosas por apoptosis (243).

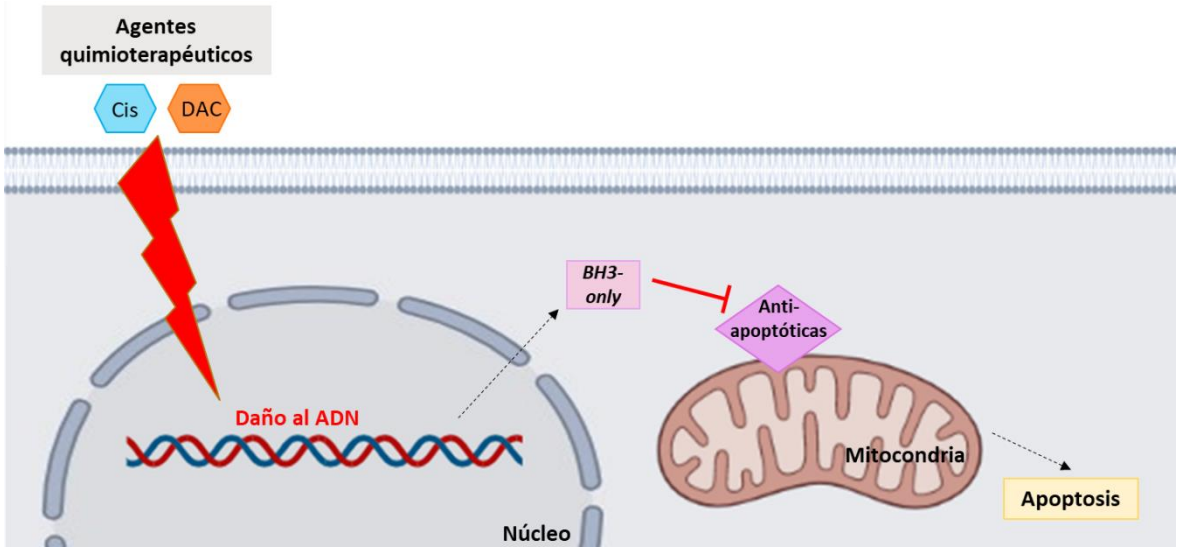


Fig. 18. Apoptosis intrínseca inducida por Cis o DAC. *El Cis y la DAC provocan daño al ADN e inducen daño al ADN aumentando la expresión de proteínas BH3-only pro-apoptóticas, estas inhiben a las proteínas anti-apoptóticas desencadenando la apoptosis. Cis: cisplatino, DAC: dacarabazina.*

1.4.1.1 Proteínas anti-apoptóticas

Los miembros que conforman la subfamilia de proteínas anti-apoptóticas (BCL2, BCL-XL/BCL2L1, BCL-W/BCL2L2, MCL1, BFL1/BCL2A1 y BCL2L10) ejercen distintos roles críticos durante el desarrollo y función del organismo, y las diferencias entre ellos se deben en parte a diferencias en sus patrones de expresión (244). Estas proteínas que fomentan la supervivencia celular, dado que disminuyen la apoptosis, presentan un papel importante en la progresión del cáncer ya que transmiten resistencia a los tratamientos anticancerígenos (245). Por ello resultan blancos terapéuticos atractivos en cáncer ya que su inhibición desencadena la función pro-apoptótica. El estudio de las proteínas anti-apoptóticas en diferentes tipos de tumores, se centró en los miembros expresados con mayor frecuencia, BCL2, BCL-XL y MCL1 (246,247), mientras que el estudio del rol de los otros tres miembros de la familia, BCL-W, BFL1 y BCL2L10 ha sido esporádico. El estudio de estas proteínas en melanoma ha seguido la misma tendencia (248,249). En este trabajo se hará foco en BCL2L10, el miembro más recientemente identificado y menos estudiado de la subfamilia, el cual será desarrollado en la **sección 1.5**.

Una característica muy importante de esta subfamilia, radica en la potencial **redundancia funcional** de sus miembros (250–252), que pueden suplir la ausencia de otro de los miembros. Esto plantea la disyuntiva de que eventualmente sea necesario inhibir la mayoría o todos los miembros de la subfamilia para lograr inducir una apoptosis sostenida. Esta redundancia se encuentra mediada por la capacidad de un miembro Bcl-2 anti-apoptótico para unirse y secuestrar miembros Bcl-2 pro-apoptóticos habitualmente unidos por otro miembro anti-apoptótico. Un ejemplo es el caso de compensación mutua de MCL1 y BCL-XL, donde la carencia de uno de ellos puede ser reemplazado por el aumento del otro, ya que ambos son capaces de secuestrar a los miembros pro-apoptóticos BAK y Bim (250).

Dado su importante papel en la progresión del cáncer, los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 se han estudiado como blancos terapéuticos en tratamientos anti-cancerígenos con el fin de inhibir su función anti-apoptótica. La primer estrategia utilizada fue el uso de **oligonucleótidos anti-sentido** dirigidos contra el ARNm de BCL2 y/o BCL-XL pero sin éxito dado que los ensayos clínicos con estos fármacos fueron discontinuados (246). Más recientemente, se han desarrollado moléculas pequeñas inhibitorias de miembros de esta subfamilia, llamadas **BH3-miméticos**, dado que emulan la función de las proteínas *BH3-only* para matar a las células cancerosas (246). Los BH3-miméticos compiten con proteínas BH3-only por el mismo surco hidrofóbico de las proteínas anti-apoptóticas; y como resultado, las proteínas pro-apoptóticas ya no son inhibidas y pueden promover la liberación y activación de los miembros ejecutores (253,254). Cabe mencionar que estos compuestos pueden tener especificidad por una o más de las proteínas anti-apoptóticas. Actualmente, se están utilizando varios BH3-miméticos (obatoclax, AT-101, ABT-263/navitoclax, APG-1252, AZD0466, venetoclax, S55746, AMG-176, AZD5991 y S64315/MIK665) evaluándolos como agentes únicos o combinados con otros compuestos en ensayos clínicos para un amplio número de tumores, incluido el melanoma, pero solo venetoclax (inhibidor de BCL2) está aprobado hasta el momento por la FDA (246). Dado que los distintos fármacos BH3-miméticos se dirigen a diferentes proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y, como ya se mencionó anteriormente, estas proteínas Bcl-2 son funcionalmente redundantes, cualquier intento racional de inhibirlas idealmente debe comenzar por comprender cuál/es de ella/s se expresa/n en un tipo de tumor y paciente determinado y en qué circunstancias. De lo contrario, estos intentos terapéuticos están destinados a fracasar.

1.5 BCL2L10

BCL2L10 (BCL2 Like 10), también conocido como Bcl-B, NrH, Diva o Boo, es el miembro identificado más recientemente y menos estudiado de la subfamilia anti-apoptótica Bcl-2, por lo que su función es poco conocida (255,256). El gen que codifica para BCL2L10 fue localizado en el cromosoma 15q21.2 (255). Se expresa ampliamente en tejidos humanos sanos y células plasmáticas normales (257), pero también se ha evidenciado en distintos tipos de tumores (257–259).

BCL2L10 se ha clasificado en el grupo anti-apoptótico Bcl-2 ya que contiene los cuatro dominios BH, característica distintiva de dicha subfamilia (255). Sin embargo, se le ha descripto tanto actividades **pro-apoptóticas**, en cáncer de ovario, gástrico y carcinoma hepatocelular (260–264), como **anti-apoptóticas**, en cáncer de mama, pulmón y mieloma múltiple (265–268).

Por otra parte, también se le ha descripto funciones no relacionadas con la apoptosis en cáncer. Como inhibición de la **autofagia** en cáncer gástrico y de cuello uterino (263,269,270), **supresor tumoral**, al regular negativamente la proliferación celular y disminuir la motilidad celular y **angiogenésis**, en cáncer de ovario y carcinoma hepatocelular (261,271).

Se ha descripto un rol dual de BCL2L10 en la sobrevida de los pacientes con cáncer. En algunos canceres correlacionó con un aumento de la sobrevida (en cáncer gástrico y carcinoma hepatocelular) (263,272) y en otros con una disminución (en cáncer de mama, próstata, colorrectal, pulmón y mieloma múltiple) (257,259,273,274). Las razones de estas discrepancias en el papel de BCL2L10 en el cáncer no se han dilucidado.

Hipótesis y Objetivos

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

El trabajo en que se enmarca esta Tesis Doctoral posee dos hipótesis (H):

H1: ***"ROR1 promueve la supervivencia celular inhibiendo la apoptosis en melanoma."***

H2: ***"BCL2L10 promueve la supervivencia celular en melanoma."***

2.2 Objetivos generales y específicos

En base a las hipótesis, se plantearán a continuación los objetivos generales (OG) y específicos (OE) de este trabajo:

- **OG 1:** Evaluar la utilidad de ROR1 como biomarcador molecular en melanoma.
  - **OE 1.2:** Establecer las condiciones óptimas para realizar la inmunomarcación de ROR1 en muestras de melanoma mediante inmunohistoquímica.
  - **OE 1.3:** Determinar la expresión de ROR1 en muestras de pacientes con melanoma por inmunohistoquímica en distintos estadios de la enfermedad.

- **OG 2**: Analizar mediante un análisis bioinformático las funciones de ROR1, en forma comparativa con las de los otros receptores RTKs de WNT5A, ROR2, RYK y PTK7, en melanoma.
  - **OE 2.1:** Identificar genes diferencialmente expresados (DEGs) y procesos biológicos asociados a ROR1, ROR2, RYK y PTK7 en muestras de tumores de pacientes con melanoma.
  - **OE 2.2:** Comparar los procesos biológicos relacionados a ROR1 con los procesos biológicos asociados a los otros receptores RTKs de WNT5A.

- **OG 3**: Determinar el efecto de ROR1 en la apoptosis en melanoma.
  - **OE 3.1:** Generar líneas celulares de melanoma con sobreexpresión y silenciamiento de ROR1.
  - **OE 3.2:** Evaluar el efecto de ROR1 en la muerte celular apoptótica frente a compuestos citotóxicos en melanoma.
  - **OE 3.3:** Evaluar la activación y expresión de proteínas que regulan la apoptosis en melanoma.
  - **OE 3.4:** Evaluar el efecto de ROR1 sobre proteínas apoptóticas.

- **OG 4**: Estudiar la expresión de BCL2L10 en melanoma.
  - **OE 4.1:** Determinar si BCL2L10 se expresa en diferentes líneas celulares de melanoma.
  - **OE 4.2:** Establecer las condiciones óptimas para realizar la inmunomarcación de BCL2L10 en muestras de melanoma mediante inmunohistoquímica.
  - **OE 4.3:** Determinar la expresión de BCL2L10 en muestras de pacientes con melanoma por inmunohistoquímica.
  - **OE 4.4**: Estudiar los mecanismos moleculares que regulan la expresión de BCL2L10 en melanoma.

- **OG 5**: Estudiar el rol de BCL2L10 en melanoma.
  - **OE 5.1:** Generar líneas celulares de melanoma con sobreexpresión y silenciamiento de BCL2L10.
  - **OE 5.2:** Estudiar el efecto y funciones de BCL2L10 sobre la muerte celular en melanoma empleando las líneas celulares generadas.

Materiales y Métodos

3. Materiales y Métodos

3.1 Reactivos y Buffers

Los reactivos empleados para la realización de este trabajo fueron de grado analítico, calidad biología molecular y aptos para cultivo celular dependiendo de su aplicación en los protocolos específicos. El material de plástico fue adquirido de la empresa AP Biotech mientras que las sales y otros reactivos fueron adquiridos de la empresa SIGMA y los ácidos y alcoholes de ANEDRA salvo que se especifique lo contrario.

En el **Anexo A** se especifican y detallan cada una de las recetas de soluciones y buffers que se utilizaron para las distintas técnicas utilizadas.

3.2 Construcciones y Plásmidos

En el **Anexo B** se detallan las características y los mapas de los vectores y plásmidos utilizados en este trabajo.

Para la obtención de la línea celular con sobreexpresión de ROR1 se utilizó un plásmido Vir-SP (**Anexo B.1**). Para el clonado de la secuencia del ADNc de ROR1 se utilizó el sitio NheI (destruido tras la inserción) y XhoI.

Para la obtención de las líneas celulares con silenciamiento de ROR1, se utilizaron dos plásmidos pSUPER.retro.puro (**Anexo B.2**), conteniendo cada uno una de las dos secuencias shROR1 (A y B). Como control del silenciamiento se utilizó una secuencia *scramble*, también clonada en pSUPER.retro.puro. Estos fueron previamente descriptos (208).

Para la obtención de la línea celular con sobreexpresión de BCL2L10 se utilizó el vector pCDNA3-myc (**Anexo B.3**), el cual incorpora un epítope Myc en el extremo N-terminal de BCL2L10, provisto por el Dr. S. Reed, previamente descripto (275).

Para la obtención de las líneas celulares con silenciamiento de BCL2L10, se utilizaron dos plásmidos pLKO.1 (**Anexo B.4**), conteniendo cada uno una de las dos secuencias shBCL2L10 (I y II), clones TRCN0000033595 y TRCN0000033596 diseñados por The RNAi Consortium (TRC) y previamente validados (276). Como control del silenciamiento se utilizó una secuencia *scramble*, también clonada en pLKO.1.

3.2.1 Preparación de bacterias competentes

Se partió de una colonia de bacterias *Escherichia coli sp*. cepa DH5α crecidas en una placa de Petri en medio LB agar. Se inocularon 2 cultivos de 5 ml de LB y se incubaron toda la noche a 37 °C en agitación. Posteriormente se inocularon 4 ml de cultivo saturado en 250 ml de LB suplementado con 20 mM de $MgSO_4$ y se incubó a 18 °C hasta alcanzar una DO_{600} de

0.6. Una vez alcanzada la densidad óptica se colocó el cultivo en hielo y todos los pasos siguientes fueron hechos en un cuarto frío. Se centrifugaron los cultivos a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C. El pellet bacteriano fue resuspendido en 60 ml de buffer TB a 4 °C y se volvió a centrifugar. El pellet obtenido fue resuspendido en 10 ml de buffer TB a 4 °C y agitando suavemente se agregaron 1.5 ml de DMSO. Finalmente, las bacterias se dejaron reposar en hielo durante 10 min para luego ser congeladas en nitrógeno líquido. Las bacterias se guardaron a -80 °C para su posterior uso.

3.2.2 Transformación bacteriana

Bacterias competentes de *Escherichia coli sp*. cepa DH5α fueron descongeladas en hielo. En condiciones de esterilidad se tomaron 30 µl de bacterias y se le adicionaron entre 0.5 - 1 µg del plásmido de interés y se incubó en hielo durante 30 min. Luego, se realizó un shock térmico de 90 seg a 42 °C y rápidamente se volvió a colocar el tubo en hielo por 2 min. Se agregaron 700 µl de LB y se incubó durante 1 hr a 37 °C en agitación. Finalmente, se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm, el pellet fue resuspendido en 50 µl de LB y sembrado en placas de LB agar con ampicilina 100 µg/ml. Las placas fueron incubadas a 37 °C toda la noche hasta la visualización de colonias. Luego se picó una colonia y se colocó en un falcon con 5ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina, por último, se incubó a 37 °C y en agitación a 200 rpm toda la noche.

3.2.3 Purificación de plásmidos

Para la purificación del ADN plasmídico se utilizó un kit de Miniprep de Biosciences (AxyPrep™ Plasmid DNA Purification Miniprep Kit AP-MN-P-250) y se siguieron las instrucciones del fabricante. A grandes rasgos, se tomaron 4 ml de bacterias transformadas crecidas en LB con ampicilina y se centrifugaron 5 min a 5000 rpm. El pellet obtenido fue resuspendido en 250 µl de buffer S1 (Buffer de Resuspensión con ARNasa 100 ug/ml) en hielo. Se agregó 250 µl de buffer S2 (Buffer de Lisis) y se mezcló por inversión 5 veces. A continuación, se agregó 350 µl de buffer S3 (Buffer de Neutralización), se mezcló por inversión 5 veces y la mezcla fue centrifugada a 12000 rpm por 10 min. El sobrenadante se colocó en una columna de unión Axygen y se centrifugó a 12000 rpm por 1 min, el sobrenadante fue desechado. Luego se realizó un lavado con 700 µl de buffer W2 (Buffer de lavado con etanol), se centrifugó a 12000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante. Finalmente se agregó 60 µl de Eluente (previamente incubado a 40 °C), se dejó reposar a Temp. amb. (temperatura ambiente) por 1 min, se centrifugó a 12000 rpm por 1 min y se reservó el sobrenadante.

La concentración se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm de 1 µl de muestra utilizando un GeneQuant Pro (Amersham Biosciences). La integridad del plásmido obtenido se corroboró en un gel de agarosa. Los plásmidos fueron almacenados a -20 °C hasta su uso.

3.3 Cultivos celulares

A lo largo del presente trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares adherentes cedidas gentilmente por el Dr. Zeev Ronai del Instituto Sanford-Burnham, La Jolla, Estados Unidos:

- A375: células epiteliales de melanoma humano, derivada de un Tumor Primario en Estadio Metastásico.
- G361: células epiteliales de melanoma humano, derivada un Tumor Maligno en Estadio Metastásico.
- HEK293T: células epiteliales derivadas de riñón embrionario humano.
- M2: células epiteliales de melanoma humano, derivada un Tumor Maligno en Estadio Metastásico.
- MeWo: células epiteliales de melanoma humano, derivada de una metástasis nodular en Estadio Metastásico.
- SKMel3: células epiteliales de melanoma humano, derivada de una metástasis en nódulo linfático, en Estadio Metastásico.
- UACC903: células epiteliales de melanoma humano, derivada de una metástasis de piel en Estadio Metastásico.
- WM9: células epiteliales de melanoma humano, derivada de una metástasis nodular en Estadio Metastásico.
- WM115: células epiteliales de melanoma humano, derivada de un tumor epitelial en VPG.

3.3.1 Mantenimiento de células en cultivo

Las células fueron crecidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO) suplementado con 10% v/v de Suero Fetal Bovino (SFB, GIBCO), 100 U/ml penicilina – 100 µg/ml estreptomicina (GIBCO). Los cultivos se mantuvieron en placas de 100 o 60 mm de diámetro en una estufa a 37 °C en atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO_2 en el aire. Las líneas celulares se conservaron a -80 °C o en nitrógeno líquido en medio DMEM suplementado con 30% SFB y 5% DMSO.

3.3.2 Métodos de desprendimiento de células adherentes

Las células adherentes fueron desprendidas del material de plástico de las placas donde crecían con tripsina 1X (0.5% Trypsin-EDTA 10X, GIBCO) o acutasa (Accutase™ Cell Detachment Solution, BD Biosciences). Para ello, las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con 1 ml de tripsina 1X o acutasa por 5 min a 37 °C o Temp. Amb., respectivamente. Pasado el tiempo de incubación, la acción enzimática se cortó con el agregado de DMEM 10% SFB.

3.3.3 Generación de líneas celulares estables por transfección

Para la obtención de las líneas celulares estables (de sobreexpresión y silenciamiento) por transfección se utilizó el reactivo comercial METAFECTENE® PRO - DNA & RNA Transfection Reagent de Biontex. A grandes rasgos, siguiendo las instrucciones del fabricante, se plaquearon 5 x 10^5 células en placas de 35 mm en medio DMEM 10% e incubadas a 37 °C y 5% CO_2, 24 hs antes de la transfección. Pasadas las 24 hs, se retiró el medio y se agregó 1 ml de medio DMEM sin suero (s/s) y sin antibiótico (s/A). Luego, a las células se le agregó gota a gota una mezcla 2 µg del DNA de interés/100 µl DMEM s/s + 6 µl METAFECTENE® PRO/100 µl DMEM s/s incubada previamente a Temp. Amb. por 20 min. Las células fueron incubadas por 5 hs a 37 °C y 5% CO_2. Pasado el tiempo indicado se cambió el medio a DMEM 10% y se las incubó a 37 °C y 5% CO_2 por 72 hs.

Para estimar la eficiencia de transfección a las 48 hs de la transfección se observaron las células fluorescentes de las células transfectadas con GFP respecto de las células totales en un microscopio confocal Nikon C1 Plus.

3.4 Muestras de pacientes

Las muestras de pacientes con melanoma fueron cedidas gentilmente por el Hospital Israelita (muestras actualmente en la Universidad Maimónides), el Servicio de Dermatología del Hospital Austral (Dra. Corina Busso) y el Servicio de Patología del Hospital Municipal de Oncología Marie Curie (Dra. Gabriela Acosta Haab). Dichos servicios cuentan con el aval del Comité de Ética de sus respectivas instituciones. El Hospital Israelita otorgó 20 tacos, el Hospital Austral 24 cortes histológicos y Hospital Municipal de Oncología Marie Curie 12 tacos de muestras de pacientes con melanoma. Los tacos conformaban muestras de tumores embebidos en parafina.

Los tacos fueron cortados y montados en portaobjetos con carga positiva por la histotécnica del laboratorio de análisis clínicos del Hospital Universitario de la Universidad Maimónides, Sara Orrea. Todos los cortes histológicos fueron evaluados, previamente al análisis por inmunohistoquímica, por tinción con hematoxilina – eosina en conjunto con la médica especialista en anatomía patológica, Dra. Edith Graciela Illescas.

3.5 Análisis de la expresión proteica

En el **Anexo C** se listan los anticuerpos primarios y secundarios con sus respectivas diluciones, número de catálogo, empresa que los comercializa y condiciones de uso, utilizados a lo largo de esta tesis.

3.5.1 Extracción de proteínas

Los extractos de proteínas se obtuvieron a partir de placas de 35, 60 o 100 mm de diámetro con un 80 - 90% de confluencia. Las placas a cosechar fueron retiradas de la estufa, se les aspiró el medio, se las colocó rápidamente en hielo y se les realizó un lavado con PBS 1X frío. Se agregaron entre 100 - 400 µl de Buffer de extracción de proteínas dependiendo el tamaño de la placa y se colocaron durante 10 min en hielo y agitación. Luego se cosecharon las células con la ayuda de una pequeña espátula de plástico (*scrapper*). Los homogenatos celulares se centrifugaron a 12000 rpm a 4 °C durante 10 min. Los sobrenadantes se transvasaron a un nuevo tubo y se almacenaron a -20 °C.

3.5.2 Técnica de Bradford

La concentración proteica se determinó mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976). Se utilizaron placas de 96 pocillos, donde se colocaron 160 µl de una dilución de la muestra a analizar y 40 µl del reactivo de Bradford de BioRad (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate #5000006). Paralelamente, se realizó una curva de calibración con concentraciones entre 0.4 - 25 µg/ml de albúmina sérica bovina (SIGMA) realizando diluciones seriadas, para calcular la concentración de proteínas de cada muestra a partir de una regresión lineal. Se midió la absorbancia a 595 nm utilizando un lector de microplacas Bioteck Instrument µQuant.

3.5.3 Western Blot

Para realizar la técnica de *Western Blot* (WB), se utilizaron extractos proteicos celulares como indica en **3.5.1**. Luego se realizó la técnica de Bradford, como indica en **3.5.2**, para poder determinar las concentraciones de las muestras, de esta manera se pudo sembrar la misma cantidad de cada muestra en cada WB realizado. Las muestras de extractos proteicos a analizar (30 - 40 µg de proteína) fueron desnaturalizadas en Buffer de Siembra 6X e incubadas durante 5 min a 95 °C. Luego, se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), en donde las muestras fueron concentradas en un Gel Concentrador y se separaron según su peso molecular en un Gel Separador de 10 o 12% según el tamaño de las proteínas a estudiar. En paralelo con las muestras se sembró un marcador de peso molecular (Blue Plus® IV Protein Marker (10 - 180 kDa) DM131-01, TransGen). La electroforesis se llevó a cabo en el sistema de geles de la empresa BioRad a 35 mA por gel en Buffer de Corrida durante 90 - 120 min dependiendo de la concentración de acrilamida utilizada en los respectivos geles utilizados. Luego, las proteínas fueron electro-transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham) a 350 mA en Buffer de Transferencia durante 60 - 100 min. Una vez realizada la transferencia, las membranas fueron teñidas con solución de rojo Ponceau para poder observar el fraccionamiento electroforético. Luego, las membranas fueron sumergidas en Solución de

Bloqueo durante 40 min a Temp. Amb. en agitación constante. A continuación, cada membrana fue incubada con el respectivo anticuerpo primario específico (**Anexo C.1**) en Solución de Bloqueo durante toda la noche a 4 °C en agitación constante. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 min en 0.1% de PBS-Tween y se incubó cada membrana con el anticuerpo secundario correspondiente (**Anexo C.2**) conjugado con la enzima peroxidasa en solución de bloqueo durante 90 min a Temp. Amb.. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados de 5 min con 0.1% de PBS-Tween.

Las membranas fueron reveladas mediante quimioluminiscencia utilizando ECL de Amersham (ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent) en proporción 1:1 luminol:peróxido. La señal fue capturada por exposiciones a diferentes tiempos en un equipo de visualización y documentación de imágenes ImageQuant 350. Las imágenes obtenidas fueron cuantificadas utilizando el programa ImageJ (NIH). La intensidad de cada banda fue normalizada con un gen de expresión constitutiva (*housekeeping*) como control de carga (como actina, vinculina, etc.). El Fold Change (FC) fue calculado relativizando los valores obtenidos al de las líneas celulares o tratamientos control. Para el caso de las bandas de las proteínas fosforiladas, los valores de intensidad de cada banda se normalizaron con sus correspondientes bandas de proteínas totales, imagen obtenida de la misma membrana luego del proceso de remoción (*stripping*) y reincubación con anticuerpos primarios y secundarios.

3.5.4 Inmunohistoquímica

Para realizar la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) se utilizaron cortes histológicos montados en portaobjetos positivados (Microscope Slides, HistoSystem, HDAS001) de muestras de pacientes con melanoma, los cuales fueron incubados previamente a 60 °C toda la noche para una mejor desparafinización. Luego, los tejidos fueron desparafinados con dos pasajes de 15 min por xileno. Luego se realizó un pasaje breve por alcohol etílico absoluto y se incubó en Solución de Bloqueo de la Peroxidasa Endógena (1.5% para la detección de ROR1 y BCL2L10 y 0.5% para p-STAT3) durante 30 min y se realizaron 3 lavados con H_2Od. Luego se realizó la recuperación antigénica, donde se sumergieron las muestras en el buffer correspondiente a baño maría y se colocaron en un microondas por un determinado tiempo, al finalizar se colocó el recipiente con las muestras en el microondas sin baño maría y se dejó entre 1 - 2 minutos hasta que el buffer iniciara su hervor; para la detección de ROR1 y BCL2L10 se utilizó Buffer Citrato 10 mM (pH 6) por 15 min a baño maría en una olla a presión, y para la detección de p-STAT3 se utilizó buffer Tris-EDTA (pH 9) por 21 min a baño maría. Luego, se realizaron 3 lavados con H_2Od y se incubó a las muestras con la Solución de Bloqueo durante 30 min a Temp. amb.. Luego se incubó con la dilución indicada del anticuerpo primario en PBS 1X (**Anexo C.1**) en cámara húmeda, en el caso de ROR1 y BCL2L10 la incubación fue por 1 hr a 30°C y en el caso de p-STAT3 fue por toda la noche a Temp. amb.. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS, se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado del Kit Vector (VECTASTAIN® Elite®

ABC-HRP Kit, Peroxidase (Rabbit IgG) (PK-6101) o VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit, Peroxidase (Mouse IgG) (PK-6102)) y se realizaron otros 3 lavados con PBS 1X. Para el revelado, se utilizó el sustrato 3,3'-diaminobenzidine de Vector (DAB Substrate Kit, Peroxidase (HRP), with Nickel, (3,3'-diaminobenzidine) (SK-4100)). La reacción se detuvo sumergiendo las muestras en H_2Od. A continuación, se llevó a cabo la tinción de contraste con hematoxilina activada (Biopur) durante 1 min. Por último, se deshidrataron los cortes histológicos por pasajes sucesivos en las soluciones crecientes de etanol/agua y xileno, se dejaron secar y se montaron con Bálsamo de Canadá (Biopur).

Los cortes histológicos fueron observados con un microscopio óptico (BX40, Olympus Optical Corporation, Tokio, Japón). Para obtener imágenes digitales de alta calidad se utilizó un dispositivo de captura de imágenes ultracompacto Aperio CS2 (Leica Biosystems) y ScaneScope Console. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa ImageScope. La digitalización permitió la determinación objetiva de la intensidad de la inmunomarcación (4 niveles) y su localización.

Como control de especificidad de la técnica, se realizó el mismo procedimiento detallado anteriormente, pero utilizando tejidos con expresión alta y casi nula de ROR1 o BCL2L10.

Los resultados fueron analizados en colaboración con la Dra. Edith Graciela Illescas, médica especialista en anatomía patológica, miembro del Laboratorio de Biología y Patología Molecular de la Universidad Maimónides.

3.6 Ensayos celulares y funcionales

3.6.1 Ensayo de Luciferasa

Para realizar los ensayos de luciferasa, en primer lugar, se transfectaron o co-transfectaron células HEK-293T plaqueadas en placas de 12 pocillos, en cada pocillo se sembró 5 x 10^4 células de modo que quede bien esparcidas por toda la placa y sin conglomerados celulares, y se las incubaron con DMEM 10% SFB por 24 hs (2 pocillos por tratamiento). El método de transfección utilizado fue el de $CaPO_4$, este método se basa en la obtención de un precipitado entre el $CaCl_2$ y el ADN en una solución salina de fosfatos, en esta situación co-precipitan formando unos agregados que son endocitados por las células. Pasadas las 24 hs de incubación se descartó el medio, se colocó 500 µl de DMEM s/s y se agregó gota a gota el Mix de transfección. El mix agregado a cada pocillo contenía 0.5 µg de cada ADN de interés (0.5 µg del plásmido reportero luciferasa con las distintas secuencias promotoras de BCL2L10 y/o 0.5 µg del plásmido STAT3Y o STAT3C o control pLKO.1), 7.5 µl de 250 mM de $CaCl_2$, 55 µl H_2O MiliQ y 62.5 µl de HBS 2X. Las células fueron incubadas por 5 hs a 37 °C y 5% CO2, luego se cambió el medio a DMEM 10% SFB y se las incubó por 48 hs.

Pasadas las 48 hs, para medir la Actividad Lucifersa, se lavaron las células con PBS 1X frío y se realizó la extracción de proteínas en 100 µl de Buffer de Lisis de proteínas. La medición

de la actividad de la enzima luciferasa se realizó luego de vortexear 10 µl del extracto proteico y 50 µl de la Solución de Ensayo de Luciferasa, la adquisición se efectuó en oscuridad durante 20 seg utilizando un luminómetro (Lumat).

Los valores de la actividad enzimática de luciferasa obtenidos para cada pocillo se normalizaron a su respectivo valor de concentración proteica, medida por la técnica de Bradford. Luego, se promediaron los datos normalizados para cada condición (duplicado) y se relativizaron a la condición y/o tratamiento control.

3.6.2 Tratamiento con inhibidores y drogas quimioterapéuticas

Se plaquearon 4 x 10^5 células en placas de 35 mm con DMEM 10% SFB. Al día siguiente se agregaron los estímulos según correspondiese:

- ABT-737 (Cayman Chemicals, 852808-04-9)
- AG490 (Sigma, 133550-30-8)
- Camptotecina (Sigma, 7689-03-4)
- Cisplatino (Sigma, 15663-27-1)
- Dacarbazina (Sigma, 4342-03-4)
- Doxorrubicina (Sigma, 25316-40-9)
- Estaurosporina (Sigma, 62996-74-1)
- ML258 (inhibidor específico de BCL2L10 desarrollado (277) y cedido gentilmente por el Dr. John Reed, Sanford Burnham Medical Research Institute, La Jolla, Estados Unidos)
- PLX-4032 (Cayman Chemicals, #10618)
- SKY606 (Cayman Chemicals, #12030)
- TW-37 (Cayman Chemicals, 877877-35-5)

3.6.3 Ensayo de Proliferación Celular

Se realizaron curvas de crecimiento en función del tiempo para las células con ganancia y pérdida de función de BCL2L10. Para ello se plaquearon 5 x 10^3 células/100 µl de DMEM 10% SFB por pocillo en tres placas de 96 pocillos, para Día 0, 2 y 4 (8 pocillos por punto temporal). A su vez, en la placa que sería utilizada para el Día 0, se realizó una curva de calibración de número creciente de células (2.5 x 10^3 a 1 x 10^4 células por pocillo). La primer placas fue fijada 6 hs post plaqueo (Día 0), la segunda 48 hs post plaqueo (Día 2) y la tercera 96 hs post plaqueo (Día 4), la fijación se realizó con 4% de PFA por 20 min a Temp. amb., previo lavado con PBS 1X. Una vez fijadas todas las placas, se tiñeron con 0.1% de cristal violeta durante 30 min. Luego se recuperó la solución de cristal violeta, se realizaron lavados por inmersión con H_2O corriente y las placas se secaron durante 20 min a 37 °C. Una vez secas, se colocaron 100 µl/pocillo de ácido acético al 10% para disolver el cristal violeta y se dejó en agitación

hasta que se obtuviera un color homogéneo. Seguidamente, se midió la absorbancia a 590 nm en un lector de microplacas µQuant (Biotek Instruments).

Para analizar los resultados obtenidos, se calculó el promedio (por octuplicado experimental) del número de células inicial (Día 0), del Día 2 y del Día 4, aplicando una regresión lineal a partir de la curva de calibración.

3.6.4 Ensayo de Citotoxicidad con Cristal Violeta

Se plaquearon 5 x 10^3 células/100 µl de DMEM 10% SFB por pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 hs. Posteriormente, se agregaron los distintos compuestos a ensayar (por cuadruplicados). en las concentraciones indicadas en cada figura en la sección de **Resultados**, y se incubaron por 24 o 48 hs. Como control, se incubaron células con DMSO, de cada tipo celular. Luego de la incubación, se les quito el medio, se realizó un lavado con PBS 1X y las placas fueron fijadas con PFA al 4% por 30 min. Seguidamente se las incubó con 100 µl/pocillo de cristal violeta al 0.1% por 30 min. Pasado este tiempo, se retiró la solución, se realizaron lavados por inmersión con H_2O corriente y las placas se secaron durante 20 min a 37 °C. Una vez secas, se colocaron 100 µl/pocillo de ácido acético al 10% para disolver el cristal violeta y se dejó en agitación hasta que se obtuviera un color homogéneo. Seguidamente, se midió la absorbancia a 590 nm en un lector de microplacas µQuant (Biotek Instruments). Una de las placas fue fijada 6 hs luego del plaqueo para utilizar como control de siembra.

Para analizar los resultados obtenidos, se calculó el promedio (cuatriplicado experimental) del número de células inicial, así como 24 o 48 hs post tratamiento, aplicando una regresión lineal a partir de la curva de calibración como se describió para los Ensayos de Proliferación. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como el cociente entre el número de células en los pocillos tratados y el número de células en los pocillos sin tratar multiplicado por 100.

3.6.5 Cuantificación de muerte celular apoptótica por Citometría de flujo

Los niveles de apoptosis se midieron a través de la detección de fosfatidil-serina en la cara externa de la membrana celular mediante la tinción con Anexina V-FITC (Invitrogen, BMS306FI-300) e Ioduro de Propidio (IP, Cayman chemicals, 14289). Los ensayos se realizaron en placas de 35 mm a una densidad de 4 x 10^5 células por pocillo. Una vez plaqueadas las células en DMEM 10% SFB se las incubó por 24hs. Luego las células fueron tratadas con sus respectivas drogas, utilizando DMSO como control, por 24 hs. Una vez transcurrido este tiempo, se recolectó el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS 1X frío, se dispersaron con acutasa (BD™ Accutase™ Cell Detachment Solution). Todo fue

centrifugado a 3000 g durante 5 min. Luego se realizó un segundo lavado con PBS 1X, posterior filtración con una malla y centrifugación bajo las condiciones previamente mencionadas. El pellet obtenido fue resuspendido en 100 µl de Buffer de Unión de Anexina V. Se agregaron 5 µl de Anexina V, se mezcló y se incubó durante 15 min en oscuridad y a Temp. amb.. Se agregó 1 µl de IP inmediatamente antes de la adquisición de la señal y las muestras se llevaron a un volumen final de 500 µl en Buffer de Unión de Anexina V, para posteriormente ser analizadas utilizando un citómetro de flujo (FACS Canto II, BD) y analizado con el software FACSDiva 7.6.1 (BD Biosciences).

Como controles de la técnica y para realizar la compensación de la citometría se utilizaron células sin marcar, células incubadas sólo con Anexina V-FITC, células incubadas sólo con IP y células incubadas con Anexina V-FITC e IP. Se analizó la señal fluorescente de 30000 eventos positivos y se realizaron los gráficos de distribución de puntos (dot plots) utilizando el programa FlowJo.

3.7 Análisis bioinformático

Para realizar este análisis se analizaron distintos datasets de melanoma que fueron identificados a partir de búsquedas bibliográficas y de una inspección manual de GEO (*Gen Expression Omnibus*) empleando palabras clave. Los datos de expresión se obtuvieron directamente de GEO y en el caso de la base de datos TCGA se obtuvieron de https://www.cbioportal.org/. En primer lugar, los datos de expresión de cada dataset fueron normalizados calculando el Z-score (Z-score = (Valor individual – Valor de la media) / DE de la media) para cada receptor en cada paciente. Con el fin de obtener grupos de pacientes con alta y baja expresión de cada receptor se probaron distintas estrategias. En primer lugar, se probó establecer valores fijos de Z-score como líneas de corte. Se compararon los resultados al utilizar un único valor de Z-score como corte o dos valores de Z-score (uno para alta expresión y otro para baja expresión). La línea de corte se ajustó, en cada caso, para que los dos grupos de interés (alta y baja expresión) poseyeran un N apropiado para la comparación, buscando así un equilibrio entre dos variables: que los grupos de alta y baja expresión posean niveles de expresión distintos, pero también que el N de cada grupo sea un número elevado y similar. Sin embargo, los cuatro receptores presentaban valores muy distintos de Z-score lo cual generaba grupos con distinto número de pacientes para cada receptor o nos ponía en la necesidad de variar arbitrariamente el valor de Z-score de corte para cada grupo y cada receptor. Esta estrategia fue desechada y se optó por obtener los grupos de alta y baja a partir de la distribución por tercilos del valor de expresión (o el Z-score) de cada receptor. En este caso, los tercilos superior e inferior correspondían a expresión alta o baja de cada receptor, respectivamente. En el caso de la base de datos de TCGA de pacientes metastásicos, el corte se realizó tomado los septilos superior e inferior para que el número de pacientes en cada grupo sea similar al de los grupos seleccionados en las otras bases de datos.

Una vez obtenidos los grupos de alta y baja expresión para cada receptor en cada dataset, se realizó la identificación de los genes diferencialmente expresados (DEGs) en cada grupo, utilizando los *softwares* GEO2R o iDEP, donde se consideró un FDRcutoff o padj $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Los enriquecimientos con los DEGs obtenidos se realizaron el *software* ShinyGO 0.80, donde se consideró un adj.Pval < 0.05 como estadísticamente significativo.

3.8 Estadística

Para realizar los cálculos estadísticos, todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces en forma independiente. Los resultados se presentaron como la media +/- DE y la significación estadística fue determinada utilizando el t-Student o ANOVA en GraphPad Prism 8. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

4. Resultados

4.1 Rol de ROR1 en melanoma

La expresión desregulada de ROR1 se ha asociado con varias características celulares que promueven la malignidad en distintos tipos de cáncer incluidos el melanoma. Trabajos del laboratorio han demostrado que ROR1 promueve una mayor proliferación, motilidad y migración (208). En esta Tesis Doctoral se han explorado otros aspectos de su rol en melanoma.

4.1.1 ROR1 se expresa en melanoma

Si bien el laboratorio ya había descripto la expresión de ROR1 en líneas celulares y muestras de pacientes de melanoma (208), en este trabajo se buscó evaluar la expresión de ROR1 en muestras de pacientes con melanoma en distintos estadios de la enfermedad.

4.1.1.1 Puesta a punto de la técnica de IHQ para detectar ROR1

A fin de evaluar la expresión de ROR1 en muestras de pacientes con melanoma, se establecieron las condiciones óptimas de la inmunomarcación de ROR1 en muestras de melanoma mediante IHQ. Para ello se determinó el método de recuperación antigénica y las condiciones de incubación del anticuerpo.

En primer lugar, se buscó establecer controles positivo y negativo para la puesta a punto de la técnica. Como control positivo se utilizó una muestra de metástasis de melanoma en ganglio linfático. Para establecer un control negativo se buscó en la base de datos *The Human Protein Atlas* (http://www.proteinatlas.org/) los niveles de expresión de ARNm de ROR1 en los distintos órganos (**Fig. 19**), y se seleccionó aquellos tejidos que se encontraban disponibles en el laboratorio. Como posibles controles negativos se utilizaron: hígado, cerebro, tiroides, médula ósea, músculo esquelético y piel. Por otra parte, se fijó una clasificación de la marcación de ROR1 como fuertemente positivos (+++), moderadamente positivo (++), débilmente positivo (+) o negativo (-).

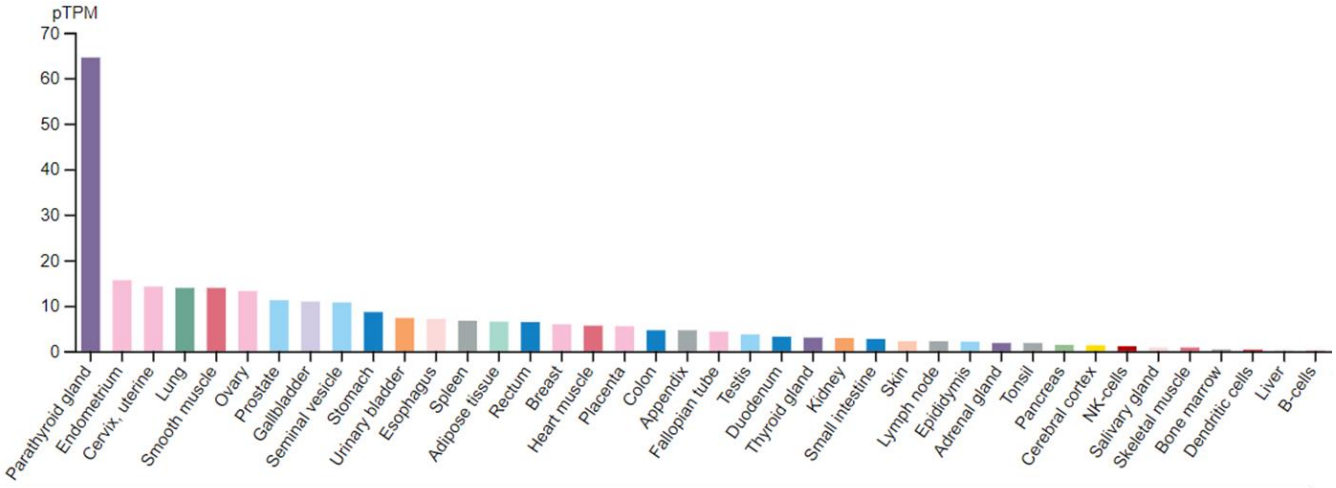


Fig. 19. Nivel de ARNm de ROR1 en distintos tejidos humanos. *Los valores corresponden a determinaciones de ARN-seq y fueron obtenidos de la base de datos The Human Protein Atlas (http://www.proteinatlas.org/).*

Para empezar con la puesta a punto se utilizó una solución 0.45% de H_2O_2 en alcohol metílico absoluto (para bloquear la peroxidasa endógena), condición que se encuentra estandarizada en el laboratorio. Con respecto al anticuerpo primario, se empleó una dilución 1:500 del anticuerpo anti-ROR1, incubándose durante la noche a temp. amb. (temperatura ambiente) en cámara húmeda para las muestras control mencionadas anteriormente. Todas las muestras dieron marcación intensa y marcación de fondo, dificultando su análisis.

Para disminuir la marcación inespecífica se decidió aumentar la concentración de la solución de bloqueo de la peroxidasa endógena a 1.5%. Por otra parte, como la marcación fue muy intensa, se mantuvo la dilución del anticuerpo anti-ROR1, pero ensayando dos condiciones de incubación: durante la noche a temp. amb. y 1 hr a 30 °C (ambas condiciones en cámara húmeda). En todos los casos se pudo eliminar la marcación de fondo. Cuando la incubación se realizó durante la noche todos los controles dieron positivo en mayor o menor medida. Por otra parte, para la condición de incubación de 1 hr el control positivo dio marcación ++, y los tejidos normales seleccionados como posibles controles negativos no presentaron marcación observable excepto el músculo esquelético y la médula ósea. Cabe aclarar que todos los controles negativos pertenecían a muestras tumorales que presentaban parte de tejido tumoral y parte de tejido normal, excepto la muestra de piel, por lo que esta última se la eligió como el control negativo más adecuado para analizar las muestras de pacientes con melanoma. Debido a que el control positivo dio marcación ++, se decidió repetir el ensayo disminuyendo la dilución del anticuerpo anti-ROR1 a 1:300. Para esta nueva condición el control positivo presentó una marcación de +++ y en el control negativo no se observó marcación.

4.1.1.2 ROR1 se expresa en pacientes con melanoma

Una vez establecidas las condiciones para la inmunomarcación de ROR1, se analizaron 36 muestras de pacientes con melanoma cedidas por el Hospital Austral y Hospital Municipal de Oncología Marie Curie. De estas muestras, el 90.9% presentó marcación positiva para ROR1. Los resultados obtenidos se muestran en la **Fig. 20** y **Tabla 2**. En la **Tabla 2** se detalla que se observó tinción positiva para ROR1 en todos los estadios del melanoma, aún en los *in situ*. En la mayoría de los casos la tinción de ROR1 resultó fundamentalmente citoplasmática (**Fig. 20F** y **Tabla 2**), pero en los casos de metástasis además de observarse una fuerte o leve tinción citoplasmática se observó fuerte tinción nuclear (**Fig. 20 C-D** y **Tabla 2**). Este patrón de localización coincide con lo observado previamente en otros tipos tumorales (192,201,202,278). En algunos casos la expresión de ROR1 no pudo ser determinada (N.D.) debido a que las muestras presentaban abundante melanina que dificultaba observar la marcación de ROR1, o a que la lesión era tan pequeña que imposibilitaba su análisis. La tinción de ROR1 se observó exclusivamente en el tejido tumoral, mientras que no se observó inmunorreactividad en el estroma adyacente no canceroso.

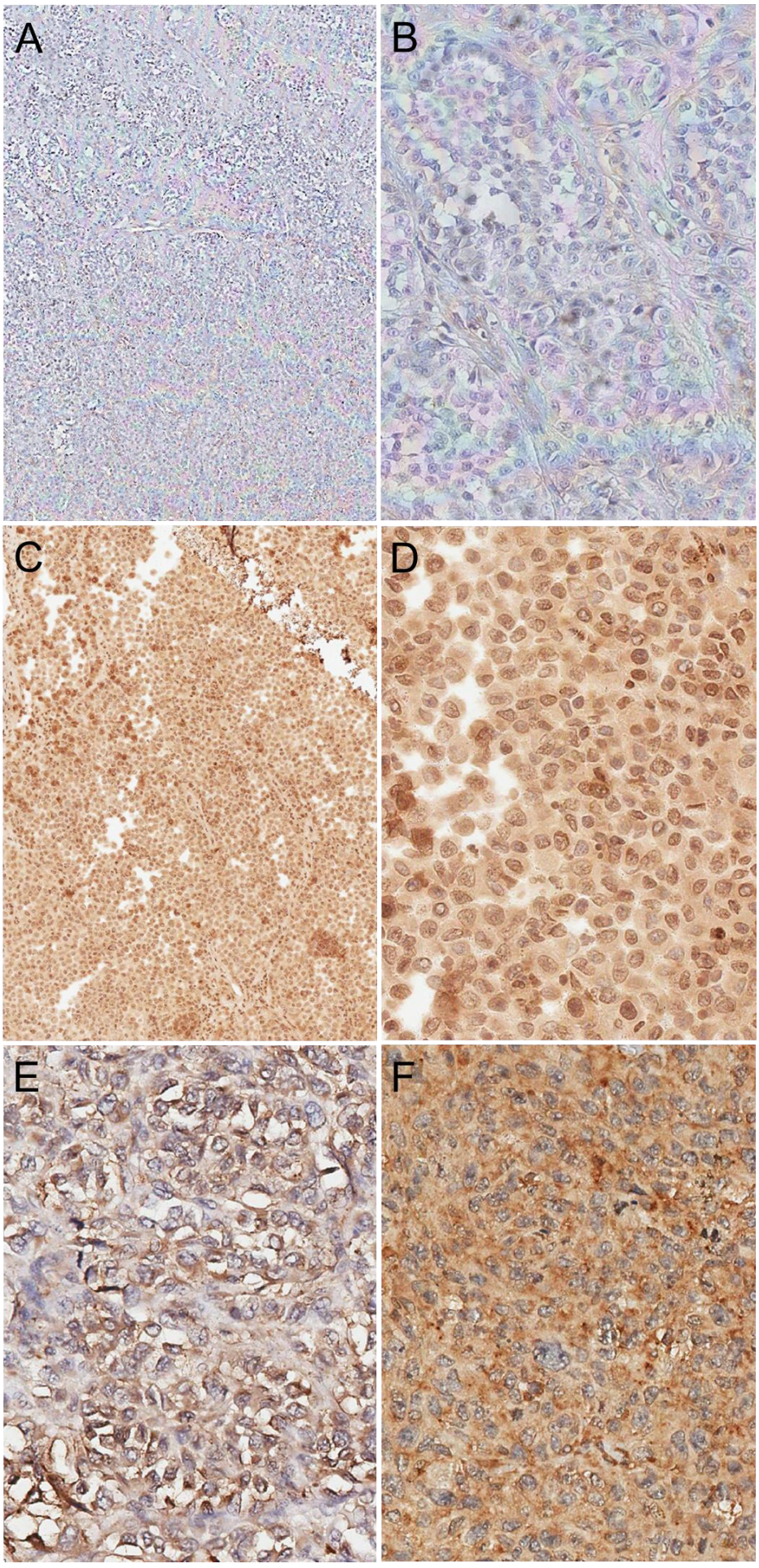

A
B
C
D
E
F

Fig. 20. ROR1 se expresa altamente en muestras tumorales de melanoma. *Imágenes representativas de la tinción de IHQ para ROR1 utilizando el anticuerpo* ab135669 *(dilución 1:300) con contratinción de hematoxilina. (A, B) Imágenes representativas de una muestra que obtuvo una marcación negativa para tinción ROR1 (A: magnificación 40x, B: magnificación 100x). (C, D) Imágenes representativas de una muestra donde se observa tinción núcleo-citoplasmática de ROR1 (C: magnificación 40x, D: magnificación 100x). (E) Muestra donde se observa tinción predominantemente nuclear de ROR1 (magnificación 100x). (F) Muestra donde se observa tinción predominantemente citoplasmática de ROR1 (magnificación 100x).*

ID Paciente	Diagnóstico	Estadio clínico TNM	Tinción ROR1	Localización predominante
80106	Melanoma nodular	IIIB	+++	Citoplasmática
69176-2C	Melanoma acral lentiginoso	IIIC	-	-
11954-1	Melanoma nodular	IIIC	++	Citoplasmática
10369B-1	Melanoma extensivo superficial	IIIA	+++	Citoplasmática
106214-2HI	Melanoma extensivo superficial	IIA	+++	Citoplasmática
99306	Melanoma in situ	0	+++	Citoplasmática
99121-2C	Melanoma in situ	0	+++	Citoplasmática
98190-1	Melanoma in situ	0	+++	Citoplasmática
91208	Melanoma in situ	0	++	Citoplasmática
89474-C	Melanoma in situ	0	++	Citoplasmática
101862-3A	Melanoma in situ	0	++	Citoplasmática
99919-1A	Melanoma extensivo superficial	IA	++	Citoplasmática
101862-4G	Melanoma in situ	0	+	Citoplasmática
91208-1	Melanoma in situ	0	+++	Citoplasmática
98190-2	Melanoma in situ	0	++	Citoplasmática
101862-1G	Melanoma in situ	0	N.D.	-
99919-3	Melanoma extensivo superficial	IA	+++	Citoplasmática
93143	Melanoma in situ	0	N.D.	-
99322-2B	Lentigo Maligno (in situ)	0	N.D.	-
96631-1	Lentigo Maligno (in situ)	0	+	Citoplasmática
94866	Lentigo Maligno (in situ)	0	+++	Citoplasmática

88037-1	Melanoma de piel (dos lesiones)	0/IB	+++	Citoplasmática
88037-2	Melanoma de piel (dos lesiones)	0/IB	+++	Citoplasmática
94017	Lentigo Maligno (in situ)	0	-	-
97197-A	Lentigo Maligno (in situ)	0	+++	Citoplasmática
22-38232	Metástasis de melanoma en ganglio linfático	IV	+++	Núcleo-citoplasmática
22-9213	Metástasis de melanoma en ganglio linfático	IV	+++	Núcleo-citoplasmática
21-8624	Metástasis de melanoma en ganglio linfático	IV	-	-
20-2359	Metástasis de melanoma en ganglio linfático	IV	+++	Nuclear
20-1828	Metástasis de melanoma en ganglio linfático	IV	++	Nuclear
20-1956	Metástasis de melanoma en ganglio linfático	IV	+++	Nuclear
17061	Metástasis de melanoma en intestino delgado	IV	+++	Núcleo-citoplasmática
17524	Metástasis de melanoma en ganglio linfático	IV	+++	Citoplasmática
MELA	Metástasis de melanoma en ganglio linfático	IV	+++	Núcleo-citoplasmática
8730	Metástasis de melanoma en ganglio linfático	IV	+++	Citoplasmática
8739	Metástasis de melanoma en ganglio linfático	IV	+++	Citoplasmática

Tabla 2. Análisis de la tinción de ROR1 por inmunohistoquímica en muestras de melanoma. *Resultado: fuertemente positivos (+++), moderadamente positivo (++), débilmente positivo (+), negativo (-), no determinado (N.D.). Nota: en los casos donde figura localización predominante nuclear, la tinción citoplasmática observada fue leve (+).*

Este resultado permite suponer que ROR1 posee un papel relevante de ROR1 en melanoma dada su alta prevalencia, mucho mayor que la observada en otros tipos de cánceres.

4.1.2 Vías de señalización reguladas por ROR1 en melanoma

Si bien se ha visto que ROR1 regula positivamente a AKT (208) y NF-κB (199) en líneas celulares de melanoma, no se ha investigado esto en profundidad ni se ha inspeccionado su papel en otras vías de señalización relevantes en cáncer, como las vías MEK/ERK y JAK/STAT3. Por lo que, para estudiar *in vitro* los efectos moleculares de ROR1 en melanoma se generaron líneas con sobreexpresión y silenciamiento de ROR1.

4.1.2.1 Generación de líneas celulares con sobreexpresión y silenciamiento de ROR1

Para inhibir la expresión de ROR1 se usaron dos ARN *"short hairpin"* (shARN), shROR1 A y shROR1 B y como control se empleó un shARN control (*scramble*). Dichos shARN fueron diseñados en el laboratorio y clonados en el vector pSUPER.retro. Por otro lado, para la sobreexpresión se utilizó un ADNc de ROR1 clonado en el plásmido VIR-SP cedido por el Dr. Luca Grumolato (Universidad de Rouen, Francia). Los plásmidos fueron introducidos en las células A375 (sobreexpresión y silenciamiento) y M2 (sobreexpresión). En todos los casos se utilizó el método de transfección estable descripto en **Materiales y Métodos**, y se seleccionó a las células que incorporaron el plásmido mediante el agregado de puromicina. Los cambios en los niveles de ROR1 se determinaron por WB (**Fig. 21**).

Luego de la transfección de ROR1, se detectó por WB una banda correspondiente a este receptor que, en las condiciones de revelado utilizadas, no fue observada en las células A375-vacío (células control generadas por transfección con el plásmido VIR-SP) en las células A375 (**Fig. 21A**) y células M2 (**Fig. 21B**). En el caso del silenciamiento de ROR1, la expresión de ROR1 observada en las células A375-shROR1 A y B fue significativamente menor que la observada en las células transfectadas con el plásmido "*scramble*" denominadas A375-SCR (**Fig. 21C**), indicando que el silenciamiento se llevó a cabo de manera eficiente en ambas líneas celulares.

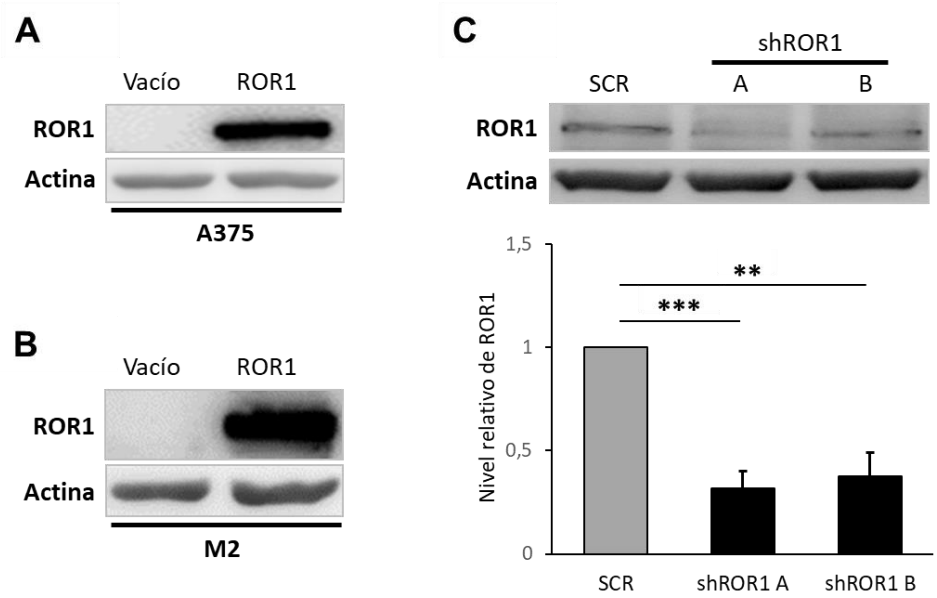


Fig. 21. Sobreexpresión y silenciamiento de ROR1. *(A) Extractos proteicos de células A375 transfectadas en forma estable con ROR1 o plásmido vacío (vacío) fueron evaluadas por WB usando el anticuerpo anti-ROR1 ab135669 (dilución 1:1000). Dada la baja cantidad de proteína sembrada y la corta exposición durante el revelado, no es posible apreciar en esta imagen la presencia del ROR1 endógeno. (B) Extractos proteicos de células M2 transfectadas en forma estable con ROR1 o plásmido vacío (vacío) fueron evaluadas por WB usando el anticuerpo anti-ROR1 ab135669 (dilución 1:1000). Dada la baja cantidad de proteína sembrada y la corta exposición durante el revelado, no es posible apreciar en esta imagen la presencia del ROR1 endógeno. (C) Extractos proteicos de células A375 transfectadas con dos shARN para ROR1 (A y B) o un shARN scramble (SCR) se analizaron mediante WB utilizando el anticuerpo anti-ROR1 ab135669 (dilución 1:1000). El gráfico de barras muestra la media ± DE (n = 3) de los niveles de ROR1 normalizados al control de carga y relativizados a las células control. La actina fue utilizada como control de carga. La significancia estadística se calculó utilizando ANOVA + prueba de Tukey. **: p<0.01, ***: p<0.001.*

4.1.2.2 ROR1 regula positivamente a AKT, ERK, p65 y pSTAT3

Una vez generadas las líneas de sobreexpresión y silenciamiento de ROR1, se evaluó los niveles de expresión de AKT, ERK y STAT3 y sus formas fosforiladas, y de p65, por WB. A continuación, se muestran y detallan los resultados obtenidos, comenzando por el estudio de la proteína AKT.

Como se observa en la **Fig. 22**, las células A375-ROR1 muestran los niveles de AKT aumentados significativamente respecto de las células A375-vacío. Concordantemente, las células A375-shROR1 A y B presentan niveles de AKT disminuidos de manera significativa respecto de las células A375-SCR. Los cambios observados en los niveles de pAKT no fueron significativos, ya que estos se deben al cambio en la expresión de AKT.

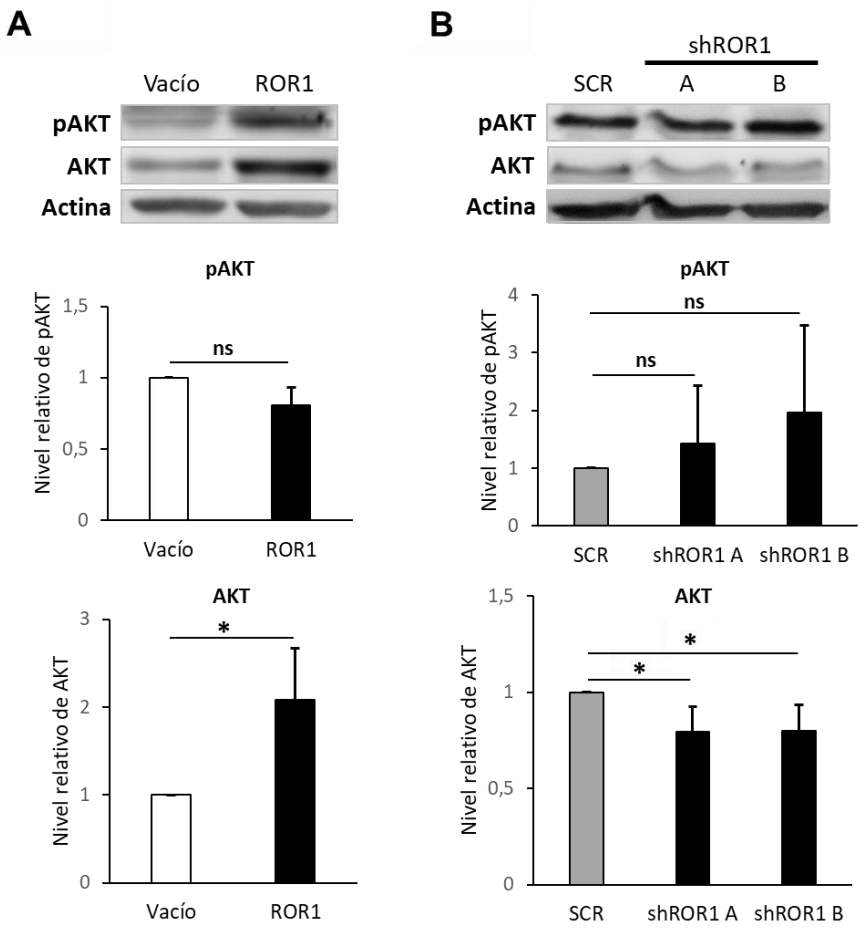


Fig. 22. ROR1 regula positivamente a AKT. *(A) Extractos proteicos de células A375-vacío y A375-ROR1 se evaluaron por WB para medir los niveles de AKT y pAKT (Ser473). (B) Extractos proteicos de células A375-SCR, A375-shROR1 A y A375-shROR1 B se analizaron mediante WB para medir los niveles de AKT y pAKT (Ser473). La actina fue utilizada como control de carga. Los gráficos de barras muestran la media ± DE (n = 3) de los niveles de pAKT normalizados al AKT total o de AKT normalizados al control de carga, y relativizados a las células control. La significancia estadística se calculó utilizando t-Student (sobreexpresión) o ANOVA + prueba de Tukey (silenciamiento). ns: no significativo. *: p<0.05.*

En el caso de ERK se analizó posibles cambios en el nivel de expresión y fosforilación de ERK1 (44kDa) y de ERK2 (42kDa). En la **Fig. 23** se observa que las células A375-ROR1 presentan mayores niveles de ERK2 que las células control A375-vacío; del mismo modo se observa que las células A375-shROR1 B presentan niveles menores de ERK2 que las células control A375-SCR. No se observaron cambios en la expresión de ERK1. Cabe mencionar que ERK2, y no ERK1, es la MAPK involucrada en la activación de la vía en pacientes con melanomas con mutaciones en BRAF (279). Al analizar los resultados obtenidos con pERK1/2 no se observan diferencias entre las líneas celulares.

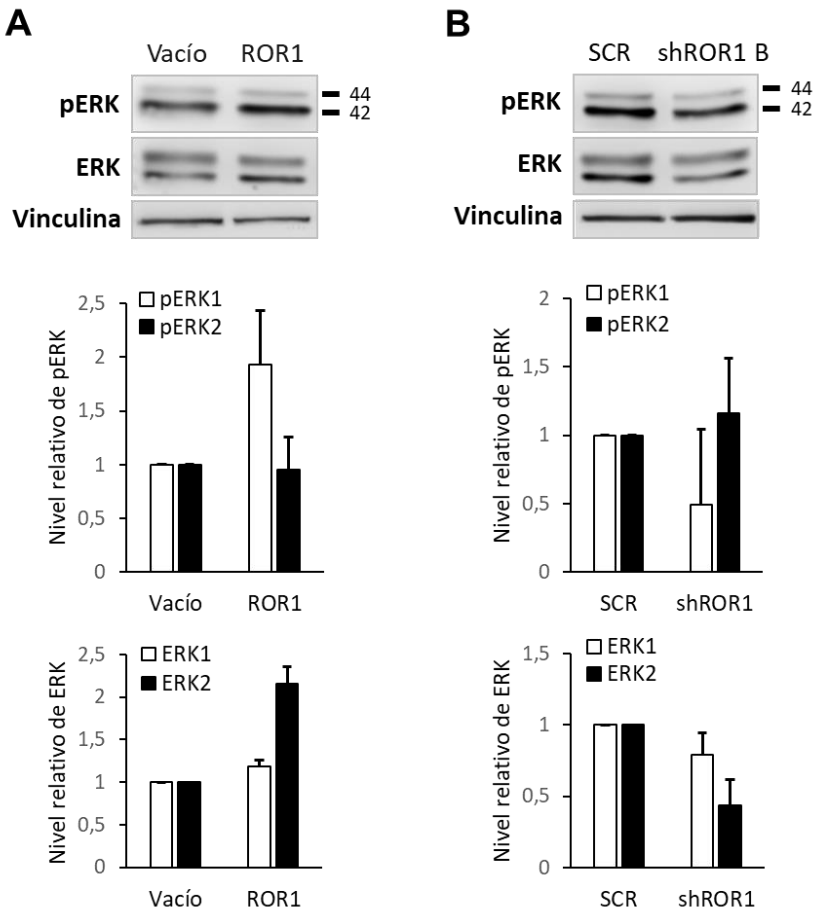


Fig. 23. ROR1 regula positivamente a ERK1/2. *(A) Extractos proteicos de células A375-vacío y A375-ROR1 se evaluaron por WB para medir los niveles de ERK1/2 y pERK1/2 (Thr202/Tyr204 de ERK1 y Thr185/Tyr187 de ERK2). (B) Extractos proteicos de células A375-SCR y A375-shROR1 B se analizaron mediante WB para medir los niveles de ERK1/2 y pERK1/2 (Thr202/Tyr204 de ERK1 y Thr185/Tyr187 de ERK2). La vinculina fue utilizada como control de carga. Los marcadores de 42 kDa (ERK2) y 44 kDa (ERK1) se indican en los paneles. Los gráficos de barras muestran la media ± DE (n = 2) de los niveles de pERK1/2 normalizados al ERK1/2 total o de ERK1/2 normalizados al control de carga, y relativizados a las células control.*

Luego se analizó el efecto de ROR1 sobre p65, una subunidad del complejo transcripcional NF-κB. Como se muestra en la **Fig. 24**, se observó un aumento significativo de p65 en las células A375-ROR1 con respecto al control. En el mismo sentido, las células A375-shROR1 A y B mostraron una disminución significativa de los niveles de p65 que con respecto a las células A375-SCR.

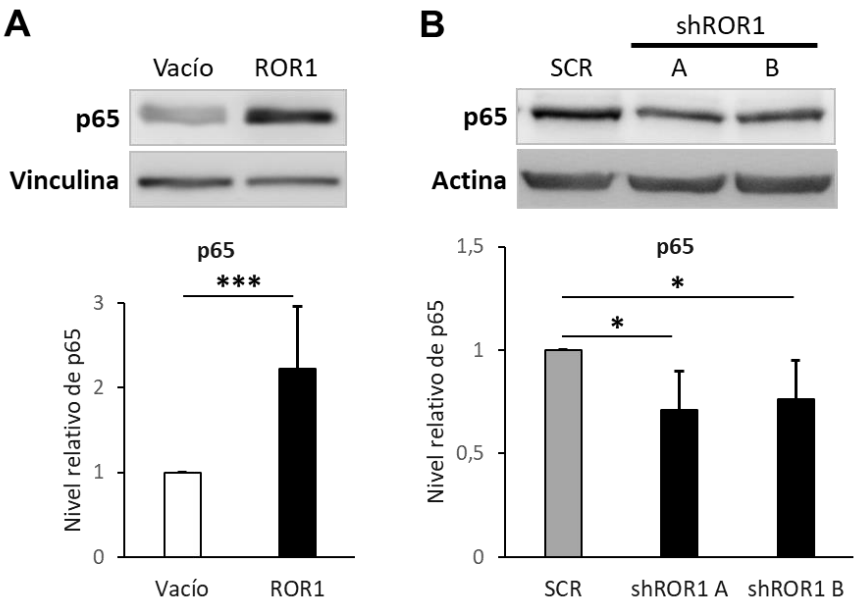


Fig. 24. ROR1 regula positivamente a p65. *(A) Extractos proteicos de células A375-vacío y A375-ROR1 se evaluaron por WB para medir los niveles de p65. (B) Extractos proteicos de células A375-SCR, A375-shROR1 A y A375-shROR1 B se analizaron mediante WB para medir los niveles de p65. La vinculina o actina se utilizaron como controles de carga. Los gráficos de barras muestran la media ± DE (n = 3) de los niveles de p65 normalizados al control de carga y relativizados a las células control. La significancia estadística se calculó utilizando t-Student (sobreexpresión) o ANOVA + prueba de Tukey (silenciamiento). ns: no significativo. *: p<0.05, ***: p<0.001.*

Posteriormente se evaluó los cambios en los niveles de expresión de STAT3 y pSTAT3 provocados por ROR1. Al analizar cambios en STAT3, se observó que las células A375-ROR1 mostraron niveles significativamente más altos de STAT3 que las células control A375-vacío. Por el contrario, el silenciamiento de ROR1 no afectó significativamente la expresión de STAT3 (**Fig. 25**). Al evaluar la activación de STAT3, se observó que las células A375-ROR1 mostraron niveles significativamente más altos de pSTAT3 que las células control A375-vacío y, concordantemente, las células A375-shROR1 A y B mostraron niveles significativamente más bajos de pSTAT3 que las células control A375-SCR. Estos resultados indican que ROR1 promueve la activación de STAT3.

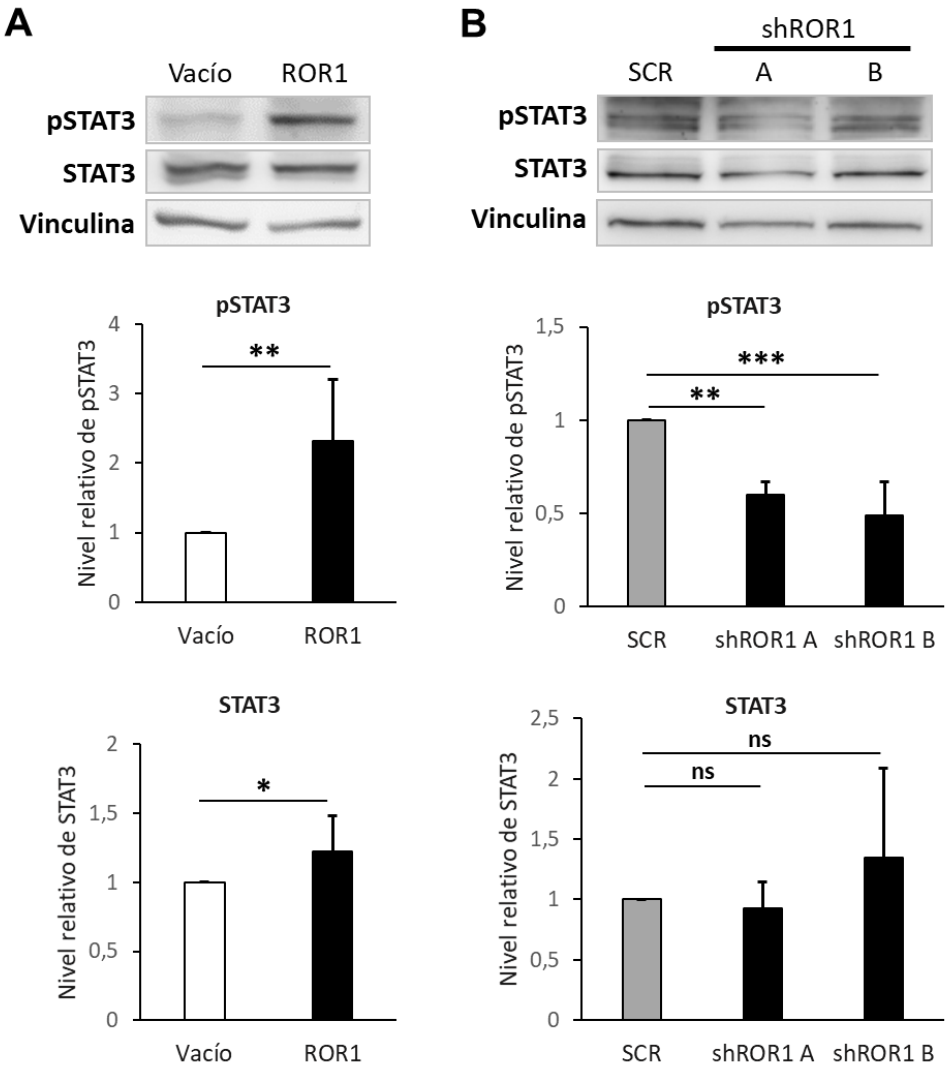


Fig. 25. ROR1 activa a STAT3. *(A) Extractos proteicos de células A375-vacío y A375-ROR1 se evaluaron por WB para medir los niveles de STAT3 y pSTAT3 (Tyr705). (B) Extractos proteicos de células A375-SCR, A375-shROR1 A y A375-shROR1 B se analizaron mediante WB para medir los niveles de STAT3 y pSTAT3. La vinculina fue utilizada como control de carga. Los gráficos de barras muestran la media ± DE (n = 3) de los niveles de pSTAT3 normalizados al STAT3 total o de STAT3 normalizados al control de carga, y relativizados a las células control. La significancia estadística se calculó utilizando t-Student (sobreexpresión) o ANOVA + prueba de Tukey (silenciamiento). ns: no significativo. *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001.*

Los resultados obtenidos ponen en evidencia que ROR1 regula positivamente la expresión de AKT, ERK2 y p65 y, además, la fosforilación y activación de STAT3.

4.1.3 Análisis bioinformático funcional y comparativo de ROR1 con otros RTKs de WNT5A en melanoma

Una de las características más llamativas de la vía de señalización Wnt es la capacidad de los ligandos WNT de unirse y activar numerosos receptores de membrana. WNT5A, por ejemplo, además de interactuar con receptores FZD también puede unirse a cuatro receptores RTKs, ROR1, ROR2, RYK y PTK7. Sin embargo, muy poco se sabe acerca de la participación de cada receptor en la actividad de esta vía de señalización y su rol en cáncer.

Para comprender en mayor profundidad la función de ROR1 en melanoma, se intentó hallar diferencias y similitudes en las funciones biológicas asociadas a la expresión de ROR1 con respecto a las funciones de cada uno de los otros RTKs de WNT5A. Una forma de llevar a cabo este estudio es mediante el análisis de datos de expresión génica de pacientes con melanoma de forma tal de determinar los genes diferencialmente expresados (DEGs) asociados a cada receptor.

4.1.3.1 Identificación de los DEGs asociados a ROR1, ROR2, RYK y PTK7 en muestras de pacientes con melanoma

Para llevar a cabo este análisis se determinó, en primer lugar, que datasets o grupos de datos de pacientes con melanoma primario (PRI) o metastásico (MET) resultaban más adecuados. Se evaluaron 28 grupos de datos: Leeds, TCGA, GSE46517, GSE65904, GSE57715, GSE59455, GSE22155, GSE8401, GSE7553, GSE12391, GSE19234, GSE53118, GSE17275, GSE50509, GSE50493, GSE50496, GSE23376, GSE15605, GSE98394, GSE66839, GSE31139, GSE29377, GSE3189, GSE12627, GDS3966, GSE141484, GSE112509 y GSE169203. Como muchos de estos datasets tenían tanto muestras de melanomas PRI como MET, se decidió analizar ambos tipos por separado quedando conformados 14 grupos de datos de melanomas PRI y 18 de MET. El paso siguiente fue seleccionar aquellos grupos de datos que tuviesen 15 o más muestras, y luego se eliminaron del análisis aquellos datasets que no tenían datos de expresión para alguno de los cuatro receptores. Esto redujo el análisis a los siguientes datasets:

- Melanoma PRI (13 datasets): Leeds, TCGA, GSE46517, GSE65904, GSE59455, GSE8401, GSE17275, GSE15605, GSE98394, GSE66839, GSE3189, GDS3966, GSE112509.
- Melanoma MET (16 datasets): TCGA, GSE46517, GSE65904, GSE59455, GSE22155, GSE8401, GSE7553, GSE19234, GSE53118, GSE50509, GSE50493, GSE23376, GSE29377, GSE12627, GDS3966, GSE169203.

Para proseguir con el análisis, los datos de expresión fueron agrupados estableciendo líneas de corte para obtener grupos de pacientes con alta y baja expresión de cada receptor.

Una vez establecidos los grupos de alta y baja expresión de cada receptor se procedió a identificar los DEGs asociados a cada receptor. Los DEGs se obtienen al comparar la expresión de cada gen del genoma entre los dos grupos de pacientes (alta versus baja expresión del receptor en estudio). Los DEGs se pueden clasificar como regulados positivamente o hacia arriba (DEGs UP, de alta expresión), o regulados negativamente o hacia abajo (DEGs DN, de baja expresión). Por la metodología utilizada, los DEGs UP siguen un patrón de expresión similar al del receptor en estudio y los DEGs DN poseen una expresión opuesta a la del receptor en estudio. Es decir que si, por ejemplo, el receptor en estudio esta sobreexpresado, los DEGs UP también lo están. Para obtener los DEGs se utilizó para todos los grupos de datos el programa GEO2R que facilita GEO (*Gen Expression Omnibus*), excepto para los datasets Leeds, TCGA, GSE98394 y GDS3966 en donde se utilizó el programa iDEP (http://bioinformatics.sdstate.edu/idep/) ya que el análisis por GEO2R no está disponible. Ambos programas generan una lista de genes diferencialmente expresados en forma estadísticamente significativa (FDRcutoff o padj $p < 0,05$). En la **Fig. 26** se muestran gráficos de volcán con los DEGs UP y DN obtenidos para los distintos receptores. De cada lista de DEGs se derivaron dos listas, una de DEGs UP y otra de DEGs DN. Para establecer los DEGs UP y DN se utilizó el valor de logFC (FC = FoldChange), estableciéndose como línea de corte un valor de $logFC > 1$ para el grupo de DEGs UP y de $logFC < -1$ para el grupo DEGs DN. Este valor representa un cambio mayor o igual al doble en la expresión ($FC = 2$ o $logFC = 1$). A modo de ejemplo, se muestra el análisis realizado para el grupo de datos de melanoma metastásico, GSE53118.

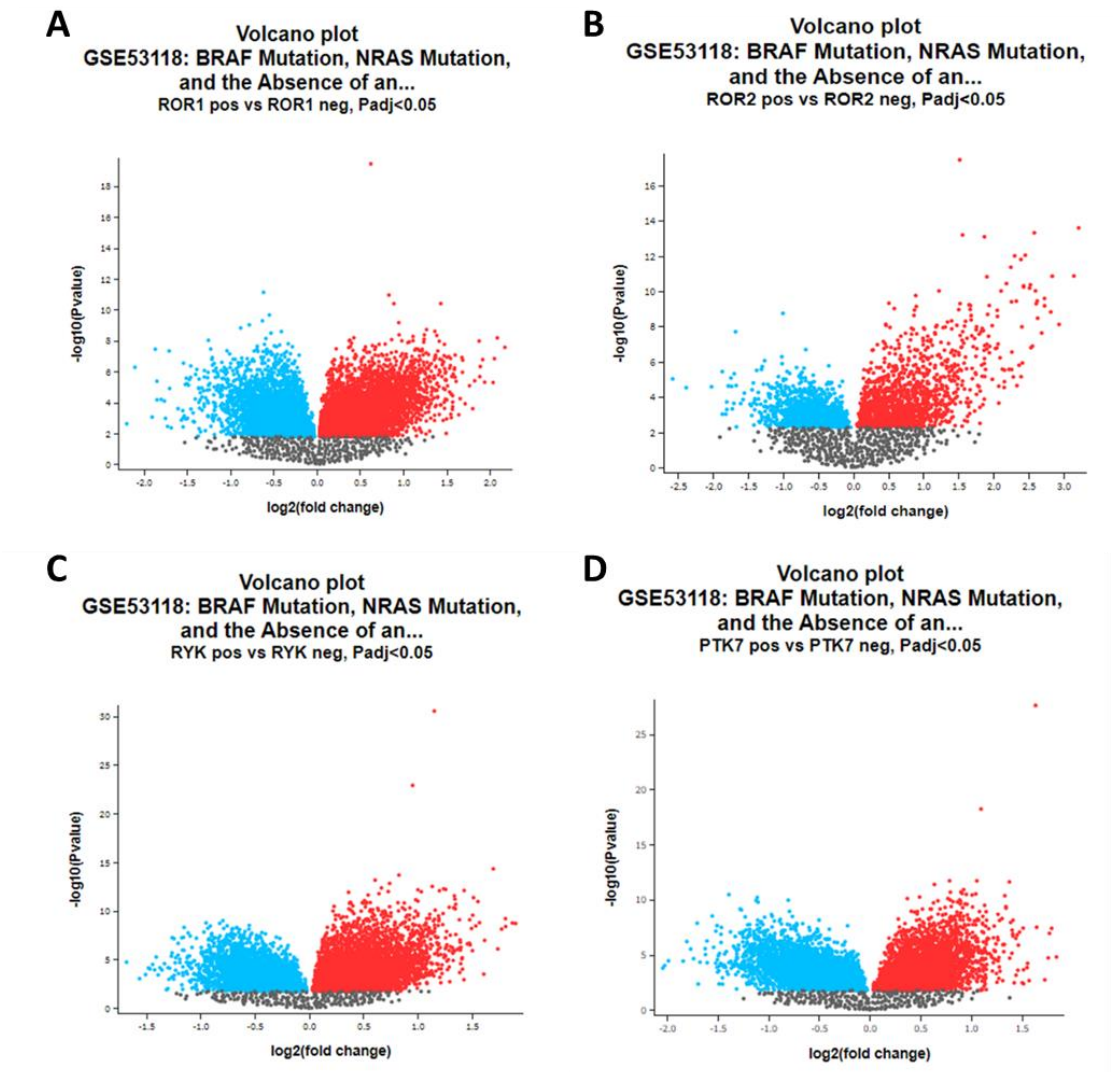


Fig. 26. Gráficos de volcán de DEGs obtenidos para los receptores ROR1, ROR2, RYK y PTK7. *Los gráficos muestran el valor p (eje y) y el logFC (eje x) para cada gen luego de comparar los grupos de pacientes de alta y baja expresión de ROR1 (A), ROR2 (B), RYK (C) y PTK7 (D). Los datos corresponden al dataset GSE53118. Los puntos rojos representan DEGs UP y los puntos celestes DEGs DN. DEG UP y DEG DN que poseen un valor p significativo (genes diferencialmente expresados regulados hacia arriba o hacia abajo, respectivamente).*

Los datasets en los que no se obtuvieron DEGs para al menos tres de los cuatro receptores fueron descartados. Luego de aplicar todos los criterios de inclusión mencionados quedaron seleccionados para este estudio 6 grupos de datos, 3 con pacientes PRI y 3 con pacientes MET. El número de DEGs observados en estos grupos de datos se muestra en la **Tabla 3**.

Melanoma	Dataset	N° de pacientes	DEGs							
			ROR1		ROR2		RYK		PTK7	
			UP	DN	UP	DN	UP	DN	UP	DN
Primario	TCGA-Pri	103	780	346	1121	52	2105	1228	128	67
	GSE98394	51	570	125	620	164	31	339	1	0
	GSE112509	56	1382	413	2663	963	393	529	379	376
Metastásico	TCGA-Met	369	1622	602	2951	293	2199	1808	549	903
	GSE53118	79	448	126	263	52	310	139	121	230
	GSE169203	57	1071	469	1718	458	362	719	1112	649

Tabla 3. DEGs UP y DN para ROR1, ROR2, RYK y PTK7. *Número de DEGs con un cambio de al menos el doble en la expresión observado (min fold change = 2) de las 6 bases de datos analizadas. DEGs UP y DEGs DN (DEGs regulados hacia arriba o hacia abajo, respectivamente). DEGs: genes diferencialmente expresados.*

Estos 6 grupos de datos en realidad corresponden a 5 estudios, ya que el conjunto de datos TCGA contiene muestras tanto PRI como MET. Esto permitió realizar una comparación directa entre ambos grupos de datos. En este grupo de datos, los DEGs en muestras metastásicas superaron en número a los DEGs en pacientes primarios para los cuatro receptores. Interesantemente, la comparación entre ellos reveló que una fracción sustancial de los DEGs en muestras PRI no se observaron en los DEGs de muestras MET (**Anexo D.1**). Este resultado respalda la idea de que los DEGs del melanoma PRI y MET deben analizarse por separado y sugiere que los genes asociados con la expresión de estos cuatro receptores difieren parcialmente entre estas dos etapas de la enfermedad.

4.1.3.2 Análisis comparativo de DEGs y Procesos Biológicos asociados a ROR1 con respecto a ROR2, RYK y PTK7 en muestras de pacientes con melanoma

Como primera aproximación para determinar la similitud funcional entre los cuatro receptores, realizamos un análisis de Venn para determinar el grado de superposición entre los DEGs asociados a cada receptor (**Tabla 4**). Para ello se calculó en cada base de datos cuantos genes de los presentes en un listado de DEG UP o DEG DN para un dado receptor, estaba también presente en los listados de DEGs de alguno de los otros receptores. Por ejemplo, se determinó que el 68% de los genes identificados como DEGs UP de ROR1 en el grupo de datos TCGA-PRI también se encontraban en el listado de DEGs UP de alguno de los otros tres receptores en el mismo grupo de datos. Este mismo cálculo se repitió para cada receptor en los 12 listados de DEGs (6 DEGs UP y 6 DEGs Down). A partir de estos 12 valores se calculó un promedio para cada receptor que denominamos Promedio Compartido. Un bajo valor de Promedio Compartido implica que los DEGs asociados a cada receptor y por lo tanto sus funciones biológicas presentan un bajo grado de superposición con los otros receptores. Como se observa en la **Tabla 4**, este análisis reveló que ROR1 comparte un alto

número de DEGs con ROR2, RYK y PTK7, ya que comparte dos tercios de sus DEGs con alguno de los otros tres receptores. En cambio, en el caso de los otros tres receptores, aproximadamente dos tercios de sus DEGs son exclusivos de cada uno. El alto grado de superposición de los DEGs de ROR1 con los de los otros receptores indicaría una cierta superposición funcional. En contraposición, el bajo grado de superposición entre los DEG de ROR2, RYK y PTK7 indicaría que cada receptor se asocia con un conjunto particular de genes, y que, por lo tanto, estos receptores podrían asociarse a funciones distintas.

Receptor/BDs	DEGs												Prom. Compartido
	TCGA-PRI		GSE112509		GSE98394		TCGA-MET		GSE169203		GSE53118		
	UP	DN	UP	DN	UP	DN	UP	DN	UP	DN	UP	DN	
ROR1	68%	83%	85%	74%	59%	51%	84%	83%	83%	82%	42%	13%	67%
ROR2	7%	51%	46%	35%	55%	38%	31%	51%	69%	46%	15%	21%	39%
RYK	24%	34%	64%	41%	10%	0%	39%	34%	81%	69%	50%	4%	37%
PTK7	25%	26%	69%	72%	0%	*	53%	26%	75%	69%	5%	0%	38%

Tabla 4. Grado de superposición de los DEGs. *Porcentajes de DEGs de cada receptor que son compartidos con los otros tres receptores. Se detalla el porcentaje observado para cada grupo de datos y en la última columna se indica el promedio para los seis datasets. * no se obtuvieron DEGs.*

Luego, para interpretar sistemáticamente los DEGs obtenidos, se realizaron análisis de enriquecimientos de cada conjunto de DEGs utilizando la prueba de sobrerrepresentación disponible en la aplicación ShinyGo 0.80. Se analizó tres categorías: “Biological Process” (BP, Procesos Biológicos), “Hallmark” (Procesos relacionados con Hallmarks del Cáncer) y “Oncogenic MSigDb” (Procesos Oncogénicos) (**Anexos D.2** y **D.3**). Una vez obtenidas las firmas enriquecidas en cada base de datos se procedió a comparar las firmas presentes en cada una de ellas. Para extraer conclusiones relevantes de este análisis, se puso foco en las firmas genéticas enriquecidas en los tres datasets analizados y, en menor medida, en las firmas genéticas enriquecidas en dos de los tres datasets analizados para muestras PRI y MET. Las firmas genéticas que solo estaban enriquecidas en uno de los tres datasets no fueron tomadas en cuenta. Las firmas enriquecidas en los DEGs UP y DN de ROR1 presentes en al menos dos de las bases de datos se muestran en la **Tabla 5**.

Como se puede ver en la **Tabla 5**, el enriquecimiento más destacado de los ROR1-DEGs UP es el “HALLMARK EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION” (EMT en inglés, aquí será denominada TEM) que se observó en los tres datasets PRI (Fold Enrichment 2.4, 2.8 y 3.10) y en los tres datasets MET (Fold Enrichment 7.51, 5.03 y 2.49). El mayor enriquecimiento en muestras MET podría indicar una asociación más fuerte de ROR1 con TEM en esta etapa. Consistente con este hallazgo es el enriquecimiento del “HALLMARK APICAL JUNCTION”, que

es abundante en genes asociados a la adhesión celular. Se encontró que este *hallmark* estaba enriquecido en ROR1-DEG UP de los tres datasets MET y de dos datasets PRI. El análisis de enriquecimiento en la categoría BP reveló 21 procesos tanto en los tres datasets PRI como en los tres MET. En concordancia con el análisis de la categoría Hallmark, ambas listas presentan muchos BP relacionados con la TEM, como motilidad, migración y locomoción celular, organización de la matriz extracelular y diferenciación celular. Por su parte, el análisis de las firmas obtenidas en la categoría Oncogenic MSigDb reveló el enriquecimiento de "MEK UP.V1 UP", "KRAS UP. V1 UP" y "EGFR UP. V1 UP", asociados a la activación de la vía de las MAPK, en muestras PRI. Estos resultados son consistentes con resultados previos (208) y apoyan la noción de que la expresión de ROR1 promueve TEM en melanoma, y que induce la activación de la vía de ERK.

Por el contrario, el enriquecimiento de ROR1-DEGs DN fue marcadamente diferente entre las muestras PRI y MET (**Tabla 5**). No se encontró enriquecimiento en las categorías BP y Hallmark en muestras PRI. Interesantemente la firma "HALLMARK Apoptosis" se encontró enriquecida en los ROR1-DEG DN correspondientes a los tres grupos de datos MET.

Por otra parte, en dos de los tres datasets de MET se encontró enriquecimiento en firmas genéticas relacionadas a la respuesta inmune, como "HALLMARK INTERFERON GAMMA RESPONSE", "HALLMARK IL2 STAT5 SIGNALING", "HALLMARK ALLOGRAFT REJECTION", "HALLMARK COMPLEMENT" y "HALLMARK INFLAMMATORY RESPONSE", indicando que ROR1 está asociado a la inhibición de la respuesta inmune anti-tumoral. En consonancia con esta última observación, en la categoría BP se encontró enriquecimiento para los tres datasets en varias firmas de BP asociadas a la activación de leucocitos (como activación de leucocitos mieloides, activación de neutrófilos, activación de granulocitos, etc.).

Categoría	Enriquecimiento-DEGs UP		Enriquecimiento-DEGs DN	
	Primario	Metastásico	Primario	Metastásico
Hallmark	HALLMARK EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION HALLMARK APICAL JUNCTION (**)		———	HALLMARK APOPTOSIS HALLMARK INTERFERON GAMMA RESPONSE (*) HALLMARK IL2 STAT5 SIGNALING (*) HALLMARK ALLOGRAFT REJECTION (*) HALLMARK INTERFERON ALPHA RESPONSE (*) HALLMARK COMPLEMENT (*) HALLMARK INFLAMMATORY RESPONSE (*)
Biological Process	Generation of neurons Cell adhesion Biological adhesion Tube development		———	Leukocyte activation Cell activation Myeloid cell activation involved in immune response Myeloid leukocyte activation Leukocyte activation involved in immune response Immune effector proc. Leukocyte mediated immunity Myeloid leukocyte mediated immunity Neutrophil activation Granulocyte activation
	Neurogenesis Locomotion Cell migration Cell junction organization Cell motility Localization of cell Reg. of locomotion Chemotaxis Taxis Reg. of cell migration Pos. reg. of locomotion Cell junction assembly Reg. of cellular component movement Pos. reg. of cell migration Pos. reg. of cellular component movement Circulatory system proc. Reg. of transport	Circulatory system development Extracellular matrix organization Extracellular structure organization External encapsulating structure organization Neuron projection development Cell morphogenesis involved in differentiation Cell morphogenesis Blood vessel development Anatomical structure formation involved in morphogenesis Plasma membrane bounded cell projection morphogenesis Cell projection morphogenesis Cell part morphogenesis Central nervous system development Ossification Reg. of cell differentiation Cellular response to endogenous stimulus Response to endogenous stimulus		
Onogenic MSigDb	KRAS.KIDNEY UP.V1 UP EGFR UP.V1 UP ATF2 UP.V1 DN KRAS.600 UP.V1 UP RAF UP.V1 DN ATF2 S UP.V1 DN PRC2 EZH2 UP.V1 UP STK33 NOMO DN SNF5 DN.V1 DN LTE2 UP.V1 UP IL21 UP.V1 DN CAHOY ASTROCYTIC CAHOY ASTROGLIAL TGFB UP.V1 DN MEK UP.V1 UP PRC2 EZH2 UP.V1 DN LEF1 UP.V1 UP	P53 DN.V1 UP ESC V6.5 UP EARLY.V1 DN LEF1 UP.V1 DN	P53 DN.V1 DN	P53 DN.V1 DN IL15 UP.V1 UP IL2 UP.V1 UP

Tabla 5. Enriquecimiento de los DEGs UP y DN de ROR1. *Se muestran las firmas genéticas enriquecidas de los DEGs UP y DN de ROR1 para las categorías "Hallmark", "Biological Process" y "Oncogenic MSigDb" en los tres datasets analizados de melanomas PRI o MET obtenidas en ShinyGo 0.80. (*) Firma genética enriquecida en dos de los tres datasets analizados para las muestras MET. (**) Firma genética enriquecida en dos de los tres datasets analizados para las muestras PRI. PRI: primarios, MET: metastásicos.*

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de ROR1 en muestras MET está asociada con la inhibición de la inmunidad antitumoral y una baja capacidad apoptótica de las células tumorales. Esta observación referida a apoptosis será estudiada experimentalmente en la **sección 4.1.4** para determinar el rol de ROR1 en la muerte celular.

Para proseguir con el análisis, se procedió a comparar las firmas genéticas obtenidas de los enriquecimientos de ROR1 (**Tabla 5**) con las de los otros tres receptores, ROR2, RYK y PTK7. Si bien se hizo foco en las firmas genéticas obtenidas en la categoría "Hallmark" (**Tabla 6**) también se tuvieron en cuenta las firmas obtenidas en las categorías BP (**Anexo D.4**) y "Oncogenic MSigDb" (**Anexo D.5**) de los otros tres receptores RTKs.

De manera similar a lo que se describió para ROR1, se encontró que los ROR2-DEG UP estaban enriquecidos en la firma Hallmark TEM tanto en los tres grupos de datos PRI (Fold

Enrichment 8.53, 4.74 y 7.83) como en los tres MET (Fold Enrichment 5.73, 4.39 y 25,49). Así mismo, otras firmas enriquecidas en la categoría Hallmark fueron "HALLMARK COAGULATION", "HALLMARK HYPOXIA" (**Tabla 6**). La coagulación regula la inflamación y la angiogénesis en el cáncer y está asociada con el desarrollo de los tumores y la metástasis. En línea con estos hallazgos, se observó el enriquecimiento en la categoría BP de varias firmas vinculadas a TEM, incluidas la motilidad y migración celular, locomoción, organización de la matriz extracelular y angiogénesis (**Anexo D.4**). Esto sugiere que los dos receptores ROR se asocian a la promoción de TEM en melanoma. Por otra parte, el análisis de las firmas obtenidas en la categoría Oncogenic MSigDb de los ROR2-DEGs UP reveló el enriquecimiento de "AKT UP.V1 DN", "MTOR UP.V1 DN", "MEK UP.V1 UP" y "P53 DN.V1 UP" (**Anexo D.5**). Estas observaciones son consistentes con la inhibición de las vías de AKT y p53 y la activación de la vía de ERK descriptas para ROR2 (280–282). Por otra parte, los ROR2-DEG DN en la categoría Hallmark no arrojaron ningún enriquecimiento significativo (**Tabla 6**), y en la categoría BP en MET se observaron procesos relacionados con pigmentación y diferenciación del melanocito (**Anexo D.4**).

A diferencia de lo que se describió para ROR1 y ROR2, los RYK-DEGs UP no produjeron ningún enriquecimiento significativo en las categorías BP y Hallmark que sea relevante en el cáncer. Por el contrario, se observó el enriquecimiento de numerosas firmas génicas a partir de sus DEGs DN tanto en la categoría Hallmark como en la categoría BP.

Uno de los puntos más interesantes fue la asociación con la motilidad, migración y locomoción celular observada solo en las muestras MET (**Anexo D.4**). Esta observación indica que el aumento de la expresión de RYK antagoniza el efecto de ROR1 y ROR2 sobre la motilidad, migración y locomoción celular. Otro aspecto destacado es la presencia de firmas enriquecidas en la categoría Hallmark (interferón gamma, respuesta inflamatoria, señalización de IL2 STAT5, etc.) (**Tabla 6**) y en la categoría BP (**Anexo D.4**), que están asociadas con la respuesta inmune. Esta observación indica que el aumento de la expresión de RYK se asocia con una respuesta inmune reducida. Interesantemente, en este sentido, la expresión de RYK presenta similitudes con la de ROR1.

Estos resultados destacan la utilidad de este tipo de análisis bioinformático, ya que permiten inferir el rol de RYK en melanoma, un receptor que ha sido muy poco estudiado en cáncer. En este caso, se puede plantear un posible vínculo entre la expresión de RYK y la inhibición de la respuesta inmune en melanoma y su posible rol como antagonista de ROR1 y ROR2 en migración celular.

En cuanto a PTK7, tanto los DEGs UP como los DEGs DN de las muestras de melanoma PRI no produjeron ningún enriquecimiento significativo en la categoría Hallmark. Mientras que, las firmas enriquecidas en la categoría BP más relevantes para el cáncer de los PTK7-DEGs UP fueron, al igual que con ROR1, la adhesión y migración celular y la locomoción tanto en muestras PRI como MET (**Anexo D.4**). Este resultado sugiere que, en lo relativo a la migración celular y locomoción, PTK7 se asocia a la promoción de estos procesos al igual que ROR1 y ROR2, en contraste a lo observado con RYK que cumpliría el rol opuesto. Por otra

parte, al evaluar los enriquecimientos obtenidos con PTK7-DEGs DN en muestras MET, se obtuvieron varias firmas genéticas relacionadas con la respuesta inmune (**Tabla 6**) y activación tanto de linfocitos como de leucocitos (**Anexo D.4**). Esas observaciones sugieren que al igual que ROR1 y RYK, la expresión de PTK7 se asocia a un efecto inhibitorio sobre la respuesta inmune.

Interesantemente, al evaluar los enriquecimientos para muestras MET en la categoría Hallmark para los cuatro receptores, se observa que todos ellos se encuentran implicados en la regulación de la respuesta inmune. Se puede observar que las firmas genéticas "HALLMARK ALLOGRAFT REJECTION", "HALLMARK INTERFERON GAMMA RESPONSE", "HALLMARK COMPLEMENT", "HALLMARK INFLAMMATORY RESPONSE", "HALLMARK IL2 STAT5 SIGNALING" fueron enriquecidas en DEGs DN de ROR1, RYK y PTK7 (**Tabla 5** y **6**). De manera similar, en la categoría BP, la activación de leucocitos, el proceso efector inmunológico y la activación de leucocitos se enriquecieron en DEGs DN de ROR1, RYK y PTK7 (**Tabla 5** y **Anexo D.4**). Sorprendentemente, los cinco *hallmarks* descritos anteriormente también se encontraron asociados a ROR2, pero en el listado correspondiente a ROR2-DEGs UP (**Tabla 6**). Estas observaciones indican que al igual que ROR1, RYK y PTK7 se asocian a la inhibición de la respuesta inmune, mientras que, antagónicamente, ROR2 se asocia a la activación de la respuesta inmune.

Otra observación interesante que relaciona a los receptores ROR1, RYK y PTK7 y los ubica en un rol antagónico al de ROR2 es la firma genética "HALLMARK APOPTOSIS". Se puede ver que dicha firma aparece en ROR1-DEGs DN (**Tabla 5**), RYK-DEGs DN, PTK7-DEGs DN y ROR2-DEGs UP (**Tabla 6**) en muestras MET. Este hecho indica que ROR1, RYK y PTK7 se asocian a la inhibición de la apoptosis, mientras que ROR2 se asocia a su activación en MET.

Por otra parte, se trató de analizar la variación de los cuatro receptores a lo largo de la progresión de melanoma. Se puede ver que, si bien no se observan diferencias entre muestras PRI y MET en la categoría "Hallmark" de ROR1-DEGs UP, en la categoría BP solo comparten el 19% de las firmas genéticas (**Tabla 5**), esto sugiere que el papel de ROR1 es distinto a lo largo de la progresión del melanoma. En cambio, en contraposición a ROR1, las firmas enriquecidas de ROR2-DEGs UP son similares en muestras de muestras PRI y MET, lo que sugiere que el papel de ROR2 es similar a lo largo de la progresión del melanoma. Esto se observa en prácticamente la totalidad de las firmas de "Hallmark" (**Tabla 6**), en más del 58% de las firmas de la categoría BP (**Anexo D.4**) y más del 62% en la categoría "Oncogenic MSigDb" (**Anexo D.5**). En el caso de RYK, dado que las firmas de enriquecimiento observadas en las muestras PRI y MET fueron similares, ya que compartieron un 30% de las firmas genéticas (**Tabla 6** y **Anexo D.4**), se puede inferir que el papel de RYK es similar a lo largo de la progresión del melanoma. Al igual que ROR1, y a diferencia de lo descrito tanto para ROR2 como para RYK, el papel de PTK7 parece variar a lo largo de la progresión del melanoma, dado que no se observan similitudes entre las firmas genéticas obtenidas en PRI y MET (**Tabla 6**, **Anexo D.4** y **D.5**).

<table>
<tr><th rowspan="2">Receptor</th><th colspan="2">Enriquecimiento-DEGs UP</th><th colspan="2">Enriquecimiento-DEGs DN</th></tr>
<tr><th>Primario</th><th>Metastásico</th><th>Primario</th><th>Metastásico</th></tr>
<tr><td rowspan="2">ROR2</td><td colspan="2">HALLMARK EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION
HALLMARK KRAS SIGNALING UP
HALLMARK APICAL JUNCTION
HALLMARK MYOGENESIS
HALLMARK COAGULATION
HALLMARK HYPOXIA
HALLMARK UV RESPONSE DN
HALLMARK ESTROGEN RESPONSE EARLY
HALLMARK ESTROGEN RESPONSE LATE
HALLMARK XENOBIOTIC METABOLISM</td><td rowspan="2">——</td><td rowspan="2">——</td></tr>
<tr><td>HALLMARK IL6 JAK STAT3 SIGNALING
HALLMARK COMPLEMENT</td><td>HALLMARK APOPTOSIS (*)
HALLMARK INFLAMMATORY RESPONSE (*)
HALLMARK ALLOGRAFT REJECTION (*)
HALLMARK IL2 STAT5 SIGNALING (*)
HALLMARK IL6 JAK STAT3 SIGNALING (*)
HALLMARK TNFA SIGNALING VIA NFKB (*)
HALLMARK INTERFERON GAMMA RESPONSE (*)
HALLMARK COMPLEMENT (*)
HALLMARK ANGIOGENESIS (*)
HALLMARK P53 PATHWAY (*)
HALLMARK TGF BETA SIGNALING (*)
HALLMARK NOTCH SIGNALING (*)
HALLMARK KRAS SIGNALING DN (*)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">RYK</td><td rowspan="2">——</td><td rowspan="2">——</td><td colspan="2">HALLMARK INTERFERON GAMMA RESPONSE
HALLMARK ALLOGRAFT REJECTION</td></tr>
<tr><td>HALLMARK IL2 STAT5 SIGNALING
HALLMARK INFLAMMATORY RESPONSE</td><td>HALLMARK COMPLEMENT
HALLMARK APOPTOSIS
HALLMARK P53 PATHWAY (*)
HALLMARK APICAL JUNCTION (*)
HALLMARK IL2 STAT5 SIGNALING (*)
HALLMARK INFLAMMATORY RESPONSE (*)</td></tr>
<tr><td>PTK7</td><td>——</td><td>——</td><td>——</td><td>HALLMARK ALLOGRAFT REJECTION
HALLMARK INTERFERON GAMMA RESPONSE
HALLMARK INFLAMMATORY RESPONSE
HALLMARK COMPLEMENT
HALLMARK IL2 STAT5 SIGNALING
HALLMARK KRAS SIGNALING UP
HALLMARK INTERFERON ALPHA RESPONSE
HALLMARK IL6 JAK STAT3 SIGNALING
HALLMARK TNFA SIGNALING VIA NFKB
HALLMARK APOPTOSIS</td></tr>
</table>

Tabla 6. Enriquecimiento de los DEGs UP y DN de ROR2, RYK y PTK7 para la categoría "Hallmark". *Se muestran las firmas genéticas enriquecidas de los DEGs UP y DN de ROR2, RYK y PTK7 para la categoría "Hallmark" en los tres datasets analizados de melanomas PRI o MET obtenidas en ShinyGo 0.80. (*) Firma genética enriquecida en dos de las tres BDs analizados para las muestras PRI o MET. PRI: primarios, MET: metastásicos.*

4.1.3.3 Análisis de ROR1 vs ROR2 en TEM

A pesar de los avances realizados en la comprensión del rol de ROR1 y ROR2 en cáncer, aún no está claro cuál es la relación entre ambos receptores. Se ha demostrado que tanto ROR1 como ROR2 contribuyen a la progresión del melanoma e impulsan TEM (208,282). Sin embargo, O'Connell y col. presentaron datos que indicaban que ROR1 y ROR2 regulan negativamente la expresión del otro, lo que parece indicar que ambos receptores podrían tener funciones opuestas en la progresión del melanoma (212).

Dado que hasta el momento hay muy pocos trabajos que hayan estudiado a ROR1 y ROR2 simultáneamente, se decidió utilizar el análisis bioinformático para comparar el papel de ROR1 y ROR2 en la progresión de la enfermedad en pacientes con melanoma.

En primer lugar, se quiso verificar la observación de O'Connell, y para ello se calculó el coeficiente de correlación de Pearson de la expresión de ROR1 y ROR2 (**Tabla 7**). Como se observa en los seis grupos de datos analizados, ROR1 y ROR2 presentaron un coeficiente de Pearson positivo, sugiriendo que la expresión de ROR1 y ROR2 tiene una relación directa y lleva a descartar la posibilidad de una regulación negativa entre ellos. Más aún, en tres de las bases de datos analizadas la correlación positiva es estadísticamente significativa, lo cual permite suponer que, en lugar de tener funciones opuestas, ambos receptores tendrían un impacto cualitativo de similar tenor en la evolución de la enfermedad.

Melanoma	Dataset	r
Primario	TCGA-Pri	0.1
	GSE98394	0.47*
	GSE112509	0.25
Metastásico	TCGA-Met	0.3*
	GSE53118	0.18
	GSE169203	0.76*

Tabla 7. Nivel de correlación en la expresión de ROR1 vs ROR2 en seis datasets de melanoma. *Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) en los seis datasets PRI y MET indicados. *: $p < 0.05$.*

Una de las coincidencias más salientes del análisis realizado en secciones anteriores con publicaciones previas, es que tanto ROR1 como ROR2 promueven TEM en melanoma. Ante este resultado, se quiso investigar en mayor detalle si el aporte de ROR1 y ROR2 a la TEM es redundante o complementario.

El análisis de los enriquecimientos reveló que la expresión elevada de ROR1 y ROR2 está asociada con TEM en los seis datasets analizados (**Tabla 5** y **6**). El enriquecimiento en Hallmark TEM fue mayor para los DEGs de ROR2 que para los de ROR1. En consonancia con esto, la lista de ROR2-DEGs UP incluye 140 de los 200 genes distintivos de TEM, mientras que la lista de ROR1-DEGs UP incluye 90 de estos 200 genes (considerando los seis datasets). De estos 90 genes TEM para ROR1, 76 se comparten con los genes TEM de ROR2 y 14 están asociados exclusivamente con ROR1. Para evaluar más a fondo si existe relación en la expresión de estos 14 genes TEM con ROR2, se calculó la correlación de Pearson de la expresión de cada uno de ellos y la de ROR1 y ROR2. Como se esperaba, se observó que la expresión de la mayoría de estos genes se correlaciona con la de ROR1, mientras que la

correlación con ROR2 no fue significativa (**Fig. 27**). Este resultado indica que al menos una fracción de los genes TEM asociados con ROR1 (CALD1, FERMT2, ITGAV, ITGB1, MATN2, SNTB1, VEGFA y OXTR) no están regulados por ROR2.

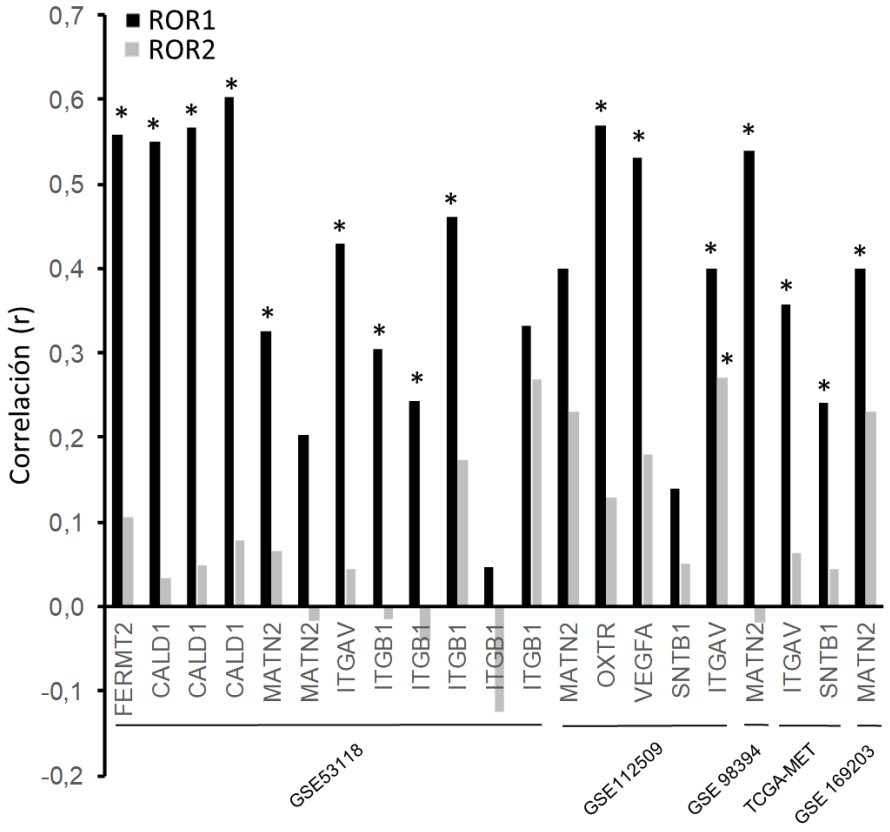


Fig. 27. Relación entre ROR1/ROR2 y los genes TEM asociados exclusivamente con ROR1. *El gráfico muestra la correlación de Pearson de la expresión de ROR1 o ROR2 con los genes TEM asociados exclusivamente con ROR1. *: p < 0.05.*

El mayor número de DEGs y un mayor enriquecimiento en la categoría Hallmark TEM observado para ROR2 en comparación con ROR1 podrían sugerir que ROR2 tiene un papel más relevante en TEM que ROR1. Esta cuestión fue analizada en mayor profundidad en el dataset TCGA-MET, el grupo de datos con mayor número de muestras de los datasets analizados. En este dataset, ROR2 se asocia con 137 genes TEM y ROR1 con 67. De estos 67 genes, 62 también estaban presentes en la lista de DEGs de ROR2. Para evaluar el impacto de ROR1 en TEM, la expresión de estos 62 genes se analizó en dos grupos de pacientes. El grupo 1 (G1) incluye 38 pacientes con nivel alto de ROR2 y que no presentan un nivel alto de ROR1. El grupo 2 (G2) está compuesto por 14 pacientes que expresan tanto ROR1 como ROR2 en un nivel alto. Para casi la mitad de los 62 genes TEM (28 genes, 45%) el nivel de expresión fue significativamente mayor en el G2 que en el G1 (**Fig. 28**). Esto indica que la elevada expresión simultánea de ROR1 y ROR2 se asocia con una mayor expresión de genes TEM y confirma un papel relevante de ROR1 en la regulación de TEM.

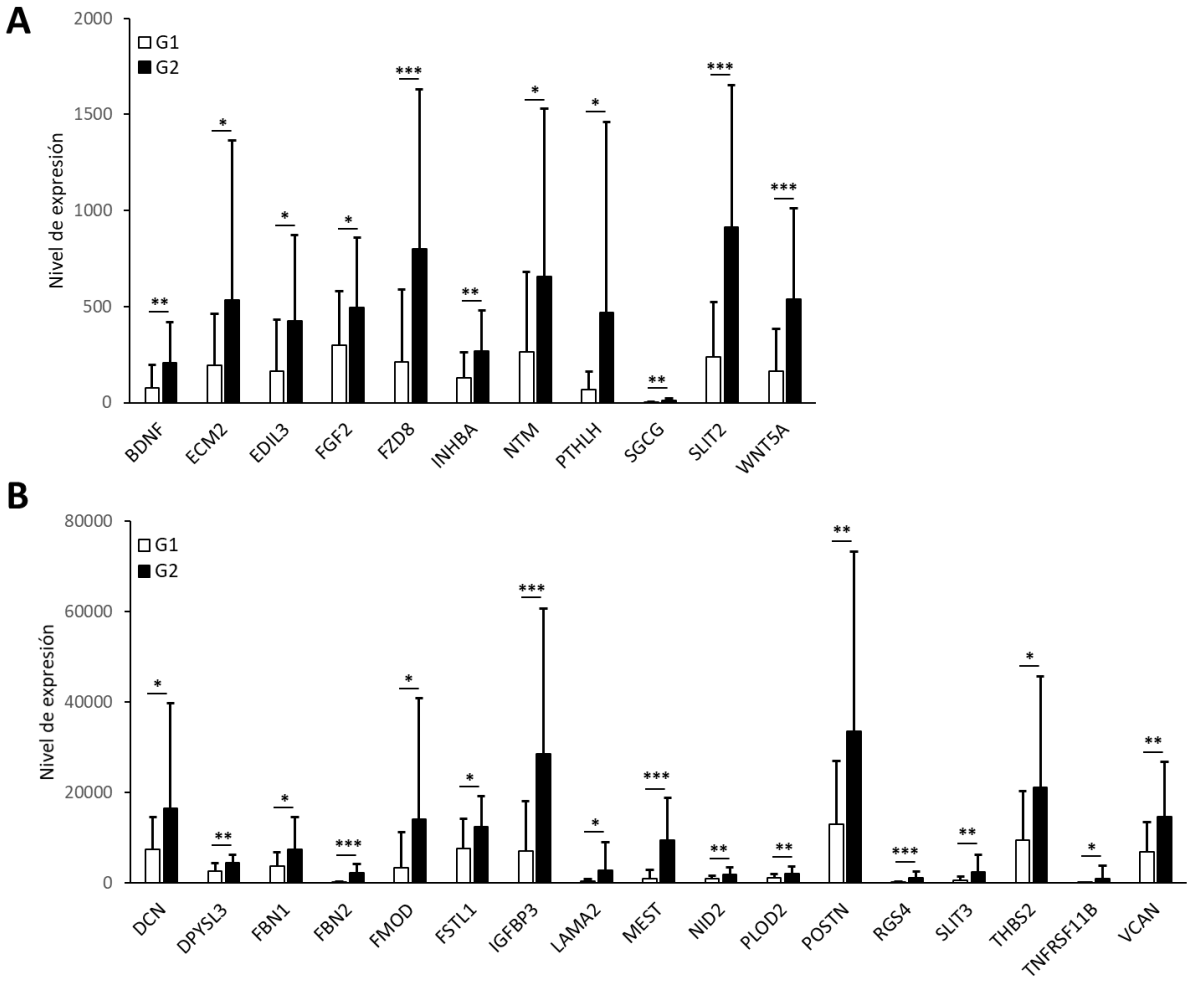


Fig. 28. Relevancia de ROR1 en la expresión de genes TEM regulados por ROR1 y ROR2. *(A) y (B) Gráfico de barras de la expresión de genes TEM regulados positivamente por ROR1 y ROR2 y que presentan expresión diferencial entre G1 y G2. G1: grupo de pacientes (38) que presentan nivel alto de ROR2 y no de ROR1. G2: grupo de pacientes (14) que presentan niveles altos de ROR1 y ROR2. La expresión de estos genes se muestra en dos gráficos distintos, el gráfico superior incluye genes con bajos niveles de expresión y el gráfico inferior genes con un alto nivel de expresión. La significancia estadística se calculó utilizando t-Student.* *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Estos resultados respaldan la conclusión de que, además de las funciones superpuestas obvias, ROR1 y ROR2 también tienen funciones no redundantes en la promoción de la TEM, tanto por regular un conjunto distintivo de genes (mayor en el caso de ROR2) como por ser necesarios para lograr una expresión elevada de algunos de ellos.

4.1.3.4 Análisis de ROR1 vs ROR2 en Apoptosis

Una diferencia interesante entre los DEGs de ROR1 y ROR2 es el enriquecimiento contrastante en la categoría Hallmark "APOPTOSIS" en los datasets de MET. Esta categoría se enriqueció tanto en los ROR1-DEGs DN (en 3 datasets) como en los ROR2-DEGs UP (en 2 datasets) (**Tabla 5** y **6**). El enriquecimiento en ROR1-DEGs DN está de acuerdo con el papel

conocido de ROR1 en la promoción de la supervivencia celular contrarrestrando la apoptosis (166). Respecto a ROR2, se ha descrito un rol dual en la apoptosis en diferentes tipos de tumores (167). En el caso de melanoma no se ha estudiado su función en este proceso celular. Este análisis sugiere que ROR2 se asocia a la promoción de la apoptosis, teniendo así un papel opuesto al de ROR1 que se asocia a la prevención de la misma. La comparación entre los ROR1-DEGs DN y los ROR2-DEGs UP observados en Hallmark "APOPTOSIS" mostró muy poca superposición, lo que sugiere que ROR1 y ROR2 se asociaron con diferentes genes implicados en la apoptosis (**Fig. 29**).

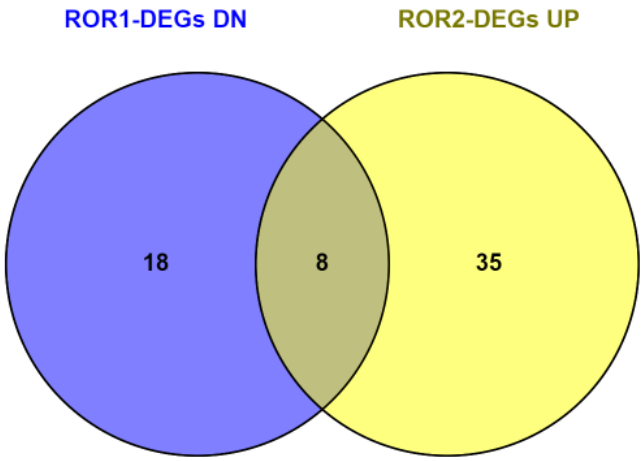


Fig. 29. Superposición entre los ROR1-DEGs DN y los ROR2-DEGs UP observados en la firma genética "HALLMARK APOPTOSIS". *Gráfico de Venn para los genes obtenidos de la firma genética "HALLMARK APOPTOSIS" de los ROR1-DEGs DN y los ROR2-DEGs UP.*

4.1.4 ROR1 protege contra la muerte celular apoptótica en melanoma

Uno de los resultados más interesantes que surgió del análisis bioinformático es que una mayor expresión de ROR1 se asocia a una disminución en la expresión de genes que inducen la muerte celular apoptótica en pacientes con melanoma. A partir de esta observación se decidió confirmar experimentalmente este hallazgo, ya que esta vinculación no ha sido estudiada hasta el presente en melanoma. Para ello se utilizaron las líneas con sobreexpresión y silenciamiento de ROR1 descriptas anteriormente.

4.1.4.1 ROR1 disminuye la apoptosis en melanoma

Para comenzar a evaluar el efecto de ROR1 en la apoptosis se decidió medir el grado de clivaje de CASP3 (*Caspase-3*) y de PARP1 (*Poly ADP-ribose polymerase 1*). Al evaluar el grado de clivaje de la caspasa se evalúa su grado de activación, el cual se refleja también en el grado de clivaje de PARP1. Por lo que la medición de un aumento en el clivaje de ambas proteínas es un indicador de un aumento en la apoptosis.

Por consiguiente, se midió el clivaje de PARP1 y CASP3 tanto en la línea celular de sobreexpresión como de silenciamiento de ROR1 en células A375, al tratar con distintas drogas que inducen la apoptosis. Se utilizaron dos drogas, PLX-4032 (PLX), también conocido como Vemurafenib, un potente inhibidor de la quinasa BRAF mutada en la vía MEK/ERK, el cual se ha visto que induce apoptosis en células A375 (283) y es comúnmente usada en tratamientos contra el melanoma; y camptotecina (Camp), una droga citotóxica que inhibe a la ADN topoisomerasa I induciendo la apoptosis en melanoma (284,285). Consiguientemente, células A375-Vacío y A375-ROR1 fueron tratadas con 28.5 µM de PLX o con 0.85 µM de Camp y células A375-SCR, A375-shROR1 B fueron tratadas con 20 µM de PLX o con 0.75 µM de Camp por 20 hs a 37 °C y 5% CO_2, utilizando DMSO (dimetilsulfóxido) como control de los tratamientos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizaron extractos proteicos celulares de cada condición y se evaluaron los resultados por WB. En la **Fig. 30** se observan los resultados obtenidos para las isoformas de PARP1 clivado correspondiente a 90 y 70 kDa y en la **Fig. 31** para las isoformas clivadas de CASP3 correspondientes a 19 y 17 kDa.

La sobreexpresión de ROR1 disminuyó significativamente la isoforma clivada de PARP1 correspondiente a 90 kDa inducida por el tratamiento con Camp y las isoformas correspondiente a 90 y 70 kDa inducida por el tratamiento con PLX (**Fig. 30A**). En concordancia, el silenciamiento de ROR1 aumentó significativamente la isoforma clivada de PARP1 correspondiente a 90 kDa inducida por el tratamiento con Camp (**Fig. 30B**).

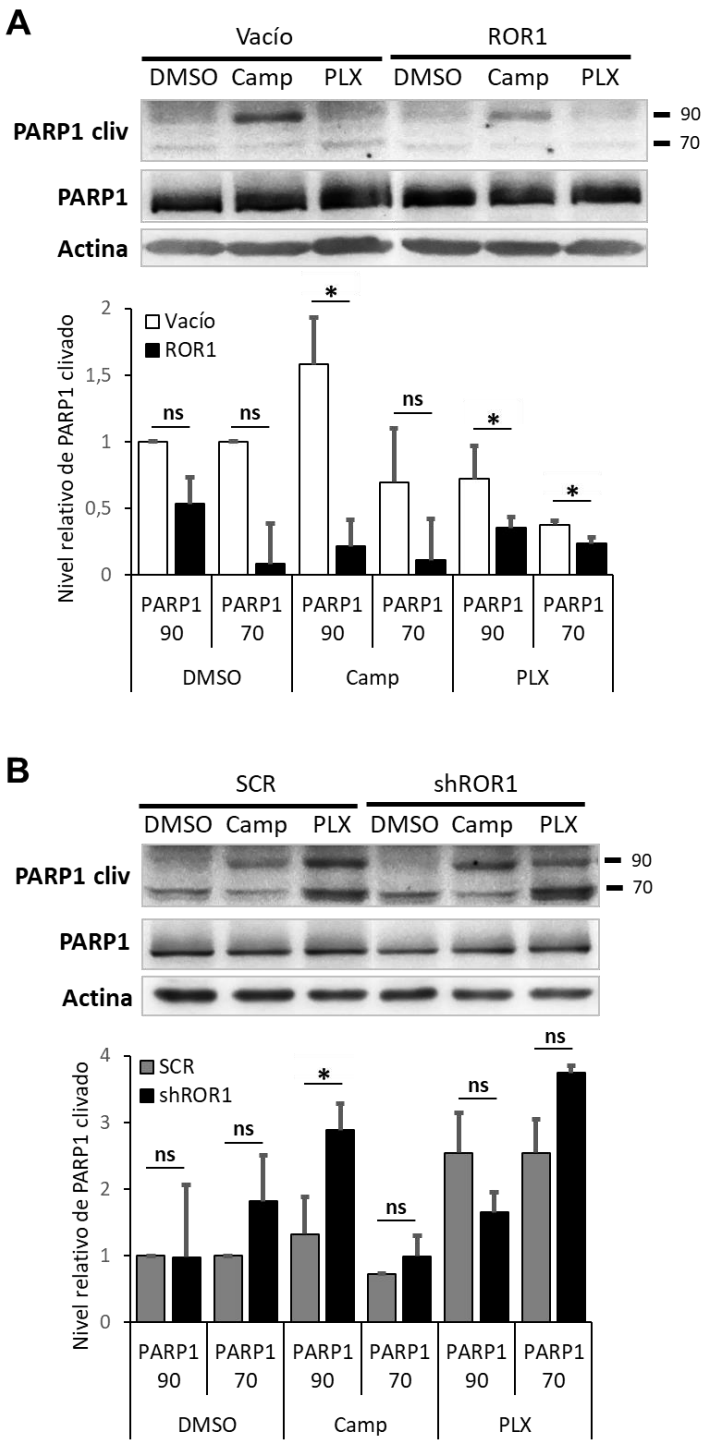


Fig. 30. ROR1 disminuye el clivaje de PARP1 inducido por PLX-4032 o camptotecina. *(A) Extractos proteicos de células A375-vacío y A375-ROR1, tratadas con 0.85 µM de Camp o 28.5 µM de PLX por 20 hs, utilizando DMSO como control de los tratamientos, se evaluaron por WB para medir los niveles de PARP1 y PARP1 clivado. (B) Extractos proteicos de células A375-SCR y A375-shROR1 B, tratadas con 0.75 µM de Camp o 20 µM de PLX por 20 hs, se evaluaron por WB para medir los niveles de PARP1 y PARP1 clivado. La actina fue utilizada como control de carga. Los marcadores de 90 y 70 kDa, que corresponden a formas de PARP1 clivado, se indican en los paneles. Los gráficos de barras muestran la media ± DE (n = 3) de los niveles de PARP1 clivado normalizados a PARP1 sin clivar. La significancia estadística se calculó utilizando ANOVA + prueba de Tukey. Camp: camptotecina, PLX: PLX-4032, cliv: clivado, ns: no significativo. *: p < 0.05.*

Por otra parte, al sobreexpresar ROR1 se observó una disminución en la isoforma clivada de CASP3 correspondiente a 19 kDa inducida por el tratamiento con Camp (**Fig. 31A**). En concordancia, con el silenciamiento de ROR1 se observó un aumento de las isoformas clivadas de CASP3 correspondientes a 23 y 19 KDa, siendo mayor el aumento en esta última (**Fig. 31B**). Cabe mencionar que también se realizaron los ensayos de WB para evaluar el efecto de ROR1 al tratar con PLX pero las bandas correspondientes a las isoformas clivadas de CASP3 fueron apenas perceptibles dificultando sumamente su análisis (datos no mostrados).

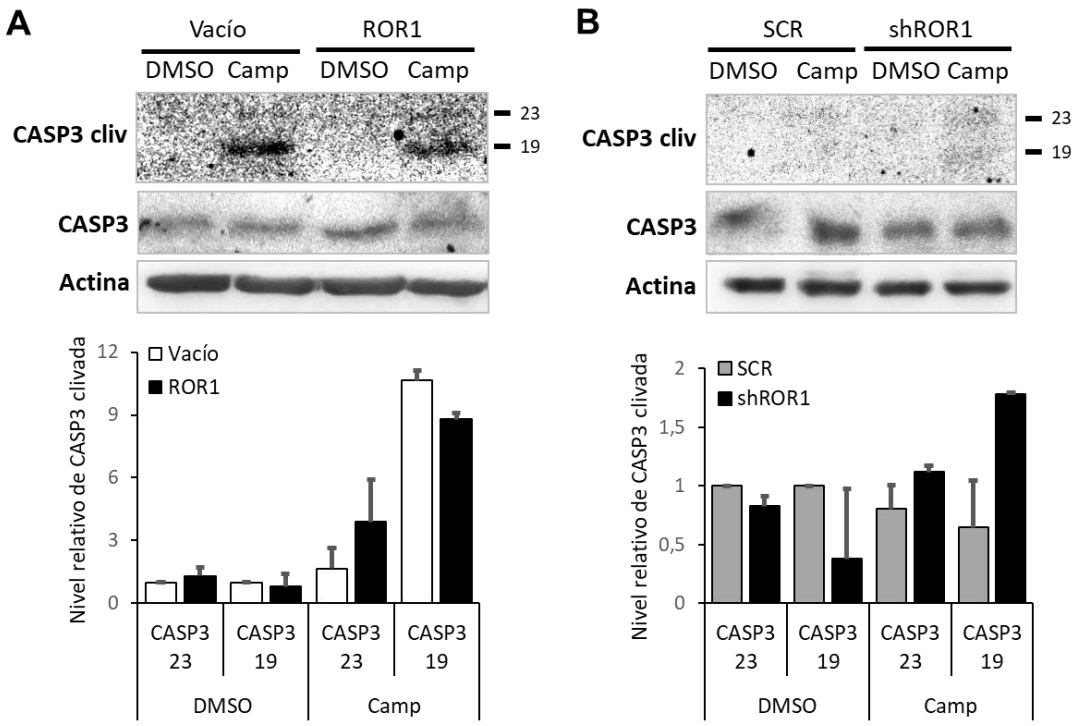


Fig. 31. ROR1 disminuye el clivaje de CASP3 inducido por Camp. *(A) Extractos proteicos de células A375-vacío y A375-ROR1, tratadas con 0.85 µM de Camp por 20 hs, utilizando DMSO como control del tratamiento, se evaluaron por WB para medir los niveles de CASP3 y CASP3 clivada. (B) Extractos proteicos de células A375-SCR y A375-shROR1 B, tratadas con 0.75 µM de Camp por 20 hs, se evaluaron por WB para medir los niveles de CASP3 y CASP3 clivada. La actina fue utilizada como control de carga. Los marcadores de 23 y 19 kDa, que corresponden a formas de CASP3 clivada, se indican en los paneles. Los gráficos de barras muestran la media ± DE (n = 2) de los niveles de CASP3 clivada normalizados a CASP3 sin clivar. Camp: camptotecina, cliv: clivada.*

Estos resultados indican que ROR1 reduce el clivaje de PARP1 y CASP3, reflejando una disminución de la actividad de caspasas y de la apoptosis.

Para confirmar los resultados anteriores se decidió evaluar el efecto de ROR1 sobre la muerte celular por apoptosis mediante citometría de flujo por tinción con Anexina V e ioduro de propidio (IP). La Anexina V es una proteína que tiene la capacidad de unirse a la fosfatidilserina, el cual resulta expuesta por la célula en una etapa temprana de la apoptosis.

El IP es un agente intercalante de ADN fluorescente, por lo que tiñe al ADN si hay ruptura de la membrana plasmática. Como el IP no es permeable a la membrana, lo hace útil para diferenciar células necróticas, apoptóticas y sanas, ya que en la muerte por apoptosis no hay ruptura de la membrana plasmática. Para este análisis se utilizaron las células A375 con sobreexpresión y silenciamiento de ROR1, y células M2 con sobreexpresión de ROR1, tratadas con distintas drogas que inducen la apoptosis.

Cabe mencionar que, en todos los ensayos de citometría de flujo, luego de los tratamientos inductores de la muerte celular pudo observarse la aparición sistemática de dos poblaciones bien diferenciadas. Una población correspondiente a tinción positiva con Anexina V y negativa a IP, que será llamada población de apoptosis temprana (Ap. Temprana) y otra población correspondiente a doble tinción positiva de Anexina V e IP, la cual será llamada población de apoptosis tardía (Ap. Tardía).

En primer lugar, se evaluó qué enzima proteolítica usar con el fin de lograr desprender las células que crecen adheridas a la placa minimizando la mortalidad celular generada durante este proceso. Para ello se utilizaron células A375 wt (*wild type*) y se probó la enzima tripsina y acutasa, una mezcla de enzimas proteolíticas y colagenolíticas. Los resultados obtenidos se muestran en la **Fig. 32**. Para analizar la **Fig. 32**, al igual que en los siguientes experimentos de citometría de flujo, se determinó la muerte celular evaluando las poblaciones celulares "Ap. Temprana" y "Ap. Tardía", que fueron descriptas en el párrafo anterior. En este caso se definió el porcentaje de apoptosis total como la suma de los porcentajes de Ap. Temprana + Ap. Tardía. Como se puede ver, la acutasa produjo una apoptosis total media del 5.8%, menor a la producida al utilizar tripsina, que fue del 8.5% (**Fig. 32B**). Por este motivo, se seleccionó la acutasa para los ensayos posteriores.

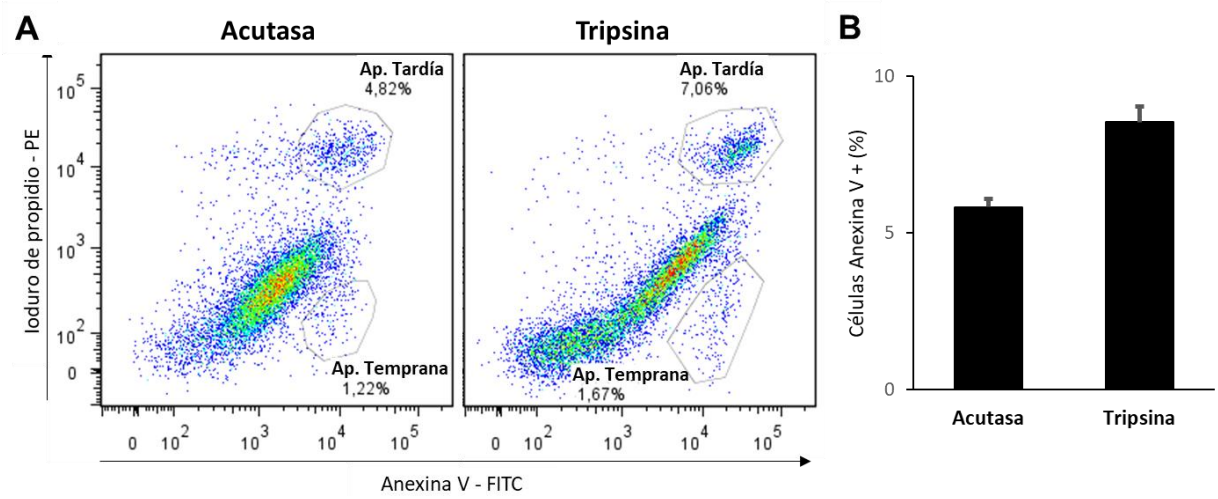


Fig. 32. La enzima acutasa provoca menor muerte celular que la tripsina. *(A) Células A375 wt crecidas en DMEM 10% SFB fueron incubadas con acutasa o tripsina por 5 min a Temp. amb. o 37 °C respectivamente, se tiñeron con Anexina V/IP y se analizaron por citometría de flujo. Se muestran gráficos de puntos representativos de cada condición experimental. (B) Gráfico de barras de la media ± DE (n = 2) del porcentaje de células positivas a Anexina V del experimento en (A). Ap.: Apoptosis.*

Para inducir apoptosis en las células A375 con sobreexpresión de ROR1 se utilizaron las drogas PLX, cisplatino (Cis), doxorrubicina (Dox) y estaurosporina (STS). El Cis es un agente quimioterapéutico usado contra el cáncer, el cual induce la apoptosis intrínseca dada su capacidad de insertarse en el ADN (74). La Dox puede intercalarse en el ADN, resultando en un potente agente citotóxico utilizado en distintos tipos de cánceres (286). Una vez intercalado bloquea la replicación del ADN al bloquear a la topoisomerasa II. La STS es un potente inhibidor de las proteínas quinasas e inductor de apoptosis (287–289).

Para comenzar a analizar el efecto de ROR1 sobre la apoptosis, se evaluó si la sobreexpresión de ROR1 por sí sola influye en la apoptosis basal de las células A375. Para ello células A375- Vacío y A375-ROR1 fueron incubadas por 24 hs con DMEM 10% SFB a 37 °C y 5% CO_2, y se evaluó la apoptosis por citometría de flujo. Como se observa en la **Fig. 33**, si bien se observó una tendencia de un menor porcentaje de células positivas a Anexina V en la línea A375-ROR1 respecto a las células control A375-vacío, las diferencias obtenidas en Ap. Temprana y Ap. Tardía no fueron significativas.

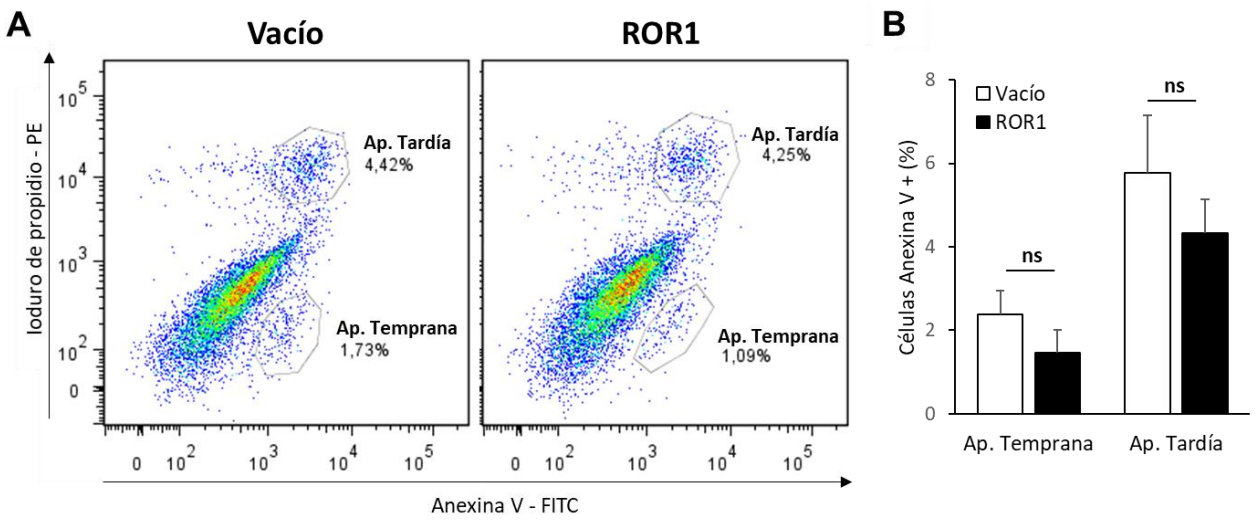
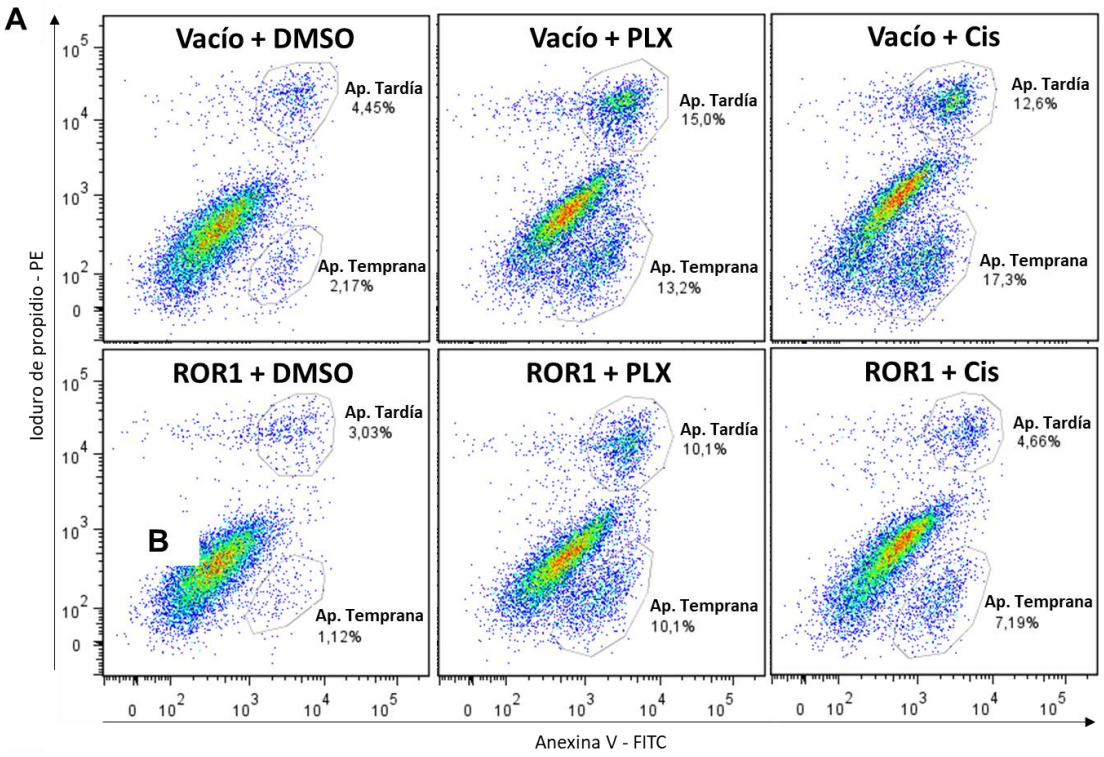
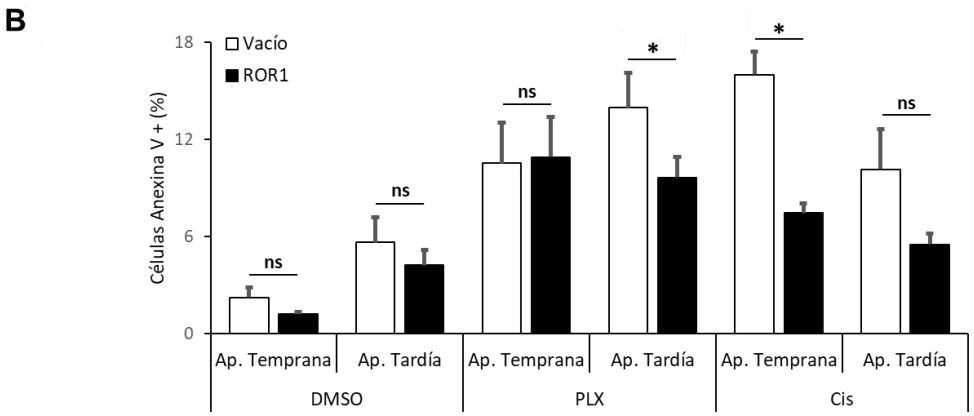


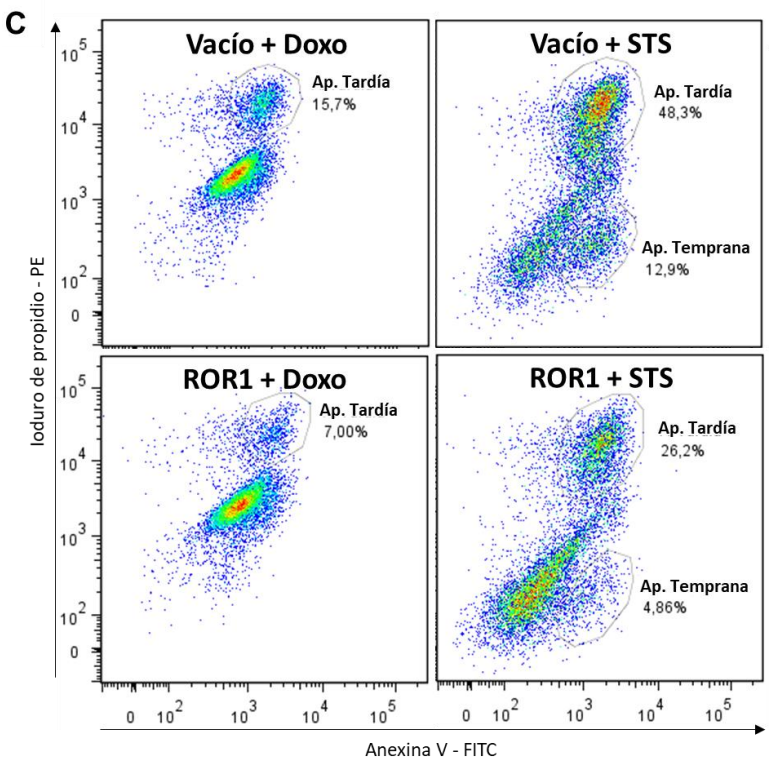
Fig. 33. La sobreexpresión de ROR1 no afecta la apoptosis basal en condiciones normales de crecimiento. *Células A375-vacío y A375-ROR1 fueron incubadas por 24 hs con DMEM 10% SFB, se tiñeron con Anexina V/IP y se analizaron por citometría de flujo. (A) Se muestran gráficos de puntos representativos de cada condición experimental. (B) Gráfico de barras de la media ± DE (n = 3) del porcentaje de células positivas a Anexina V del experimento en (A). La significancia estadística se calculó utilizando ANOVA + prueba de Tukey. Ap.: Apoptosis, ns: no significativo. *: p < 0.05.*

Luego se analizó por citometría de flujo el efecto de la incubación por 24 hs con 28.5 µM de PLX, 40 µM de Cis, 2 µM de Dox y 0.5 µM de STS en las células A375-vacío y A375-ROR1, utilizando DMSO como control de los tratamientos. En la **Fig. 34** puede observarse que la sobreexpresión de ROR1 disminuyó significativamente el porcentaje de apoptosis temprana/tardía inducida por cada droga al comparar el porcentaje obtenido para las células A375-ROR1 respecto de las células A375-vacío. En el caso del tratamiento con Cis, ROR1

disminuyó significativamente la media de la Ap. Temprana de 16.0% a 7.5% (**Fig. 34B**). Por otra parte, en los tratamientos con PLX, Dox y STS, ROR1 disminuyó significativamente la Ap. Tardía de 14.0% a 9.6%, de 14.4% a 8.6% y de 39.9% a 32%, respectivamente (**Fig. 34 B-C**).


A
Vacío + DMSO
Ap. Tardía 4,45%
Ap. Temprana 2,17%
Vacío + PLX
Ap. Tardía 15,0%
Ap. Temprana 13,2%
Vacío + Cis
Ap. Tardía 12,6%
Ap. Temprana 17,3%
ROR1 + DMSO
Ap. Tardía 3,03%
Ap. Temprana 1,12%
B
ROR1 + PLX
Ap. Tardía 10,1%
Ap. Temprana 10,1%
ROR1 + Cis
Ap. Tardía 4,66%
Ap. Temprana 7,19%
Ioduro de propidio - PE
Anexina V - FITC


B
Vacío
ROR1
Células Anexina V + (%)
ns
*
Ap. Temprana
Ap. Tardía
DMSO
PLX
Cis


C
Vacío + Doxo
Ap. Tardía 15,7%
Vacío + STS
Ap. Tardía 48,3%
Ap. Temprana 12,9%
ROR1 + Doxo
Ap. Tardía 7,00%
ROR1 + STS
Ap. Tardía 26,2%
Ap. Temprana 4,86%
Ioduro de propidio - PE
Anexina V - FITC

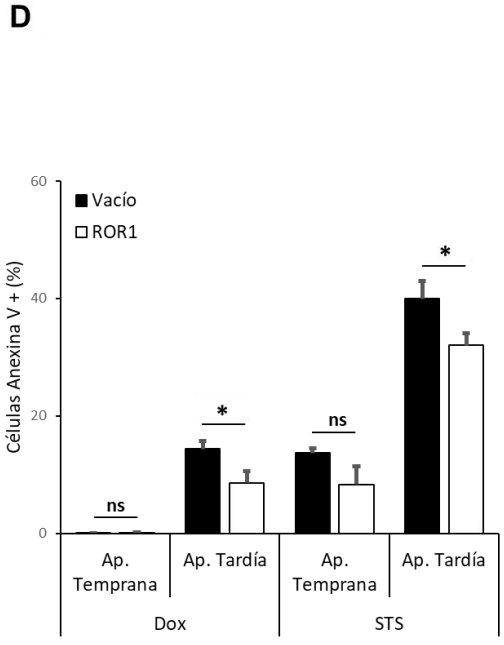

D
Vacío
ROR1
Células Anexina V + (%)
ns
*
Ap. Temprana
Ap. Tardía
Dox
STS

Fig. 34. ROR1 disminuye la apoptosis inducida por PLX, Cis, Dox y STS en células A375. *Células A375-vacío y A375-ROR1 fueron incubadas por 24 hs con 28.5 µM de PLX, 40 µM de Cis, 2 µM de Dox y 0.5 µM de STS, utilizando DMSO como control de los tratamientos, se tiñeron con Anexina V/IP y se analizaron por citometría de flujo. (A, C) Se muestran gráficos de puntos representativos de cada condición experimental, todos perteneces a un mismo experimento (B) Gráfico de barras de la media ± DE (n = 3) del porcentaje de células positivas a Anexina V del experimento en (A). (D) Gráfico de barras de la media ± DE (n = 3) del porcentaje de células positivas a Anexina V del experimento en (C). Se muestran las condiciones experimentales en dos paneles de gráficos de puntos y en dos gráficos para su mejor visualización. La significancia estadística se calculó utilizando ANOVA + prueba de Tukey. Ap.: Apoptosis, PLX: PLX-4032, Cis: cisplatino, Dox: doxorrubicina, STS: estaurosporina, ns: no significativo. *: p < 0.05.*

Se decidió reafirmar los resultados obtenidos ensayando con otra línea celular de sobreexpresión de ROR1. Para ello se analizó por citometría de flujo el efecto de la incubación por 24 hs con 66.5 µM de PLX y 0.5 µM de STS en células M2-vacío y M2-ROR1. Los resultados obtenidos se muestran en la **Fig. 35**. En los tratamientos con PLX y STS, ROR1 disminuyó la media de la Ap. Tardía de 20.2% en M2-vacío a 10.0% en M2-ROR1, y de 50.4% en M2-vacío a 46.4% en M2-ROR1, respectivamente (**Fig. 35B**).

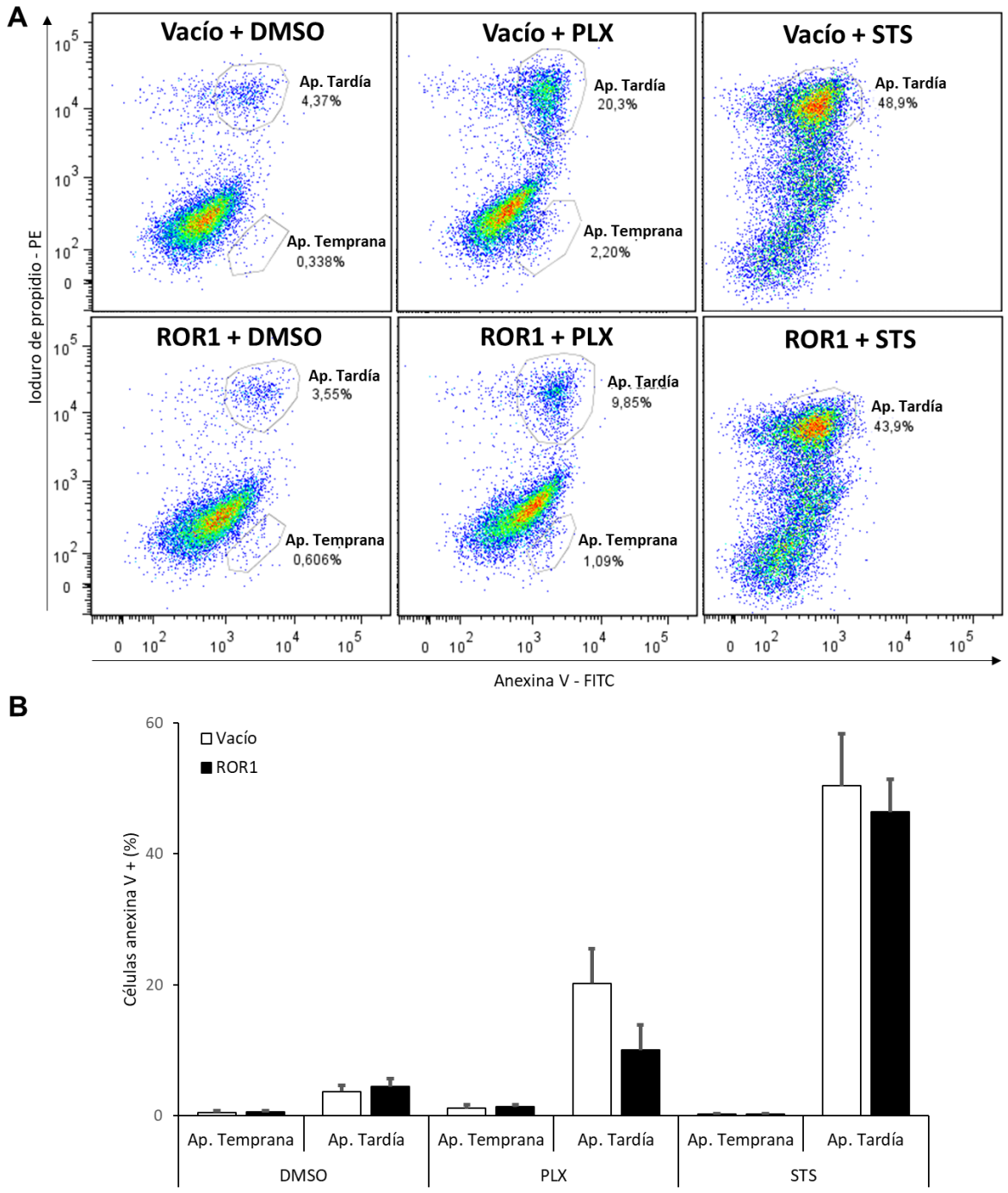


Fig. 35. ROR1 disminuye la apoptosis inducida por PLX y STS en células M2. *Células M2-vacío y M2-ROR1 fueron incubadas por 24 hs con 66.5 µM de PLX, y 0.5 µM de STS, utilizando DMSO como control de los tratamientos, se tiñeron con Anexina V/IP y se analizaron por citometría de flujo. (A) Se muestran gráficos de puntos representativos de cada condición experimental. (C) Gráfico de barras de la media ± DE (n = 2) del porcentaje de células positivas a Anexina V del experimento en (A). Ap.: Apoptosis, PLX: PLX-4032, STS: estaurosporina.*

Estos resultados indican que la sobreexpresión de ROR1 disminuye la apoptosis inducida por PLX, Cis, Dox y STS.

Para confirmar los resultados anteriores se evaluó el efecto del silenciamiento de ROR1 en células A375. Para tal fin, se analizó por citometría de flujo el efecto de la incubación por 24 hs con 12.5 µM de PLX y 0.6 µM de Camp, utilizando DMSO como control de los tratamientos.

Al igual que para el caso de sobreexpresión de ROR1, en primer lugar, se analizó si el silenciamiento de ROR1 por sí solo influye en la apoptosis basal de las células A375. Para ello células A375-SCR, A375-shROR1 A y A375-shROR1 B fueron incubadas por 24 hs con DMEM 10% SFB a 37 °C y 5% CO_2, y se evaluó la apoptosis por citometría de flujo. La **Fig. 36** muestra que no se observan diferencias significativas en la Ap. Temprana ni Ap. Tardía en las células A375-shROR1 A o A375-shROR1 B respecto de las células A375-SCR.

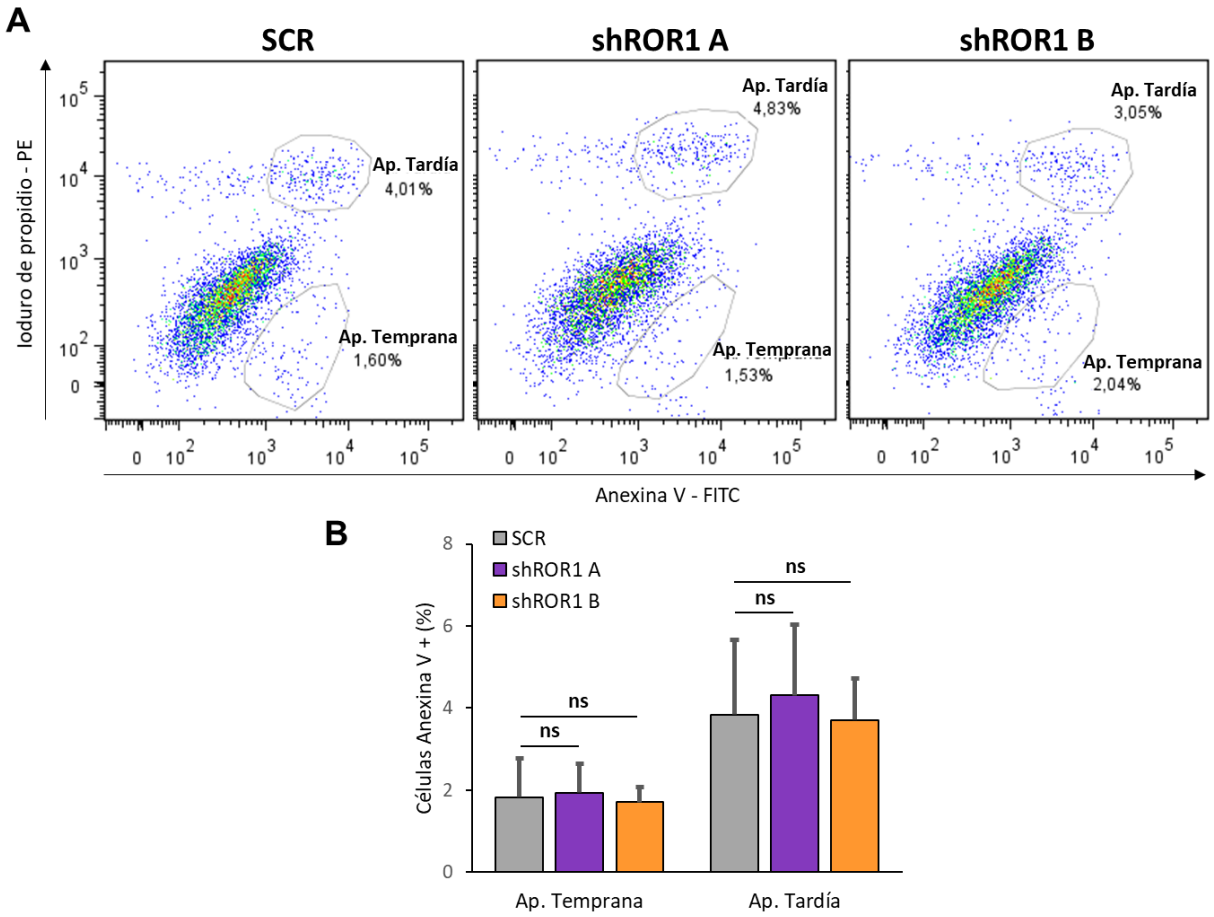


Fig. 36. El silenciamiento de ROR1 no afecta la apoptosis basal en condiciones normales de crecimiento. *Células A375-SCR, A375-shROR1 A y A375-shROR1 B fueron incubadas por 24 hs con DMEM 10% SFB, se tiñeron con Anexina V/IP y se analizaron por citometría de flujo. (A) Se muestran gráficos de puntos representativos de cada condición experimental. (B) Gráfico de barras de la media ± DE (n = 6) del porcentaje de células positivas a Anexina V del experimento en (A). La significancia estadística se calculó utilizando ANOVA + prueba de Tukey. Ap.: Apoptosis. ns: no significativo.*

Al evaluar la inducción de la apoptosis provocada por el tratamiento con Camp, se observó que el silenciamiento de ROR1 aumentó significativamente Ap. Tardía de 23.4% para A375-SCR a 35.7% para A375-shROR1 A y a 40.8% para A375-shROR1 B (**Fig. 37**).

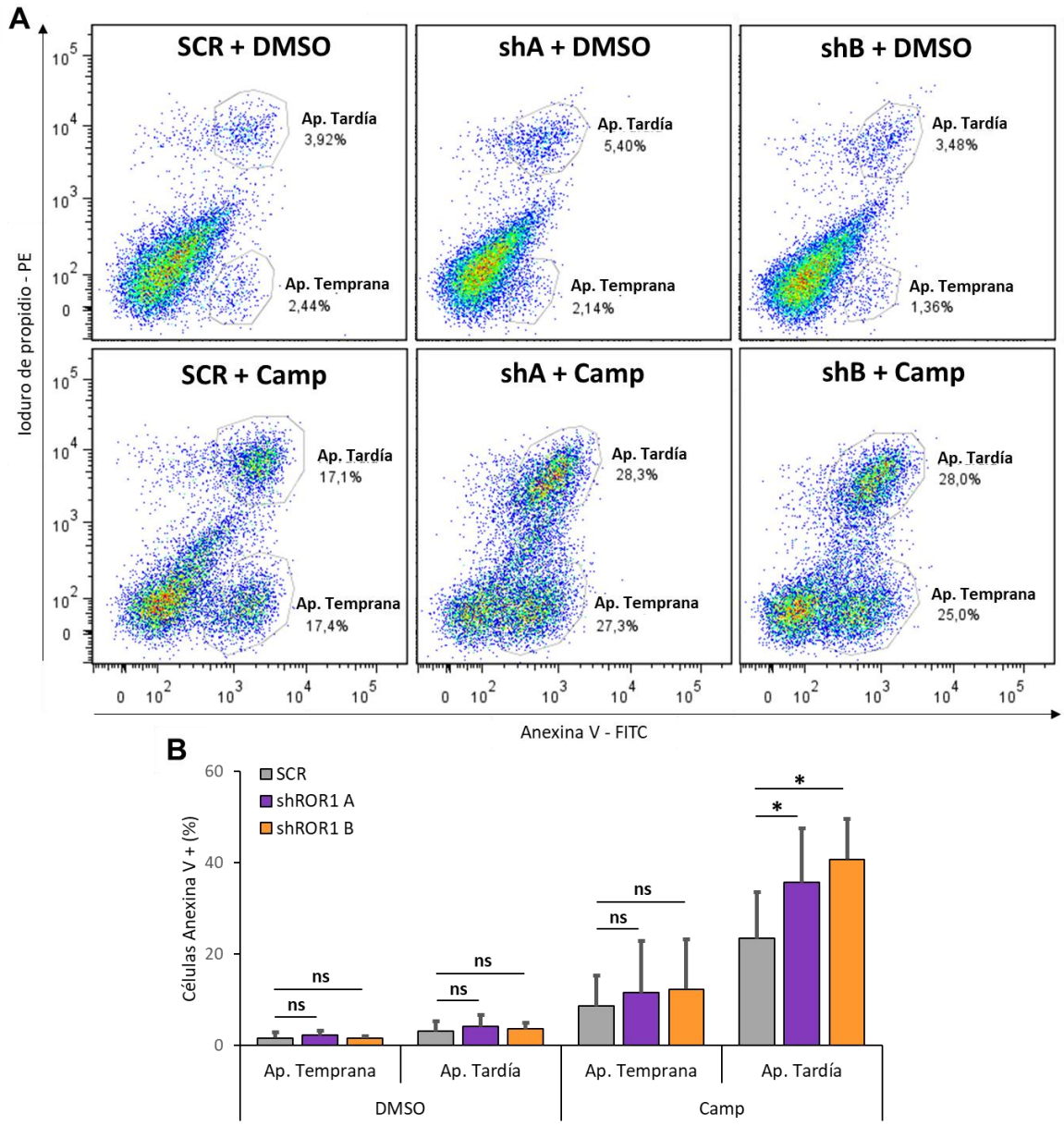


Fig. 37. El silenciamiento de ROR1 aumenta la apoptosis inducida por Camp en células A375. *(A) Células A375-SCR, A375-shROR1 A y A375-shROR1 B fueron tratadas con 0.6 µM de Camp por 24 hs, utilizando DMSO como control del tratamiento, se tiñeron con Anexina V/IP y se analizaron por citometría de flujo. En cada panel se muestran gráficos de puntos representativos de cada condición experimental. (B) Gráfico de barras de la media ± DE (n = 4) del porcentaje de células positivas a Anexina V respecto del total del experimento en (A). La significancia estadística se calculó utilizando ANOVA + prueba de Tukey. Ap.: Apoptosis, Camp: camptotecina, ns: no significativo. *: p < 0.05.*

En el caso del tratamiento con PLX, los resultados muestran que la apoptosis tardía inducida por dicha droga aumenta significativamente al silenciar ROR1 (**Fig. 38**). Para A375-

shROR1 A, al tratar con PLX, la Ap. Tardía fue de 11.9% respecto de la obtenida para A375-SCR que fue del 8.9% (**Fig. 38B**). En el caso de A375-shROR1 B, al tratar con PLX, la Ap. Tardía fue de 12.2% respecto de la obtenida para A375-SCR que fue del 9.4% (**Fig. 38C**).

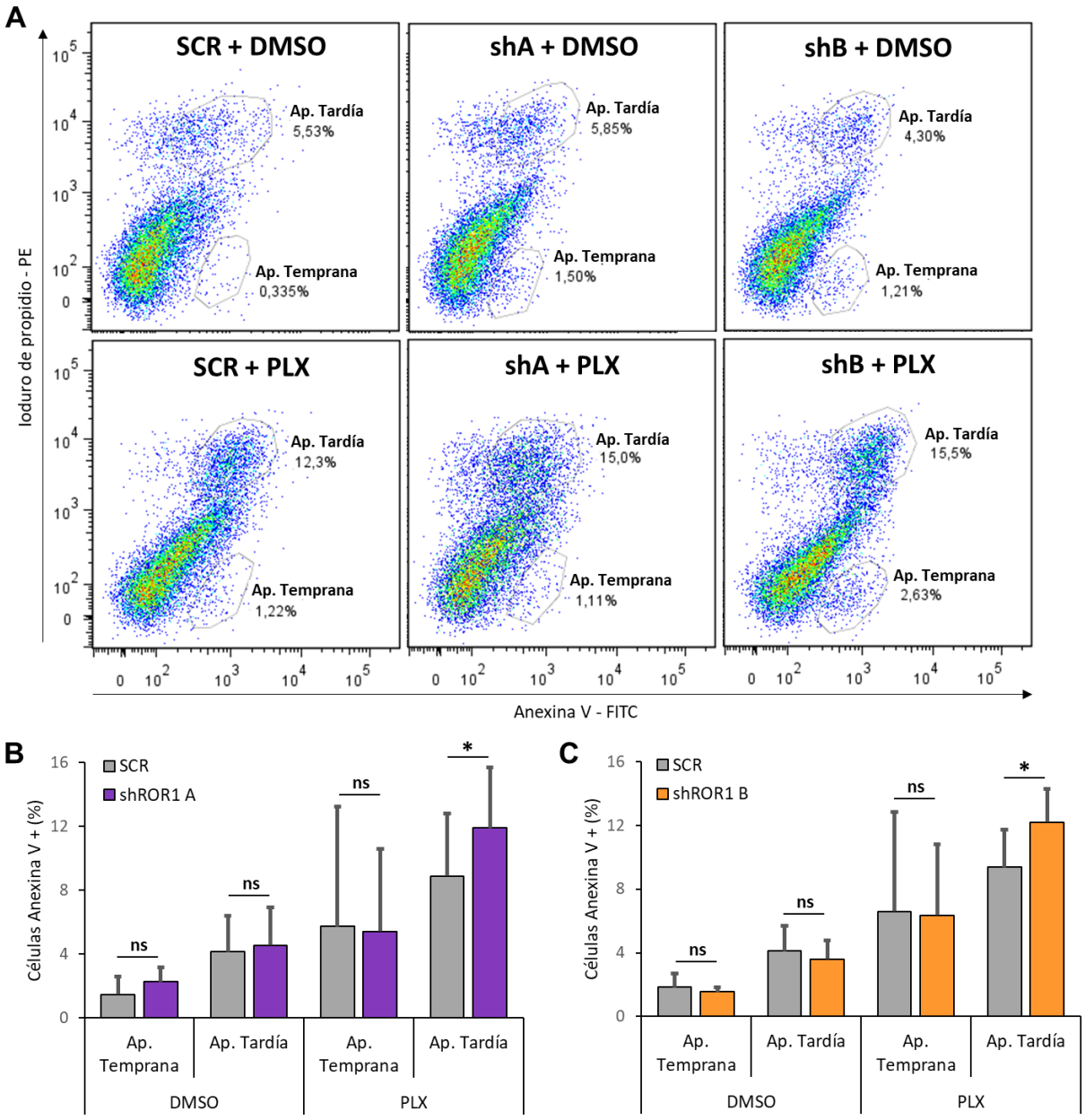


Fig. 38. El silenciamiento de ROR1 aumenta la apoptosis inducida por PLX en células A375. *(A) Células A375-SCR, A375-shROR1 A y A375-shROR1 B fueron tratadas con 12.5 µM de PLX por 24 hs, utilizando DMSO como control del tratamiento, se tiñeron con Anexina V/IP y se analizaron por citometría de flujo. En cada panel se muestran gráficos de puntos representativos de cada condición experimental. (B) Gráfico de barras de la media ± DE (n = 4) del porcentaje de células positivas a Anexina V respecto del total del experimento en (A) para las células A375-SCR y A375-shROR1 A. (C) Gráfico de barras de la media ± DE (n = 6) del porcentaje de células positivas a Anexina V respecto del total del experimento en (A) para las células A375-SCR y A375-shROR1 B. La significancia estadística se calculó utilizando ANOVA + prueba de Tukey. Ap.: Apoptosis, PLX: PLX-4032, ns: no significativo. *: p < 0.05.*

Estos resultados indican que el silenciamiento de ROR1 aumenta la apoptosis inducida tanto por PLX como por Camp.

El conjunto de resultados pone en evidencia el papel anti-apoptótico de ROR1 en melanoma. Particularmente, en la vía apoptótica intrínseca, ya que es sabido que la vía MEK/ERK, la cual resulta inhibida al tratar con PLX o STS, regula la apoptosis vía proteínas de la familia Bcl-2 (290). La STS además inhibe la expresión de proteínas del ciclo celular y altera la actividad de la quinasa AKT, lo que aumenta aún más el efecto apoptótico (291,292). Se ha demostrado que Camp induce la apoptosis mitocondrial dependiente de p53 en melanoma (284,285), al igual que el Cis que al inducir roturas en el ADN promueve la activación de p53 e induce la transcripción de las proteínas *BH3-only* pro-apoptóticas, desencadenando la muerte de las células cancerosas por apoptosis (243). Por su parte, la Dox también es un inductor de la apoptosis intrínseca (293) ya que puede intercalarse en el ADN, inhibir la topoisomerasa II y provocar la producción de radicales libres.

El siguiente paso fue tratar de dilucidar posibles mecanismos moleculares y actores involucrados en el papel regulatorio de ROR1 sobre la apoptosis en melanoma, tratado a continuación en las **secciones 4.1.4.2** y **4.1.4.3**.

4.1.4.2 ROR1 regula positivamente a proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2

Luego de haber descripto el rol de ROR1 en la inhibición de la apoptosis, se quiso investigar los mecanismos moleculares involucrados. Por su critico rol en este proceso, las proteínas de la familia Bcl-2 aparecen, a priori, como posibles candidatos a mediar el efecto ROR1 en apoptosis. Por lo tanto, se evaluó por WB el nivel de expresión de las proteínas anti-apoptóticas más estudiadas de esta familia, es decir, BCL2, BCL-XL y MCL1 en líneas celulares A375 con sobrexpresión y silenciamiento de ROR1.

Como se observa en la **Fig. 39 A-C** la sobreexpresión de ROR1 aumentó significativamente los niveles de expresión de BCL2, BCL-XL y MCL1. Concordantemente, el silenciamiento de ROR1 disminuyó significativamente los niveles de expresión de BCL2, BCL-XL y MCL1 (**Fig. 39 D-F**).

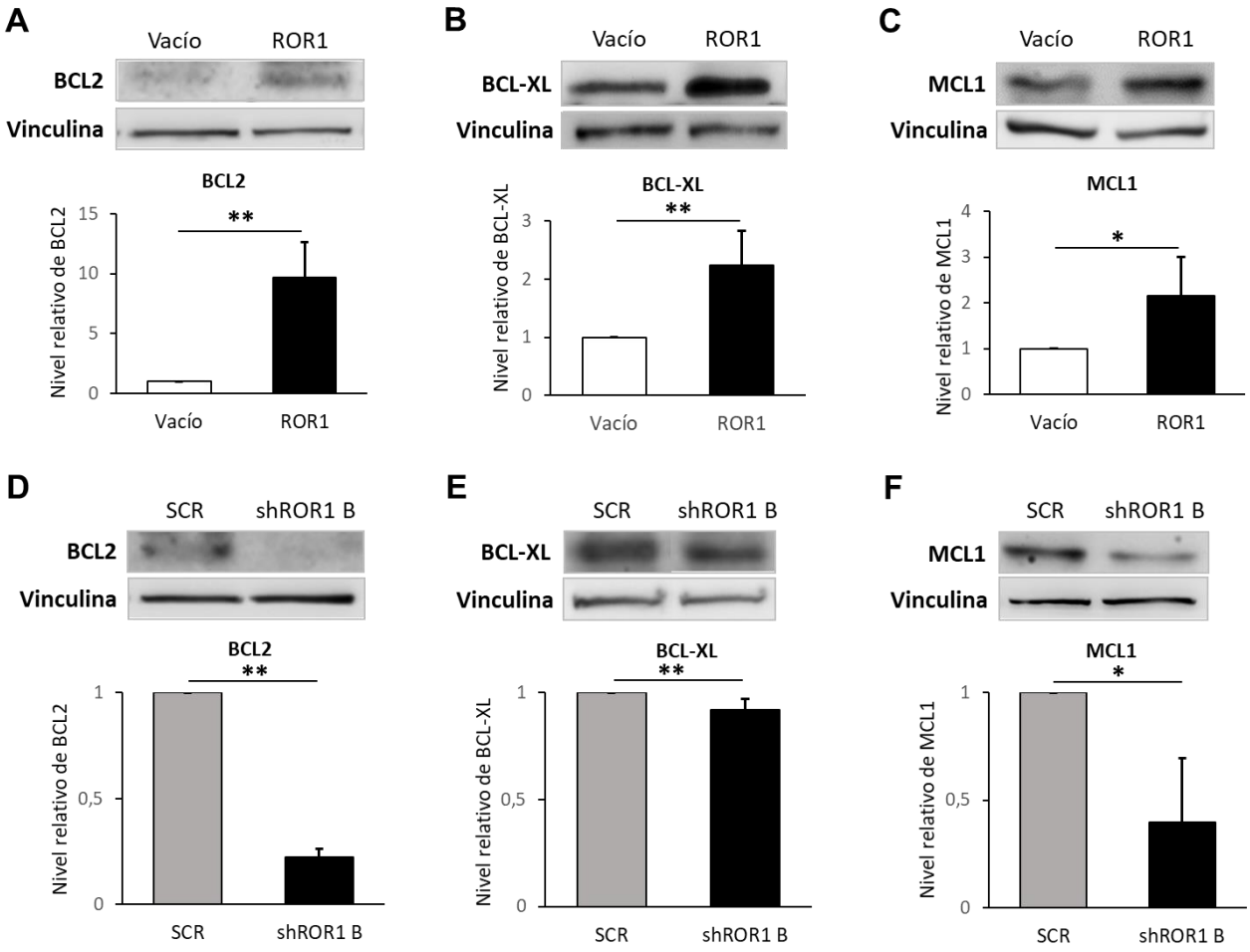


Fig. 39. ROR1 induce la expresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2. *(A-C) Extractos proteicos de células A375-vacío y A375-ROR1 se evaluaron por WB para medir los niveles de BCL2, BCL-XL y MCL1. (D-F) Extractos proteicos de células A375-SCR y A375-shROR1 B se analizaron mediante WB para medir los niveles de BCL2, BCL-XL y MCL1. La vinculina fue utilizada como control de carga. Los gráficos de barras muestran la media ± DE (n = 3) de los niveles de BCL2, BCL-XL o MCL1 normalizados al control de carga, y relativizados a las células control. La significancia estadística se calculó utilizando t-Student. *: p < 0.05, **: p < 0.01.*

Dado los resultados obtenidos con las proteínas anti-apoptóticas más caracterizadas en melanoma, se decidió evaluar si ROR1 también ejercía su regulación sobre BCL2L10, otra proteína de esta familia que ha sido muy poco estudiada en cáncer y que no ha sido investigada aun en melanoma. Para ello se midió el nivel de expresión de BCL2L10 en las líneas celulares A375 con sobrexpresión y silenciamiento de ROR1.

Como se observa en la **Fig. 40A** las células A375-ROR1 presentaron niveles significativamente más altos de BCL2L10 que las células control A375-Vacío. Concordantemente, las células A375-shROR1 A y A375-shROR1 B presentaron niveles significativamente más bajos de BCL2L10 que las células control A375-SCR (**Fig. 40B**).

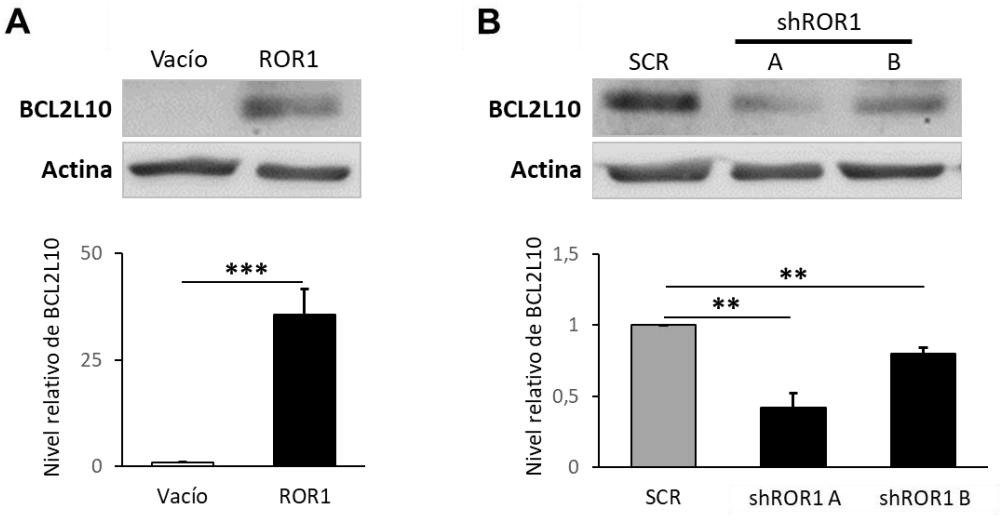


Fig. 40. ROR1 induce a BCL2L10. *(A) Extractos proteicos de células A375-vacío y A375-ROR1 se evaluaron por WB para medir los niveles de BCL2L10. (B) Extractos proteicos de células A375-SCR y A375-shROR1 A y B se analizaron mediante WB para medir los niveles de BCL2L10. La actina fue utilizada como control de carga. Los gráficos de barras muestran la media ± DE (n = 3) de los niveles de BCL2L10 normalizados al control de carga, y relativizados a las células control. La significancia estadística se calculó utilizando t-Student (sobreexpresión) o ANOVA + prueba de Tukey (silenciamiento). **: p < 0.01, ***: p < 0.001.*

Estos resultados indican que ROR1 regula positivamente la expresión de las proteínas anti-apoptóticas BCL2, BCL-XL, MCL1 y BCL2L10.

4.1.4.3 ROR1 regula a BCL2, BCL-XL y BCL2L10 vía STAT3

Una vez establecido que ROR1 regula a BCL2, BCL-XL, MCL1 y BCL2L10, y asumiendo que podría tratarse de una regulación a nivel transcripcional, se investigó que factor de transcripción podría participar de este proceso. Como vimos anteriormente, se describió que ROR1 activa a STAT3 (**sección 4.1.2.2**), en concordancia con evidencias que muestran que ROR1 regula a este FT en distintos tipos de cáncer (196,294,295). Además, se ha demostrado que la activación de STAT3 induce a BCL2 (296), BCL-XL (297) y MCL1 (298,299) en distintos cánceres disminuyendo la apoptosis. Por todo esto se decidió evaluar si ROR1 regula la expresión de las proteínas BCL2, BCL-XL, MCL1 y BCL2L10 vía STAT3 en melanoma.

Para determinar si el efecto de ROR1 sobre las proteínas anti-apoptóticas es mediado por STAT3, se utilizó el compuesto AG490, que inhibe específicamente a la quinasa JAK2, la cual se encuentra río arriba de STAT3 y es fundamental para su activación. Para llevar a cabo este experimento las células A375 con sobreexpresión de ROR1 y control (vacío) fueron incubadas con 10 µM de AG490 por distintos tiempos (30 min y 8 hs) y luego los extractos proteicos se analizaron por WB.

En la **Fig. 41** se observa que luego de 8 hs de incubación, el inhibidor AG490 inhibió la fosforilación de STAT3 en el residuo Tyr705 en forma significativa. Esta inhibición se observó tanto en A375-Vacío como en A375-ROR1, aunque fue cuantitativamente más importante en la línea celular A375-ROR1 ya que estas presentan niveles basales de pSTAT3 mucho más elevados. Para poder analizar mejor el efecto de ROR1 sobre la inhibición de pSTAT3, se determinó el grado de inhibición (GI) de pSTAT3 obtenido en las células A375-vacío y A375-ROR1. Para ello se calculó el cociente entre el nivel promedio de p-STAT3 a las 8 hs sobre el nivel promedio de p-STAT3 a las 0 hs, es decir sobre su nivel basal en cada línea celular. Al comparar el GI para cada línea celular, se pudo determinar que las células A375-ROR1 (GI = 0.5) resultaron más sensibles a la inhibición respecto de las células A375-vacío (GI = 0.7). Ya que un grado de inhibición más cercano a 1 refleja una menor inhibición, por lo que las células A375-ROR1 presentaron mayor inhibición de pSTAT3 por AG490 que las células A375-vacío, debido al alto nivel basal de pSTAT3, resultado de la inducción por ROR1.

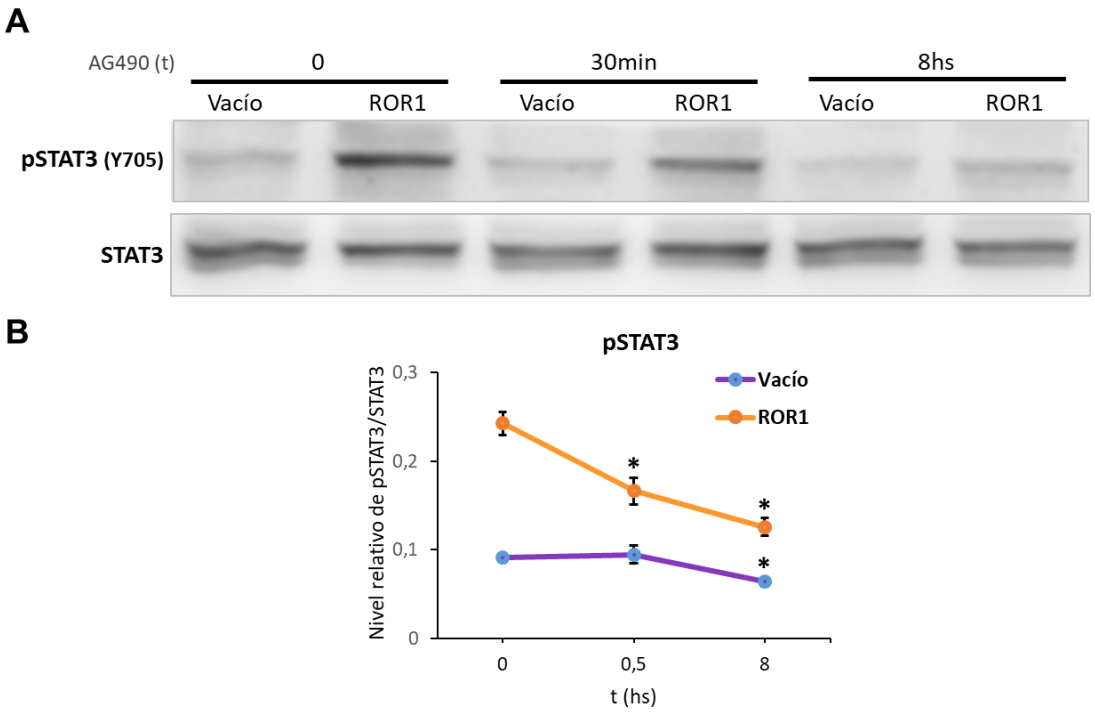


Fig. 41. AG490 inhibe a pSTAT3. *(A) Células A375-vacío y A375-ROR1 se trataron con 10 µM de AG490 durante 30 min y 8 hs. Se utilizó DMSO como control del tratamiento (el t = 0 para AG490 corresponde a 8 hs de DMSO). Los extractos proteicos se probaron con anticuerpos contra pSTAT3 (Tyr705) y STAT3. (B) Se muestran curvas de la media ± DE (n = 3) de los niveles de expresión de la relación de pSTAT3 y STAT3 en función del tiempo de incubación con el inhibidor. La significancia estadística se calculó utilizando utilizando ANOVA + prueba de Tukey, donde se comparó cada valor respecto de su control a t = 0. *: p < 0.05, n = 3.*

Luego se determinó el nivel de expresión de las distintas proteínas anti-apoptóticas en extractos proteicos obtenidos luego de inhibir la activación de STAT3 por incubación de las células con AG490 por distintos tiempos (8, 24 y 48 hs).

Como se observa en la **Fig. 42**, las células A375-ROR1 presentaron mayor nivel de expresión de BCL2, BCL-XL o BCL2L10 en células no tratadas (como fue demostrado previamente) y también luego de 8 hs de tratamiento con AG490. Sin embargo, esta diferencia se reduce o desaparece a medida que se prolonga el tratamiento con AG490. En el caso de BCL2 se comenzó a observar una disminución significativa en su expresión a las 8 hs de incubación con el inhibidor (**Fig 42C**), en el caso de BCL-XL (**Fig. 42D**) y BCL2L10 (**Fig. 42E**) a las 24 hs de incubación, respecto de su correspondiente tiempo cero. Cabe mencionar que en el caso de MCL1 no se obtuvieron resultados claros (resultados no mostrados).

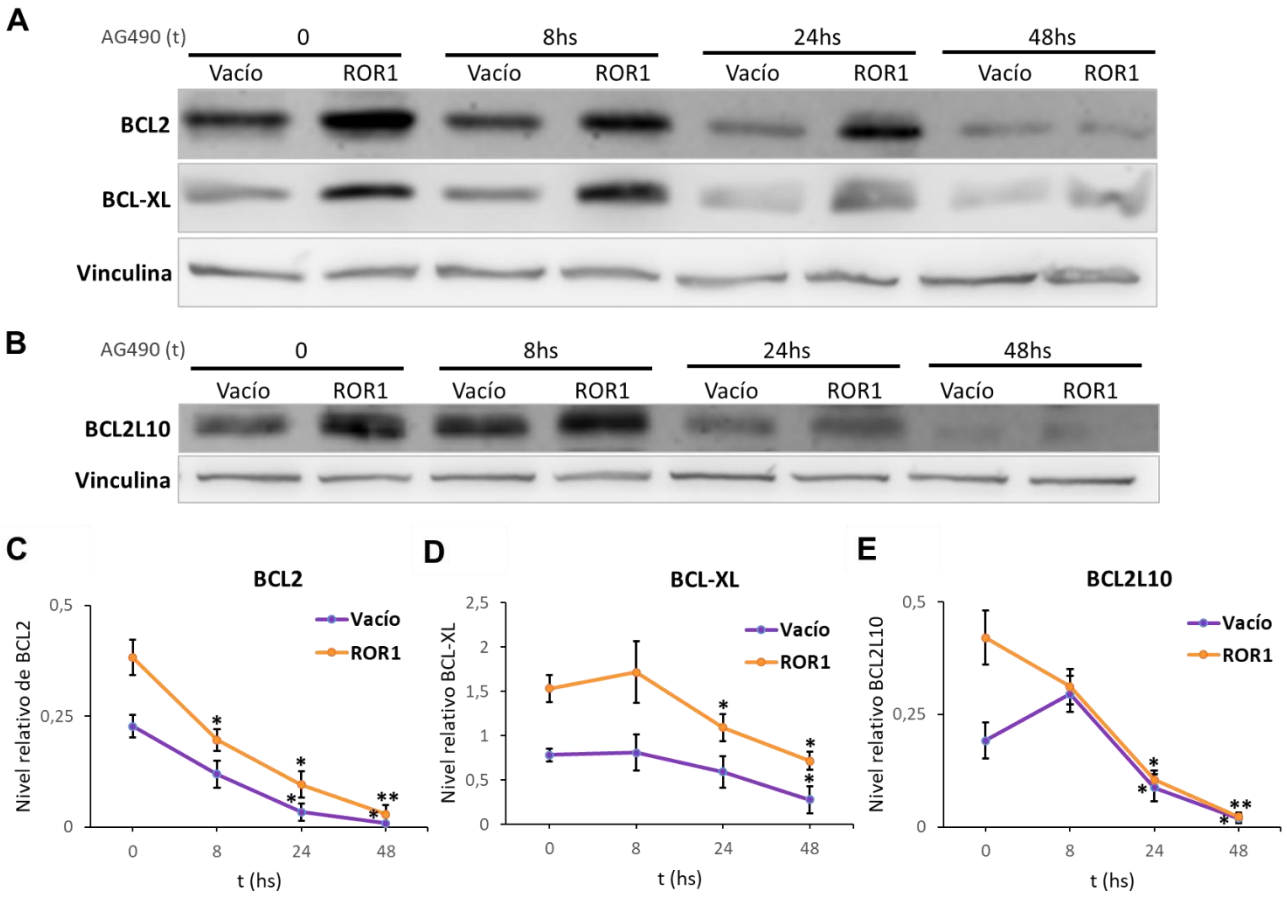


Fig. 42. ROR1 induce a las proteínas anti-apoptóticas BCL2, BCL-XL y BCL2L10 vía STAT3*. (A) Células A375-vacío y A375-ROR1 se trataron con 10 µM de AG490 durante 8, 24 y 48 hs. Se utilizó DMSO como control del tratamiento (t = 0). Los extractos proteicos se probaron con anticuerpos contra BCL2 y BCL-XL. La vinculina fue utilizada como control de carga. (B) Células A375-vacío y A375-ROR1 se trataron con 10 µM de AG490 durante 8, 24 y 48 hs. Los extractos proteicos se probaron con un anticuerpo contra BCL2L10. La vinculina fue utilizada como control de carga. (C – E) Se muestran curvas de la media ± DE (n = 3) de los niveles de expresión de BCL2 (C), BCL-XL (D) y BCL2L10 (E), relativizado al control de carga, en función del tiempo de incubación con el inhibidor. La significancia estadística se calculó utilizando utilizando ANOVA + prueba de Tukey, donde se comparó cada valor respecto de su control a t = 0. *: p < 0.05, **: p < 0.01, n = 3.*

Posteriormente, para confirmar los resultados obtenidos se realizaron experimentos con SKY606, un inhibidor de la quinasa SRC que, al igual que JAK2, se encuentra río arriba de STAT3. Para llevar a cabo este experimento las células A375 con sobreexpresión de ROR1 y control (vacío) fueron incubadas con 1 µM de SKY606 por 48 hs y luego los extractos proteicos se analizaron por WB. En primer lugar, se verificó la inhibición de pSTAT3 por SKY606. El compuesto SKY606 inhibió la fosforilación de STAT3 en el residuo Tyr705 luego de 48 hs de incubación, en ambas líneas celulares, A375-Vacío y A375-ROR1 (**Fig. 43**).

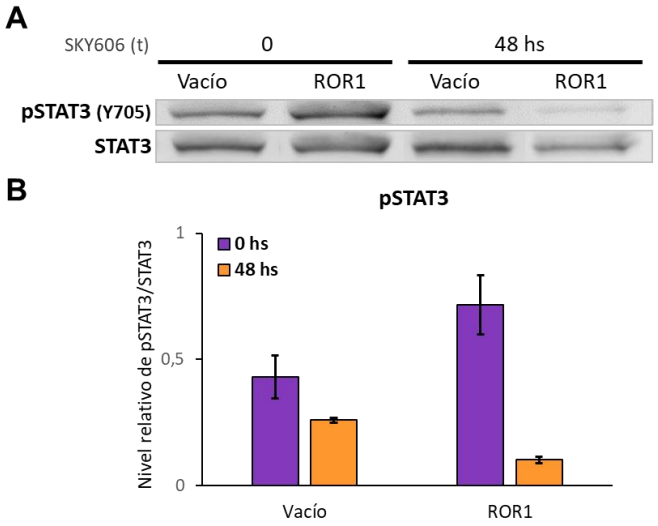


Fig. 43. SKY606 inhibe a pSTAT3. *(A) Células A375-vacío y A375-ROR1 se trataron con 1 µM de SKY606 durante 48 hs. Se utilizó DMSO como control del tratamiento (t = 0). Los extractos proteicos se probaron con anticuerpos contra pSTAT3 (Tyr705) y STAT3. (B) Se muestran curvas de la media ± DE de los niveles de expresión de la relación de pSTAT3 y STAT3 en función del tiempo de incubación con el inhibidor de dos experimentos independientes (n = 2).*

Luego se procedió a determinar los niveles de expresión de BCL2, BCL-XL y BCL2L10 en los extractos proteicos obtenidos al inhibir la activación de STAT3 por incubación de las células A375-Vacío y A375-ROR1 con SKY606 por 48 hs.

Como se observa en la **Fig. 44**, en todos los casos se observó mayor nivel de expresión de BCL2, BCL-XL o BCL2L10 en las células A375-ROR1 respecto de las células A375-Vacío en los controles con DMSO. Dichos niveles disminuyeron al incubar las células con el inhibidor SKY606 por 48 hs.

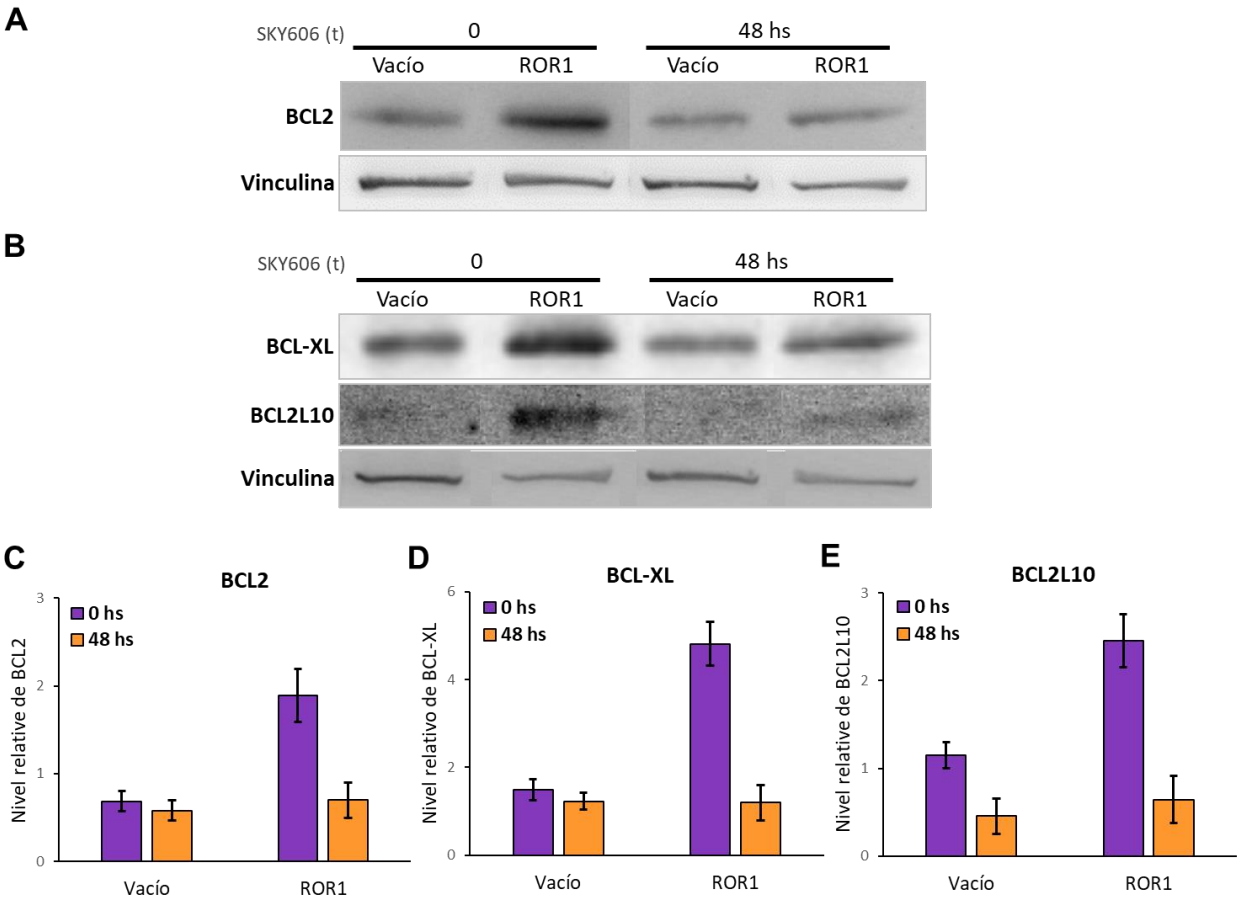


Fig. 44. ROR1 induce a las proteínas anti-apoptóticas BCL2, BCL-XL y BCL2L10 vía STAT3*. (A) Células A375-vacío y A375-ROR1 se trataron con 1 µM de SKY606 durante 48 hs. Los extractos proteicos se probaron con anticuerpos contra BCL2. Se utilizó DMSO como control del tratamiento (t = 0). La vinculina se utilizó como control de carga. (B) Células A375-vacío y A375-ROR1 se trataron con 1 µM de SKY606 durante 48 hs. Los extractos proteicos se probaron con anticuerpos contra BCL-XL y BCL2L10. Se utilizó DMSO como control del tratamiento (t = 0). La vinculina fue utilizada como control de carga. (C – E) Se muestran curvas de la media ± DE de los niveles de expresión de BCL2 (C), BCL-XL (D) y BCL2L10 (E), relativizado al control de carga, en función del tiempo de incubación con el inhibidor de dos experimentos independientes (n = 2).*

En su conjunto, estos resultados demuestran que al inhibir la activación de STAT3, inhibiendo a JAK2 o SRC, dos proteínas quinasas implicadas en su activación, se inhibe consecuentemente la sobreregulación de BCL2, BCL-XL y BCL2L10 inducida por ROR1.

Estos resultados demuestran que la expresión aberrante de ROR1 en melanoma contribuye a la supervivencia celular, ya que induce la activación de STAT3 y la regulación positiva de los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2.

4.2 Rol de BCL2L10 en melanoma

En este trabajo se demostró que ROR1 disminuye la apoptosis en melanoma (**sección 4.1.4.1**). ROR1 ejerce este efecto a través de la regulación positiva de miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 (**sección 4.1.4.2**). Entre los miembros de esta familia que son regulados por ROR1 se encuentran BCL2, BCL-XL y MCL1, cuyas funciones en apoptosis han sido estudiadas exhaustivamente. La proteína BCL2L10 también pertenece a esta subfamilia, siendo el miembro más recientemente identificado y por lo tanto el menos estudiado. Por ello se decidió estudiarlo en mayor profundidad y evaluar su rol en melanoma, el cual es desconocido hasta la fecha.

4.2.1 BCL2L10 se expresa en melanoma

El primer paso fue evaluar los niveles de expresión de BCL2L10 en distintas líneas celulares de melanoma y en muestras de pacientes en diferentes estadios de la enfermedad.

4.2.1.1 BCL2L10 se expresa en líneas celulares de melanoma

Para evaluar los niveles de expresión de BCL2L10 en melanoma, se determinó por WB su expresión en 8 líneas celulares de melanoma.

Como se puede ver en la **Fig. 45**, todas las líneas celulares evaluadas presentaron expresión de BCL2L10.

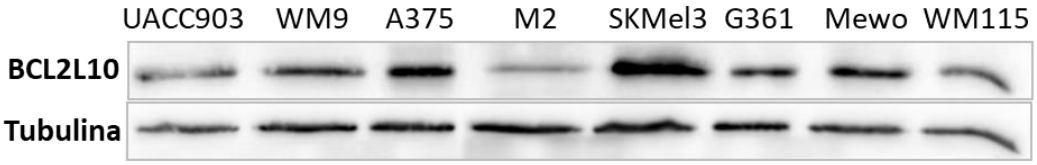


Fig. 45. Expresión de BCL2L10 en líneas celulares de melanoma humanas. *Extractos proteicos de las líneas celulares de melanoma indicadas fueron probados por WB con una dilución 1:500 del anticuerpo anti-BCL2L10 #3869. La tubulina fue utilizada como control de carga.*

4.2.1.2 Puesta a punto de la técnica de IHQ para detectar BCL2L10

Para evaluar la importancia de esta proteína, se decidió determinar su expresión en muestras de pacientes con melanoma mediante IHQ, dado que la alta frecuencia de expresión de BCL2L10 en nuestra colección de líneas celulares puede deberse a un proceso de selección inherente a la creación de líneas celulares derivadas de tumores o a las condiciones de cultivo celular *in vitro*. Para establecer las condiciones óptimas de la

inmunomarcación de BCL2L10 en las muestras, se determinó el método de recuperación antigénica y las condiciones de incubación del anticuerpo.

En primer lugar, al igual que en el caso de ROR1, se buscó establecer controles positivo y negativo para la puesta a punto de la técnica. Para ello se investigó en la base de datos *The Human Protein Atlas* los niveles de expresión de ARNm de BCL2L10 en los distintos órganos (**Fig. 46**), y se seleccionó aquellos tejidos que se encontraban disponibles en el laboratorio. Como posible control positivo se seleccionó hígado, y como posible control negativo médula ósea y placenta. Además, se fijó una clasificación de la marcación de BCL2L10 como fuertemente positivos (+++), moderadamente positivo (++), débilmente positivo (+) o negativo (-).

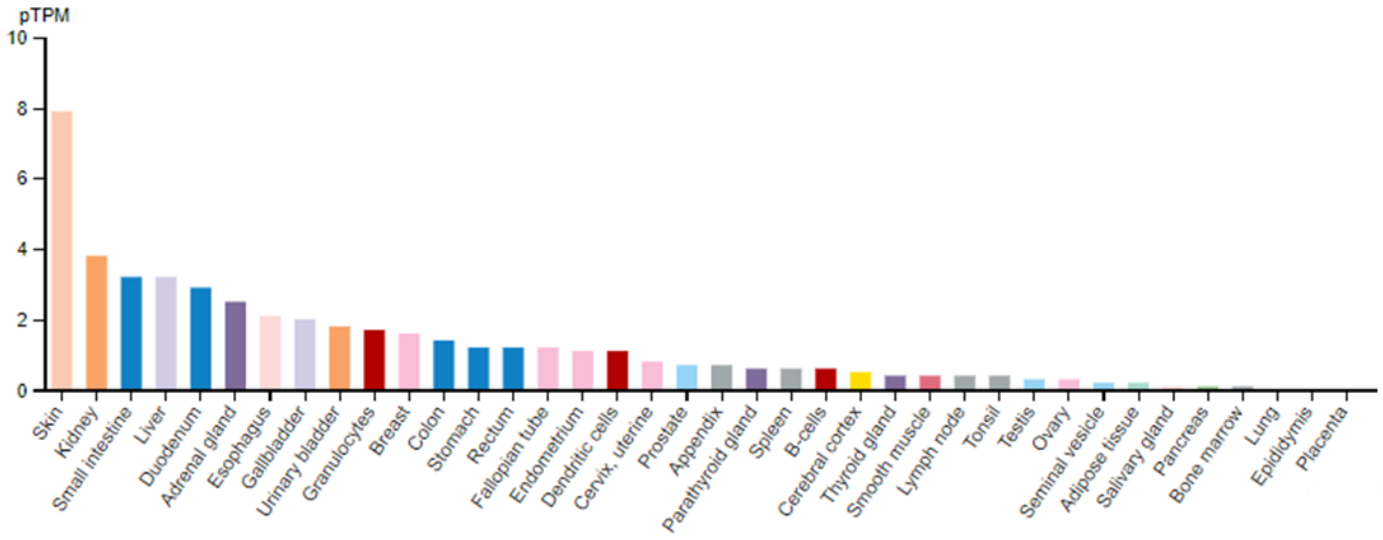


Fig. 46. Nivel de ARNm de BCL2L10 en distintos tejidos humanos. *Los valores corresponden a determinaciones de ARN-seq y fueron obtenidos de la base de datos The Human Protein Atlas (http://www.proteinatlas.org/).*

Antes de proseguir con la puesta a punto de la técnica de IHQ se debe mencionar que el anticuerpo anti-BCL2L10 utilizado para WB no resulta adecuado para IHQ. Dado que BCL2L10 es una proteína muy poco estudiada hasta el presente, su detección en tejidos humanos mediante IHQ se ha visto obstaculizada por la falta de herramientas validadas. El anticuerpo anti-BCL2L10 PA5-22190 (anti-BclB) es uno de los pocos anticuerpos comerciales recomendados para IHQ, pero, sin embargo, no ha sido utilizado aún en ninguna publicación científica. Por lo tanto, para cuantificar la expresión de BCL2L10 en pacientes con melanoma, fue necesario primero validar este anticuerpo mediante WB. Para ello se transfectaron células HEK293T con un vector que codifica para BCL2L10 humano etiquetado con myc, y se midió la expresión de BCL2L10 en los extractos celulares mediante WB.

Como se observa en la **Fig. 47**, el anticuerpo PA5-22190 detectó una banda fuerte en 24 kDa correspondiente al BCL2L10 exógeno en las células HEK293T transfectadas con BCL2L10-myc, la cual no se observó en las células HEK293T transfectadas con el plásmido vacío.

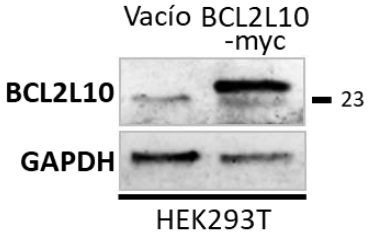


Fig. 47. Validación del anticuerpo anti-BCL2L10 PA5-22190. *Se analizaron extractos de proteínas de células HEK293T transfectadas con BCL2L10-myc o plásmido vacío y se evaluaros los resultados mediante WB utilizando el anticuerpo anti-BCL2L10 PA5-22190 (anti-BclB, dilución 1:1000). El GAPDH fue utilizado como control de carga.*

Una vez validado el anticuerpo a utilizar para la técnica de IHQ se procedió a realizar la puesta a punto de la misma. Para comenzar se utilizó una solución H_2O_2 0.5% en alcohol metílico absoluto (bloqueo de la peroxidasa endógena), condición que se encuentra estandarizada en el laboratorio; y se probaron dos diluciones del anticuerpo anti-BclB, 1:300 y 1:100, incubándose durante la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda para las muestras control mencionadas anteriormente. Todas las muestras presentaron marcación intensa y *"background"* dificultando su análisis. Para disminuir la marcación inespecífica, se aumentó la concentración de la solución de bloqueo de la peroxidasa endógena a 1.5%. Por otra parte, como la marcación fue muy intensa se disminuyó la dilución del anticuerpo anti-BclB a 1:500 bajo las mismas condiciones de incubación anteriormente mencionadas. En este caso las muestras de médula ósea y placenta presentaron una tinción inespecífica suave, y el hígado dio marcación ++.

Como los posibles controles negativos continuaban presentando marcación inespecífica; se decidió probar dos condiciones de incubación del anticuerpo primario, 1 hr a 30 °C y toda la noche a Temp. amb. (ambas condiciones en cámara húmeda). Las restantes condiciones no se modificaron. Además, se eliminó la muestra de médula ósea ya que pertenecía a una muestra tumoral que presentaba parte de tejido tumoral y parte de tejido normal, dificultando algunas veces su análisis. Por el contrario, la muestra de placenta pertenecía a tejido completamente sano. Como era de esperar, en las muestras incubadas toda la noche se observó los mismos resultados mencionados anteriormente. En las muestras incubadas 1 hr a 30 °C no se observó marcación inespecífica, la placenta dio negativo y el hígado presentó marcación ++. Debido a que el control positivo exhibió marcación ++, se decidió repetir nuevamente el ensayo modificando la dilución del anticuerpo anti-BclB a 1:300. Para esta nueva condición el control positivo presentó una marcación de +++ y la placenta (control negativo) nuevamente resultó en tinción negativa.

4.2.1.3 BCL2L10 se expresa en pacientes con melanoma

Una vez establecidas las condiciones para la inmunomarcación de BCL2L10, se analizaron por IHQ muestras de 20 pacientes con melanoma. Se incluyeron muestras tanto de melanomas primarios como metastásicos. Todas las muestras proceden de los archivos del Hospital Israelita, actualmente en la Universidad Maimónides.

Como se observa en la **Fig. 48** y la **Tabla 8**, en el 90% de las muestras analizadas se encontró expresión robusta de BCL2L10 (marcación ++ y +++) (**Fig. 48 C-F**), mientras que el 10% restante fueron negativas (**Fig. 48 A-B**). BCL2L10 presentó un patrón heterogéneo de inmunorreactividad, ya que se observó tinción tanto citoplasmática como nuclear, y esta heterogeneidad fue tanto entre muestras como dentro de ellas (**Fig. 48 C-F**). La tinción de BCL2L10 se observó exclusivamente en el tejido tumoral, mientras que no se observó inmunorreactividad en el estroma adyacente no canceroso (**Fig. 48 D-E**).

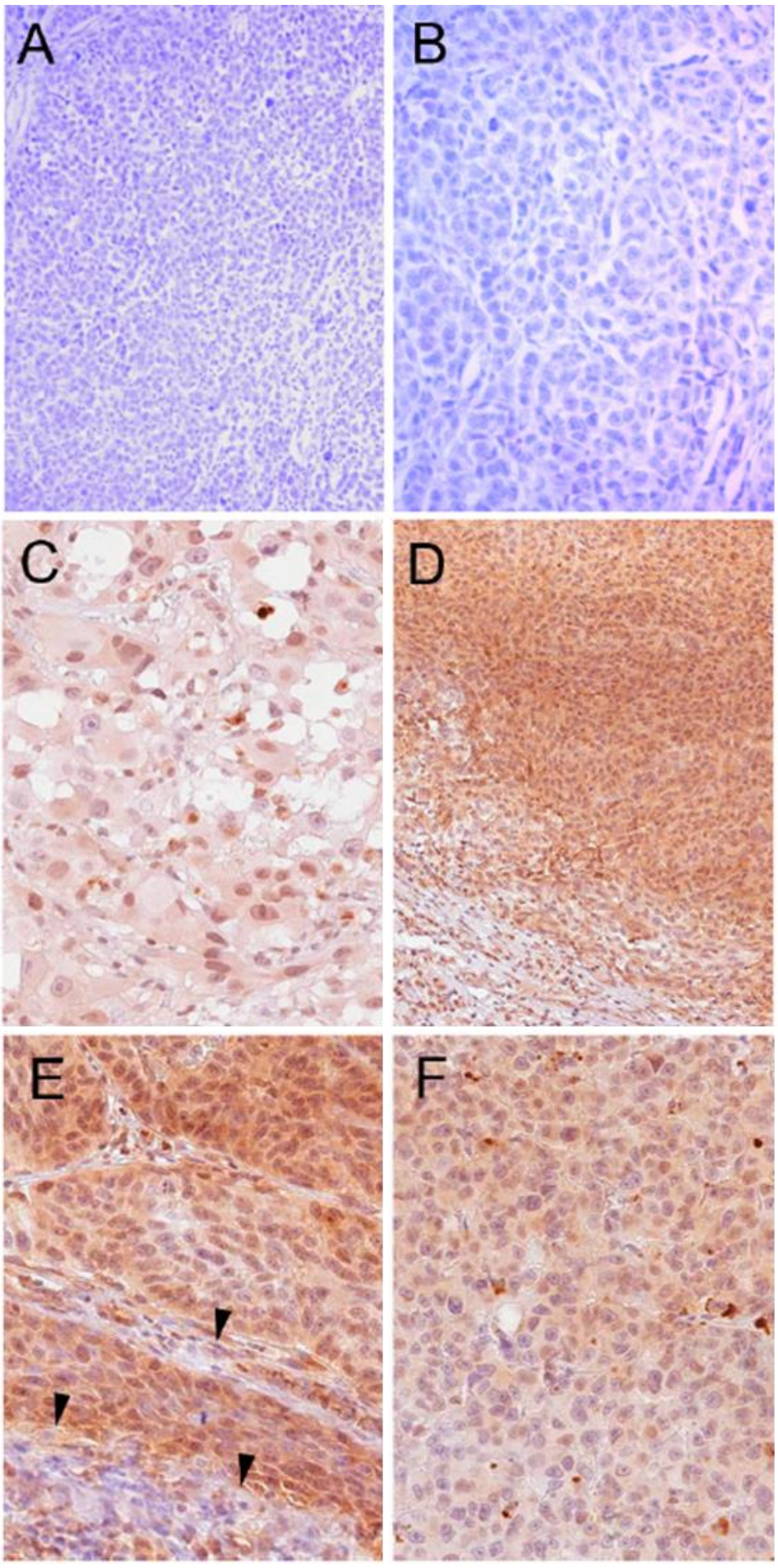

A
B
C
D
E
F

Fig. 48. BCL2L10 se expresa altamente en muestras tumorales de melanoma. *Imágenes representativas de la tinción de IHQ para BCL2L10 utilizando el anticuerpo PA5-22190 (dilución 1:300) con contratinción de hematoxilina. (A, B) Imágenes representativas de una muestra que obtuvo una marcación negativa para tinción BCL2L10 (A: magnificación 40x, B: magnificación 100x). (C) Muestra donde se observa tinción predominantemente nuclear de BCL2L10 (magnificación 100x). (D, E) Imágenes representativas de una muestra donde se observa tinción núcleo-citoplasmática de BCL2L10 (D: magnificación 40x, E: magnificación 100x). La tinción de BCL2L10 no se observa en el estroma adyacente (parte inferior del panel D) y en el estroma septal (flechas en el panel E). (F) Muestra donde se observa tinción predominantemente citoplasmática de BCL2L10 (magnificación 100x).*

ID Paciente	Diagnóstico	Clark	Tinción BCL2L10
117061 (1)	Melanoma de piel	In situ	++
116871	Melanoma intradérmico	I	++
84619	Melanoma nodular	II	+++
116235	Melanoma de piel	II	+++
98125	Melanoma de piel	III	-
97040 (1)	Melanoma de piel	III	-
96700	Melanoma de piel	III	++
104059	Melanoma de piel	III	+++
103708	Melanoma de piel	IV	++
99404	Melanoma de piel	IV	++
98148	Melanoma de piel	IV	++
104751	Melanoma de piel	IV	+++
100205	Melanoma de piel	IV	+++
97202	Melanoma de piel	IV	+++
113369	Melanoma nodular	IV	+++
103279	Melanoma de piel	-	++
113071	Metástasis en ganglio linfático		++
107251	Metástasis en ganglio linfático		+++
107366	Metástasis en ganglio linfático		+++
110058	Metástasis en hipodermis		+++

Tabla 8. Análisis de IHQ de la tinción de BCL2L10 en muestras de pacientes con melanoma.

Estos resultados demuestran que la proteína BCL2L10 se expresa frecuente y fuertemente en el melanoma.

4.2.2 STAT3 regula la expresión de BCL2L10 activándolo transcripcionalmente

4.2.2.1 pSTAT3 colocaliza con BCL2L10

Dado que en la **sección 4.1.4.3** se pudo ver que la expresión BCL2L10 es regulada por el factor de transcripción STAT3 en células de melanoma, se quiso investigar si en muestras de pacientes con melanoma se observaba el mismo resultado.

Para ello se tomaron seis de las muestras de melanoma analizadas por IHQ para BCL2L10, y se evaluó la inmunomarcación de pSTAT3.

En la **Tabla 9** se puede observar que, en cuatro de las seis muestras de pacientes analizadas, la tinción con pSTAT3 se superpuso con la tinción con BCL2L10. A diferencia de BCL2L10, que presentó un patrón de tinción heterogéneo, el cual incluía localización tanto nuclear como citoplasmática, la tinción de pSTAT3 fue casi exclusivamente nuclear en las muestras de melanoma analizadas (**Fig. 49**). Este resultado sugiere que STAT3 podría controlar la transcripción de BCL2L10.

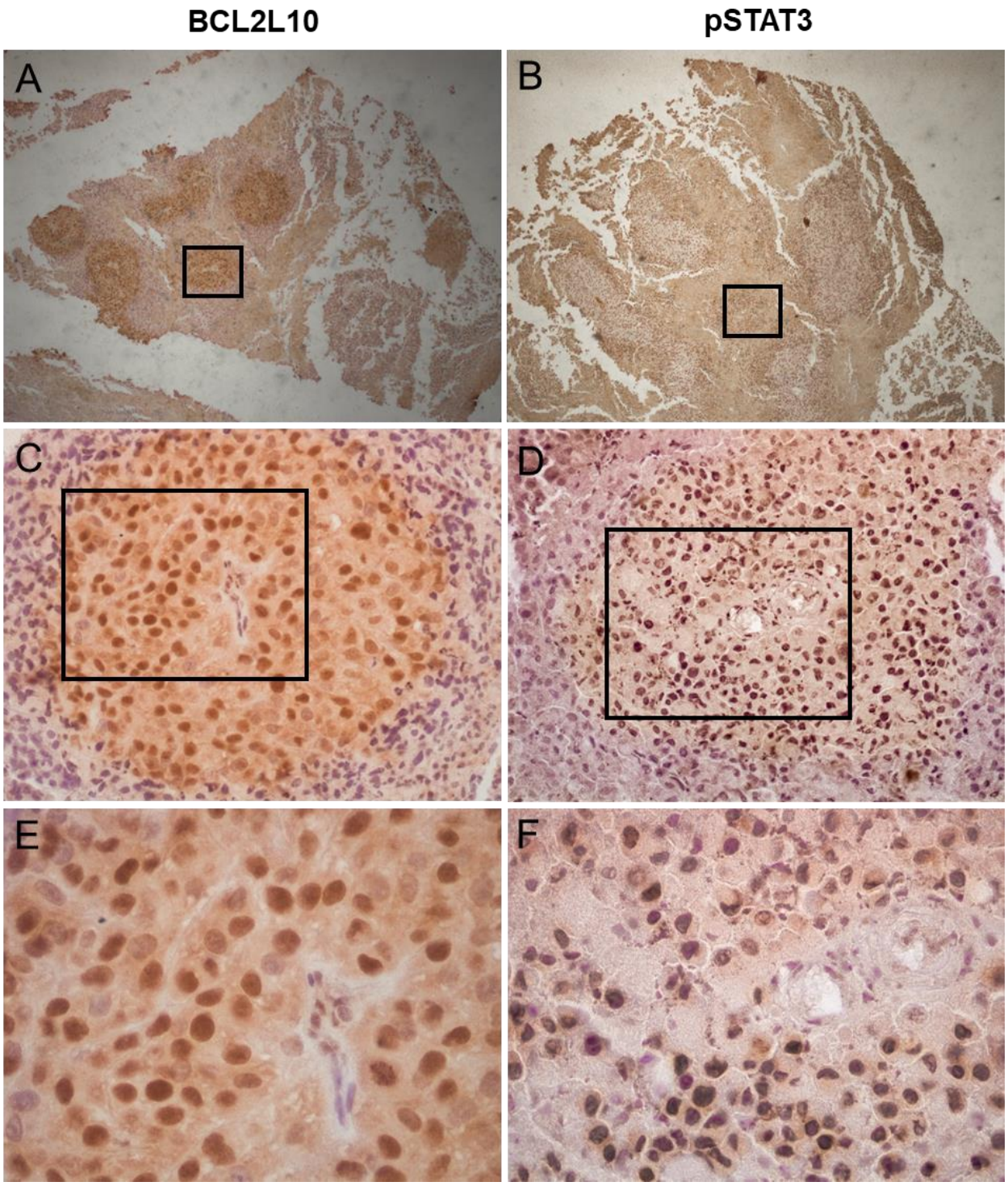


Fig. 49. BCL2L10 y pSTAT3 presentan localización superpuesta en muestras tumorales de melanoma. *(A-F) Imágenes representativas de las mismas áreas del tumor de la tinción inmunohistoquímica del paciente P110058 para BCL2L10 (anticuerpo PA5-22190, dilución 1:300) (A, C, E) y pSTAT3 (anticuerpo sc-482, dilución 1:100) (B, D, F) con contratinción con hematoxilina con magnificación 10x (A, B), 200x (C, D) y 400x (E, F). (E) y (F) corresponden a las áreas recuadradas en (A, C) y (B, D), respectivamente. Se puede observar tinción nuclear con pSTAT3 y núcleo-citoplasmática con BCL2L10 en las mismas áreas del tumor.*

ID Paciente	Diagnóstico	Clark	Tinción BCL2L10	Tinción pSTAT3
104059	Melanoma de piel	III	+++	-
113369	Melanoma nodular	IV	+++	+
113071	Metástasis en ganglio linfático		++	++
107251	Metástasis en ganglio linfático		+++	++
107366	Metástasis en ganglio linfático		+++	-
110058	Metástasis en hipodermis		+++	++

Tabla 9. Análisis de IHQ de la superposición de la tinción de BCL2L10 y pSTAT3 en muestras de pacientes con melanoma.

4.2.2.2 STAT3 activa transcripcionalmente a BCL2L10 por unión a su promotor

Los resultados mostrados en la **sección 4.1.4.3** indicaron que STAT3 regula a BCL2L10 en células de melanoma, pero no revelaron la naturaleza de esta regulación. En esta sección se evaluará la regulación de STAT3 sobre BCL2L10 a nivel transcripcional dado que STAT3 es un FT implicado en la transcripción de numerosos genes blanco involucrados en cáncer.

Para estudiar la regulación de la transcripción de BCL2L10 por STAT3, se realizó un análisis bioinformático del gen humano de BCL2L10 en colaboración con el Dr. Joo-Yeon Yoo´s (Universidad de Ciencia y Tecnología de Pohang, República de Corea). El análisis de la región promotora de BCL2L10 (de -2.0 kb a +0.5 kb) utilizando el software STAT3-Finder desarrollado por nuestros colaboradores (300), reveló diez posibles elementos de respuesta a STAT3 (SRE) con puntajes superiores al valor de corte (> 0.8, **Fig. 50A**). El sitio en -559 fue el único conservado entre los mamíferos (datos no mostrado). Los sitios en las posiciones -559 (TTCTCAGAA) y -1306 (CCCCCAGAA) del promotor de BCL2L10 mostraron puntajes de 0.97 y 0.98, respectivamente, y, por lo tanto, fueron considerados los sitios SREs más probables en el gen de BCL2L10 humano. Para estudiar el promotor de BCL2L10 se realizaron ensayos con un plásmido reportero de luciferasa que contenía la región de -1674 a +115 del promotor de BCL2L10 humano. Esta región contiene los dos SREs con elevados puntajes y una región que contiene un grupo de SREs cerca del inicio de la transcripción (TSS). También se utilizó otros dos plásmidos reporteros que contenían solo uno (plásmido 678/+115) o ninguno (plásmido 548/+115) de los dos sitios de alto puntaje (**Fig. 50A**). De esta forma, se pudo evaluar la actividad transcripcional de los dos sitios con alto puntaje (en conjunto y por separado) y de los sitios de menor puntaje ubicados cerca del inicio de la transcripción.

La actividad luciferasa de las distintas construcciones se evaluó en células HEK293T que fueron también transfectadas con plásmidos que codifican para STAT3Y>F (dominante negativo de STAT3), STAT3C (STAT3 constitutivamente activo) o plásmido vacío (control). En

la **Fig. 50B** se observan los resultados obtenidos. La expresión de STAT3Y>F redujo la actividad transcripcional generada por los plásmidos -1674/+115 y -678/+115 al inhibir el STAT3 endógeno. Mientras que, la transfección con STAT3C aumentó significativamente la actividad transcripcional inducida por las dos construcciones promotoras (-1674 / +115 y -678 / +115) comparadas al nivel observado con el plásmido vacío. La actividad reportera del plásmido -548 / +115 no fue afectada por STAT3Y>F ni por STAT3. Este resultado sugiere que ambos SREs estarían involucrados en la transcripción de BCL2L10 regulada por STAT3.

Para confirmar esta posibilidad se generaron dos plásmidos reporteros con mutaciones que eliminaban cada uno dichos sitios (-1306 Mut y -559 Mut, mostrados en la **Fig. 50A**). La mutación de cualquiera de estos sitios redujo la actividad del reportero luciferasa en comparación con la observada con el promotor wt de BCL2L10 (**Fig. 50B**). Además, la transfección con STAT3Y>F redujo significativamente la actividad de ambos fragmentos del promotor, indicando que los reporteros mutantes conservaban a regulación por STAT3. En línea con estos resultados, STAT3C aumentó significativamente la actividad de ambos promotores mutantes. Por el contrario, el plásmido doble mutante de ambos sitios (Doble Mut) presentó no sólo una disminución en la actividad luciferasa sino que también una actividad reportera similar en células transfectadas con plásmido vacío y con los mutantes de STAT3 (STAT3Y>F y STAT3C), indicando que el fragmento promotor perdió por completo la capacidad de respuesta a STAT3 (**Fig. 50B**). Estos resultados demuestran que la transcripción de BCL2L10 está regulada por STAT3 a través de dos sitios reguladores presentes en el promotor de BCL2L10 en las posiciones -1306 y -559.

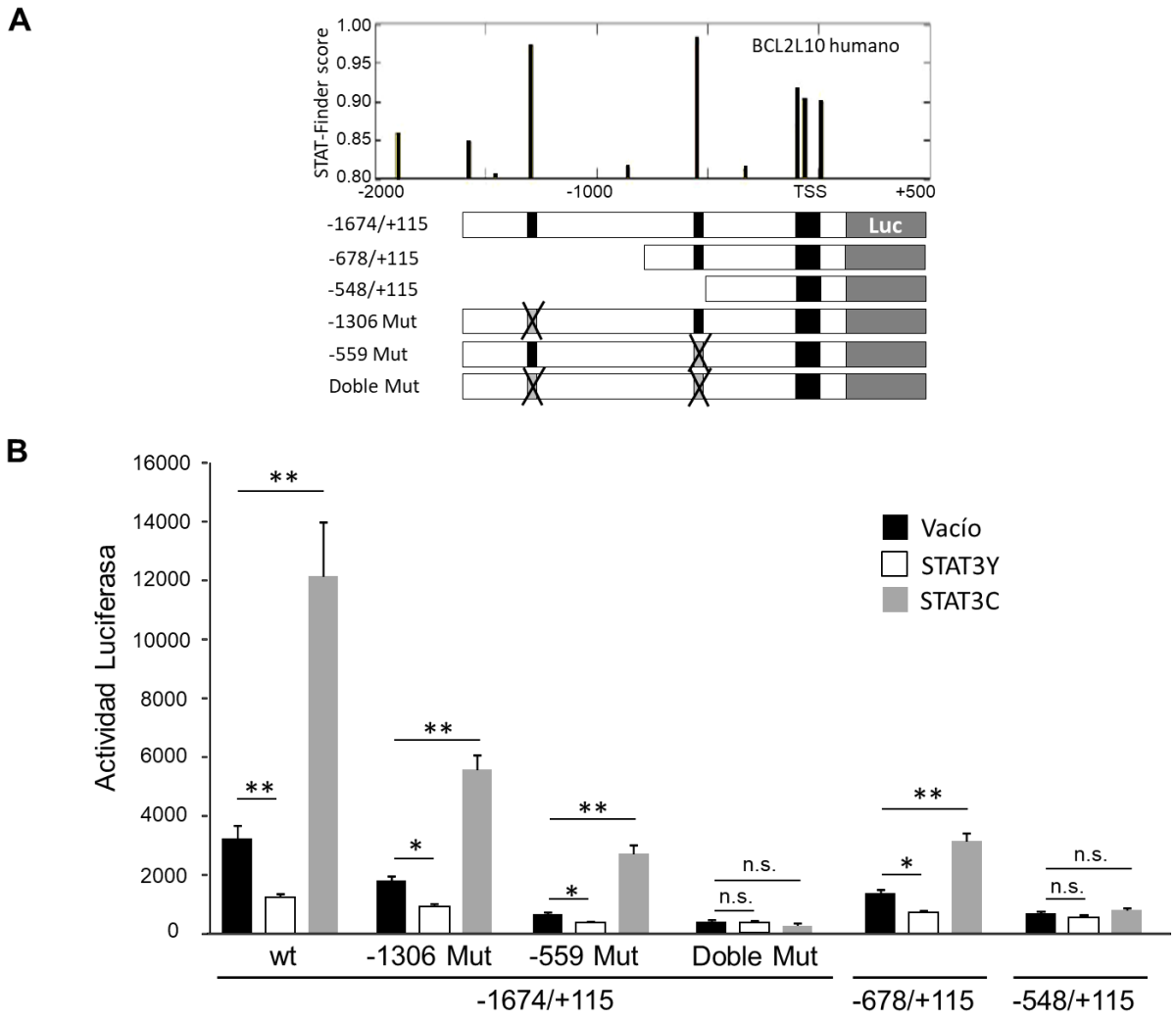


Fig. 50. STAT3 se une al promotor de BCL2L10 y regula su transcripción. *(A) Representación de la estructura de la región proximal del promotor humano de BCL2L10. Se muestran los elementos de respuesta a STAT3 candidatos, obtenidos al analizar el promotor de BCL2L10 humano empleando STAT-Finder (arriba) y los fragmentos del promotor que fueron clonados en pGL2 (abajo). Los sitios en −1306 y −559 se eliminaron mediante mutagénesis sitio-dirigida, generando dos plásmidos con una sola mutación y un plásmido con una doble mutación. Los rectángulos blancos representan la secuencia del promotor de BCL2L10, los negros los elementos de respuesta a STAT3 según STAT-Finder y los grises con cruz los que fueron mutados en cada caso. Todas las construcciones descriptas fueron realizadas la Dra. María Elisa Picco y descriptas en su tesis doctoral ("Nuevos blancos regulados por STAT3 en melanoma"). (B) STAT3 mejora la transactivación de BCL2L10 a través de los SREs en −1306 y −559. Células HEK293T fueron cotransfectadas con los plásmidos reporteros indicados y con los plásmidos STAT3 Y>F (STAT3Y en figura), STAT3C o vacío (control). A las 48 hs post-transfección se obtuvieron los extractos proteicos y se midió la actividad luciferasa en un luminómetro. Los resultados se muestran como la media ± DE (n = 3). La significancia estadística se calculó utilizando ANOVA + prueba de Tukey. STAT3Y: dominante negativo de STAT3, STAT3C: STAT3 constitutivamente activo. Luc: luciferasa, Mut: mutante, ns: no significativo. *: p < 0.05, **: p < 0.01.*

4.2.3 BCL2L10 contribuye a la supervivencia celular en melanoma

4.2.3.1 Generación de líneas celulares de melanoma con sobreexpresión y silenciamiento de BCL2L10

Para determinar el rol de BCL2L10 en melanoma se utilizaron estrategias de ganancia y pérdida de función. Para inhibir la expresión de BCL2L10 se usaron dos "short hairpin" RNA (shARN) de origen comercial clonados en un vector lentiviral. Los vectores que expresan los shARN fueron transfectados en células A375, que según resultados previos presentan altos niveles endógenos de BCL2L10, y se seleccionaron las células que expresaban en forma estable el shARN con Puromicina. Como control se emplearon células transfectadas con un shARN control (*scramble*, SCR). Por otro lado, el ADNc de BCL2L10 (cedido por el Dr. S. Reed, USA) fue transfectado en células M2, que según resultados previos presentan bajos niveles endógenos de BCL2L10, y las células que incorporaron el plásmido fueron seleccionadas con Neomicina. Los cambios en los niveles de BCL2L10 se determinaron por WB.

Como se observa en la **Fig. 51**, se detectó una banda de 23 kDa correspondiente a BCL2L10 endógeno y una banda de 24 kDa, correspondiente al exógeno, en los extractos provenientes de células transfectadas con BCL2L10-myc pero no en los extractos de células transfectadas con el plásmido vacío (**Fig. 51A**). En el caso del silenciamiento de BCL2L10, la expresión de BCL2L10 observada en las células A375-shBCL2L10 I y II (correspondientes a la banda de 23 kDa) es menor que la observada en A375-SCR, indicando que el silenciamiento se llevó a cabo de manera eficiente en ambas líneas celulares A375-shBCL2L10 (**Fig. 51B**).

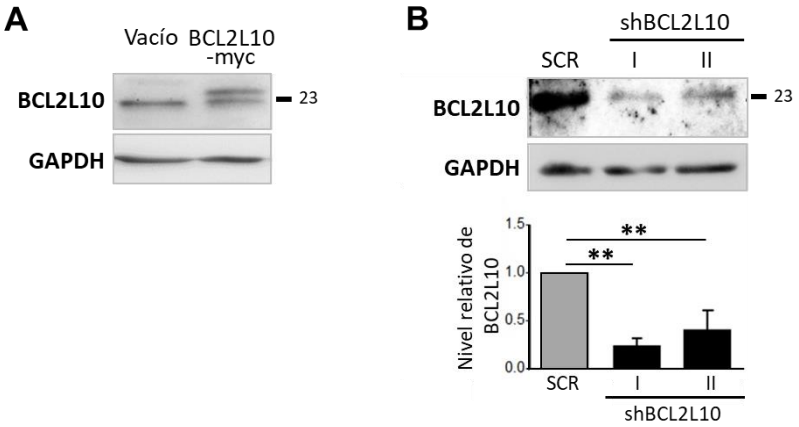


Fig. 51. Sobreexpresión y silenciamiento de BCL2L10 en líneas celulares de melanoma. *(A) Extractos proteicos de células M2 transfectadas con BCL2L10-myc o plásmido vacío fueron evaluadas por WB usando el anticuerpo anti-BCL2L10 PA5-22190 (dilución 1: 1000). (B) Extractos proteicos de células A375 transducidas con dos shARN para BCL2L10 (I y II) o un shARN scramble (SCR) se analizaron mediante WB utilizando el anticuerpo PA5-22190 (dilución 1: 1000). El GAPDH fue utilizado como control de carga. Los gráficos de barras muestran la media ± DE (n = 3) de los niveles de BCL2L10 normalizados al control de carga y relativizados a las células SCR. El marcador 23 kDa se indica en los paneles. La significancia estadística se calculó utilizando ANOVA + prueba de Tukey. **: p < 0.01.*

Una vez generadas las células con sobreexpresión de BCL2L10 se analizó si la expresión exógena de BCL2L10 influye en la expresión de otras proteínas de la familia BCL2.

Como se observa en la **Fig. 52**, la expresión de los miembros de la familia BCL2 analizados no se vio afectada por la sobrexpresión de BCL2L10.

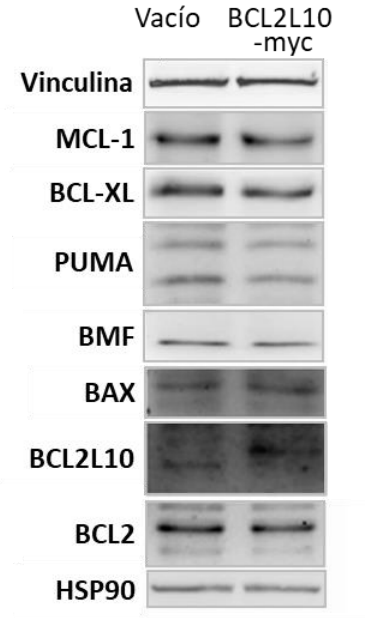


Fig. 52. La sobreexpresión de BCL2L10 en células M2 no afecta la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis. *Extractos proteicos de células M2-vacío y M2-BCL2L10-myc fueron evaluados por WB. Las proteínas vinculina y HSP90 fueron utilizadas como controles de carga. Se muestra una imagen representativa de dos experimentos independientes.*

4.2.3.2 BCL2L10 aumenta la supervivencia de células de melanoma tratadas con agentes que dañan el DNA

A pesar de que las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 se encuentran implicadas en la notoria resistencia de las células de melanoma a distintas terapias, se ha demostrado que la inhibición de alguna de ellas, por sí solas, no produce efectos significativos en las células de melanoma debido a la redundancia funcional de estas proteínas o a la necesidad de insultos citotóxicos adicionales. Por este motivo, los estudios con inhibidores de proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas (Obatoclax, Maritoclax, TW-37, ABT-737, etc.) se han focalizado en su capacidad de sensibilizar a las células de melanoma frente a otros compuestos de uso terapéutico.

Por ello, se decidió estudiar si la inhibición de BCL2L10 potencia la muerte celular inducida por compuestos tales como: Cis, DAC (dacarabazina), ABT-737, TW-37 y PLX. Estos compuestos son representativos de dos de las opciones terapéuticas en esta enfermedad

(quimioterapia e inhibición de MAPK) y de estrategias basadas en compuestos BH3 miméticos (actualmente en investigación en ensayos clínicos).

En primer lugar, se evaluó el efecto de la alteración del nivel de BCL2L10 en el crecimiento de células de melanoma, dado que se demostró, según otros trabajos, que BCL2L10 regula la proliferación celular en carcinoma de ovario y hepatocelular. Para ello, se decidió evaluar la proliferación celular, mediante el ensayo de cristal violeta, con las líneas celulares de sobreexpresión y silenciamiento de BCL2L10 y sus respectivos controles. Las células se incubaron en medio de cultivo con suero 10% a 37 °C en estufa de CO_2, y se fijaron a los días 0, 3, 5 y 8 para luego realizar el ensayo de cristal violeta.

Como se observa en la **Fig. 53**, se determinó que el nivel expresión de BCL2L10 no afecta el crecimiento celular.

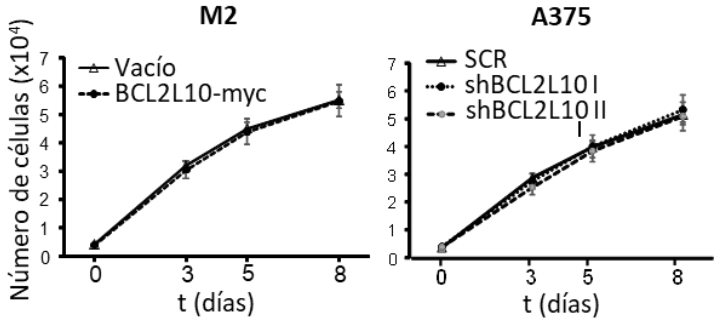


Fig. 53. BCL2L10 no afecta el crecimiento celular. *Células M2-vacío y M2-BCL2L10-myc (izquierda) y A375-SCR, A375-shBCL2L10 I y A375-shBCL2L10 II (derecha) se cultivaron durante 8 días y se determinó la densidad celular usando un ensayo de cristal violeta. Los resultados se muestran como la media ± DE (n = 3). La significancia estadística se calculó utilizando ANOVA + prueba de Tukey.*

A continuación, se evaluaron los cambios en la respuesta celular a agentes quimioterapéuticos estándares. Para estos experimentos, se midió la citotoxicidad con el ensayo de cristal violeta que, por experiencia previa del laboratorio demostró ser más sensible que MTT y otros métodos a la hora de examinar el impacto de fármacos citotóxicos en la supervivencia celular.

Los agentes quimioterapéuticos probados fueron Cis y DAC. En primer lugar, se determinaron las concentraciones y tiempo de incubación a utilizar de los distintos compuestos. Para el caso de Cis se ensayaron las concentraciones 10, 20, 40 y 80 µM; y para la DAC 16.7, 25, 50, 100 y 200 µg/ml con un tiempo de incubación de 48 hs (datos no mostrados). En todos los casos se seleccionó aquella mínima concentración que provocase entre un 40 - 50% de muerte celular de manera de poder observar luego efectos de incremento o disminución. Por lo que se utilizó 40 µM de Cis y 100 µg/ml de DAC.

Las líneas celulares de sobreexpresión y silenciamiento de BCL2L10, M2-vacío (control) y M2-BCL2L10-myc, A375-SCR (control), A375-shBCL2L10 I y A375-shBCL2L10 II, se incubaron en medio de cultivo con suero 10% a 37 °C en estufa de CO_2 durante 24 hs y luego se realizaron los tratamientos con 40 µM de Cis o 100 µg/ml de DAC durante 48 hs, utilizando DMSO como control de los tratamientos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Fig. 54**.

La sobreexpresión de A375-BCL2L10-myc redujo significativamente la citotoxicidad inducida por Cis (**Fig. 54A**) y Dac (**Fig. 54B**) en comparación con las células M2-vacío. Por otro lado, las líneas celulares de silenciamiento, A375-shBCL2L10 I y A375-shBCL2L10 II, resultaron más sensibles al Cis en comparación con las células A375-SCR (**Fig. 54C**).

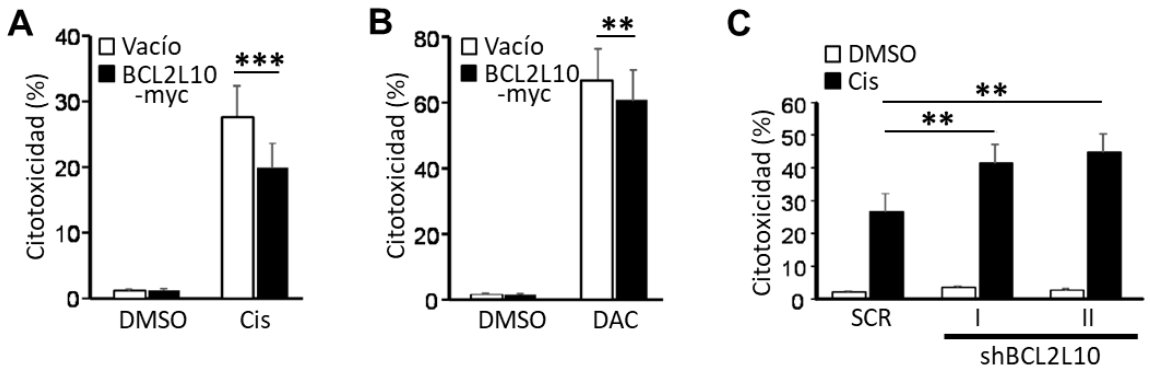


Fig. 54. BCL2L10 protege de la citotoxicidad producida por agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN. *Células M2-vacío y M2-BCL2L10-myc fueron tratados con 40 µM de Cis (A) o 100 µg/mL de DAC (B) durante 48 hs y se determinó el porcentaje de citotoxicidad mediante el ensayo de cristal violeta. El gráfico de barras muestra la media ± DE (n = 7 para Cis y n = 5 para DAC) del porcentaje de citotoxicidad. (C) Células A375-SCR, A375-shBCL2L10 I y A375-shBCL2L10 II se trataron con 40 µM de Cis durante 48 hs y se determinó el porcentaje de citotoxicidad mediante el ensayo de cristal violeta. El gráfico de barras muestra la media ± DE (n = 3) del porcentaje de citotoxicidad. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como el cociente entre el número de células en pocillos tratados y el número de células en pocillos no tratados multiplicado por 100. La significancia estadística se calculó utilizando ANOVA + prueba de Tukey. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.*

Para confirmar estos resultados, se evaluó la muerte celular por apoptosis de dos maneras distintas en células M2-vacío y M2-BCL2L10-myc tratadas con Cis. En primer lugar, se analizó el clivaje de las caspasas medido como la proporción de caspasa clivada sobre caspasa no clivada. En segundo lugar, se analizó con citometría de flujo por tinción de Anexina V e IP. Como los eventos que registra esta técnica son anteriores a la muerte celular en sí evaluada anteriormente, se redujo el tiempo de incubación con el agente quimioterapéutico a 24 hs.

Como se observa en la **Fig. 55** la sobreexpresión de BCL2L10-myc redujo las formas clivadas de CASP3 y CASP8 (**Fig. 55 A-B**) y la cantidad de células positivas a Anexina V tras el tratamiento con Cis (**Fig. 55 C-D**).

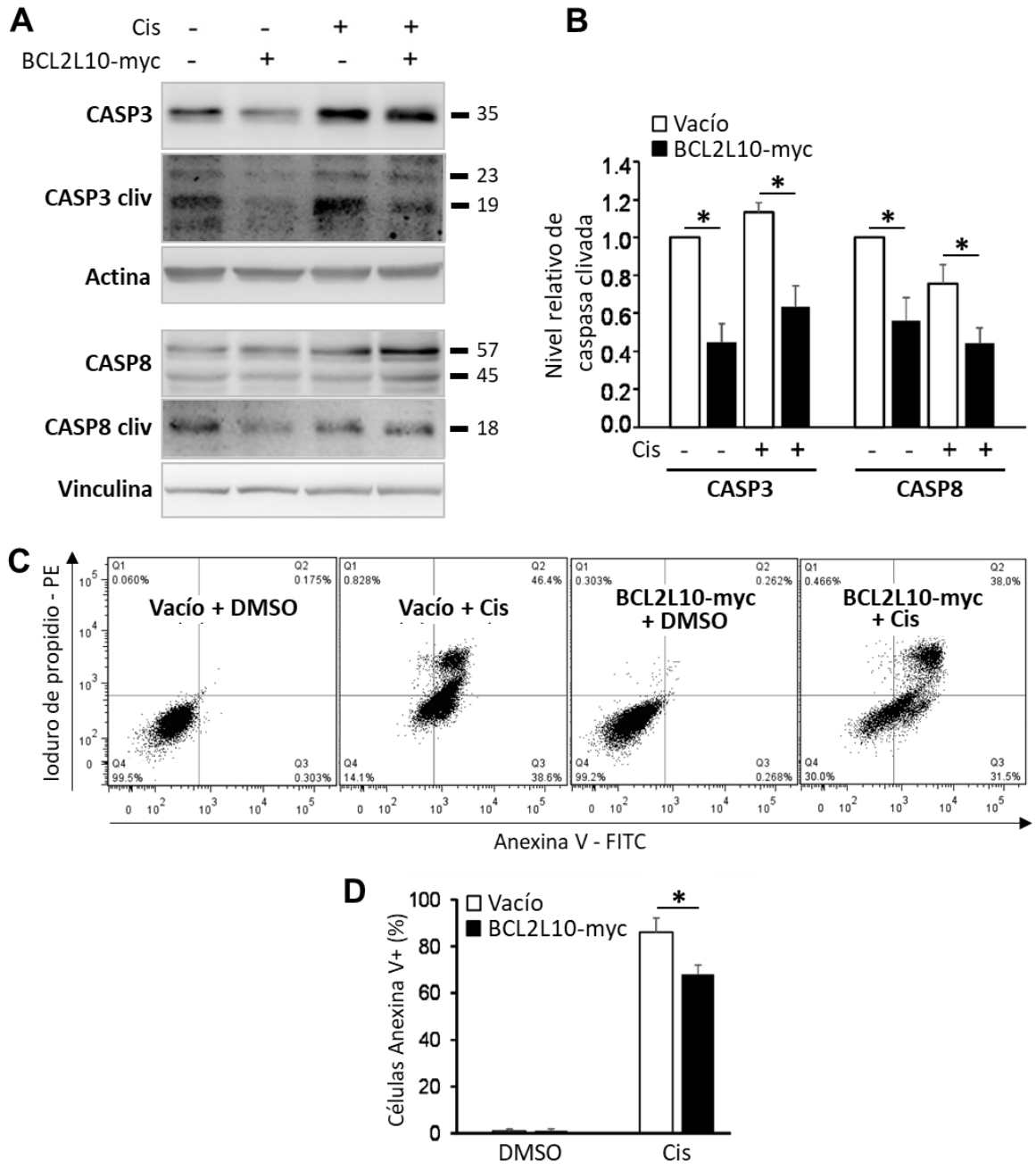


Fig. 55. BCL2L10 protege de la muerte celular por apoptosis inducida por Cis. *(A) Células M2-vacío y M2-BCL2L10-myc se trataron con 40 µM de Cis durante 24 hs y evaluadas por WB. Los extractos proteicos se probaron con anticuerpos contra CASP3 de longitud completa y clivada o CASP8. La actina y vinculina se utilizaron como controles de carga. (B) Los gráficos de barra muestran la media ± DE (n = 3) entre la caspasa clivada (fragmento de 19 kDa para CASP3 y 18 kDa para CASP8) y CASP3 o CASP8 de longitud completa, no clivada, del experimento en (A). Esta relación se expresa como el cambio de veces relativo a la relación medida en células M2-vacío tratadas con DMSO. (C) Células M2-vacío y M2-BCL2L10-myc se trataron con 40 µM de Cis durante 24 hs, se tiñeron con Anexina V/IP y se analizaron por citometría de flujo. Se muestran los histogramas representativos. (D) El gráfico de barras muestra la media ± DE (n = 3) del porcentaje de células positivas a Anexina V del experimento en (C). La significancia estadística se calculó utilizando ANOVA + prueba de Tukey. Cis: cisplatino. * p < 0.05.*

Estos resultados indican que BCL2L10 promueve la supervivencia celular en células sometidas a tratamiento con agentes que dañan el ADN.

Si bien encontramos diferencias al variar los niveles de BCL2L10 en la respuesta a los tratamientos con los agentes quimioterapéuticos, estas diferencias fueron de una magnitud moderada. Por ello, evaluamos si la resistencia a Cis promovida por BCL2L10 resulta enmascarada por la acción de otros miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 con un papel similar. Se sabe que los seis miembros de la subfamilia tienen funciones tanto redundantes como propias y que la resistencia al Cis en melanoma es promovida, además de por BCL2L10 (**Fig. 54A, Fig. 54C** y **Fig. 55**), por BCL2, BCL-XL y MCL1. Para realizar este experimento se utilizó un compuesto denominado ABT-737, una molécula pequeña mimética de BH3 que se une con alta afinidad a BCL2, BCL-XL y BCL-W inhibiéndolos, pero no inhibe a MCL1, BFL1 y BCL2L10. Por ello, para evaluar el efecto de la expresión de BCL2L10 habiendo a la par neutralizado la contribución de otras proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, células M2-vacío y M2-BCL2L10-myc se trataron con Cis y ABT-737 por separado y en combinación durante 48 hs. Cabe mencionar que se redujo la concentración del Cis utilizada de 40 a 10 µM para evitar una muerte celular excesiva, ya que la combinación de ABT-737 y Cis tiene un efecto de destrucción sinérgico en las células de melanoma.

Como se observa en la **Fig. 56**, el tratamiento con 10 µM de Cis o 2.5 µM de ABT-737 indujo menos del 10% de muerte celular en células M2-vacío, pero la combinación de los compuestos aumentó la citotoxicidad hasta un 34.7% en estas células. Sin embargo, la expresión de BCL2L10 redujo significativamente la citotoxicidad inducida por el tratamiento de combinación al 13.7%.

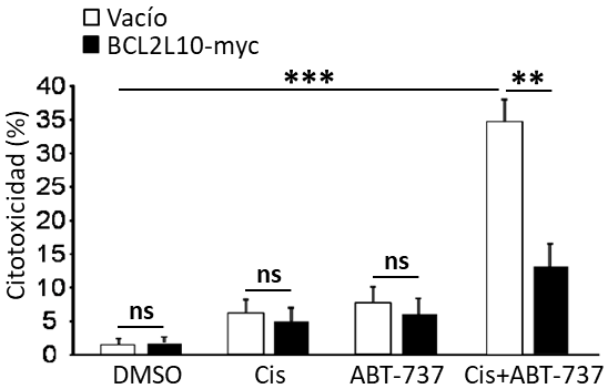


Fig. 56. BCL2L10 contribuye a la resistencia al Cis. *Células M2-vacío y M2-BCL2L10-myc se trataron con 2.5 µM de ABT-737, 10 µM de Cis o 2.5 µM de ABT-737 más 10 µM de Cis y se determinó el porcentaje de citotoxicidad mediante el ensayo de cristal violeta. El gráfico de barras muestra la media ± DE (n = 3) del porcentaje de citotoxicidad. La significancia estadística se calculó utilizando ANOVA + prueba de Tukey. Cis: cisplatino, ns: no significativo. **: p < 0.01, ***: p < 0.001.*

Este resultado confirma que BCL2L10 contribuye a la resistencia al cisplatino.

4.2.3.3 BCL2L10 promueve la resistencia a ABT-737

Dado que BCL2L10 (sección **4.2.3.2**), BCL2, BCL-XL y MCL1 han sido implicados en la resistencia al Cis en melanoma y la protección parcial al Cis proporcionada por BCL2L10 fue mucho mayor en presencia de ABT-737 (34.7% frente a 13.7%, **Fig. 56**) que en su ausencia (27.6% frente a 19.7%, **Fig. 54A**), se puede concluir que, al menos en lo que respecta a la resistencia al Cis, BCL2L10 puede asumir las funciones de los blancos de ABT-737 cuando son inhibidos por este fármaco. Este resultado sugiere que existen similitudes entre BCL2L10 y los blancos de ABT-737 (BCL2, BCL-XL y BCL-W).

Para explorar esto con mayor profundidad, sin la interferencia de la citotoxicidad inducida por el Cis, se quiso evaluar la muerte celular inducida exclusivamente por ABT-737 o TW-37, otro mimético de BH3 que se dirige principalmente a MCL1. Aunque ABT-737 suele ser poco citotóxico en el melanoma (**Fig. 56**), se ha demostrado que dosis más altas pueden inducir una muerte celular moderada.

Como se puede ver en la **Fig. 57**, el aumento de la concentración de ABT-737 a 10 µM indujo el 41.5% de citotoxicidad en las células M2-vacío, pero significativamente menos (25.2%) en células M2-BCL2L10-myc (**Fig. 57A**). De manera similar, BCL2L10-myc redujo la cantidad de células positivas a Anexina V (**Fig. 57 C-D**) después del tratamiento con ABT-737. En contraste, la citotoxicidad inducida por TW-37 no se vio afectada por la expresión de BCL2L10 (**Fig. 57B**). Estos resultados sugieren que BCL2L10 media la resistencia a ABT-737. Este efecto antagónico de BCL2L10 y ABT-737 refuerza la noción de que BCL2L10 podría desempeñar un papel similar a los blancos de ABT-737, BCL2, BCL-XL o BCL-W y no del blanco de TW-37, MCL1.

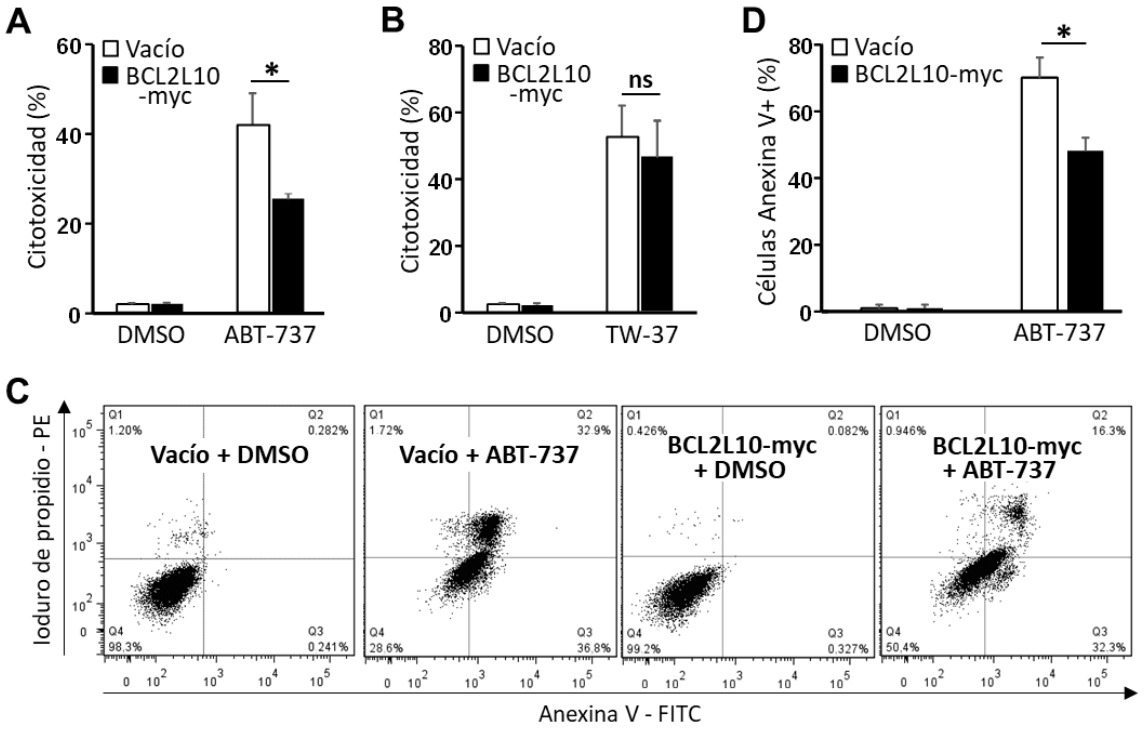


Fig. 57. La sobreexpresión de BCL2L10 disminuye la muerte por ABT-737 y no por TW-37. *(A) Células M2-vacío y M2-BCL2L10-myc se trataron con 10 µM de ABT-737 durante 48 hs y se determinó el porcentaje de citotoxicidad mediante el ensayo de cristal violeta. El gráfico de barras muestra la media ± DE (n = 4) del porcentaje de citotoxicidad. (B) Células M2-vacío y M2-BCL2L10-myc se trataron con 5 µM de TW-37 durante 48 hs y se determinó el porcentaje de citotoxicidad mediante el ensayo de cristal violeta. El gráfico de barras muestra la media ± DE (n = 5) del porcentaje de citotoxicidad. (C) Células M2-vacío y M2-BCL2L10-myc se trataron con 10 µM de ABT-737 durante 24 hs, se tiñeron con Anexina V/IP y analizaron por citometría de flujo. En cada panel se muestran gráficos de puntos representativos de cada condición experimental. (D) Gráfico de barras de la media ± DE (n = 3) del porcentaje de células positivas a Anexina V respecto del total para células del experimento en (C). La significancia estadística se calculó utilizando ANOVA + prueba de Tukey. ns: no significativo. *: p < 0.01, ** p < 0.001.*

Para confirmar este hallazgo se utilizó el enfoque opuesto, es decir inhibiendo a BCL2L10. En este caso se emplearon dos estrategias distintas inhibiendo BCL2L10 a nivel genético o farmacológicamente. En primer término, se realizaron experimentos empleando células con silenciamiento de BCL2L10. En segundo lugar, se utilizó el compuesto ML258 para suprimir la función BCL2L10. ML258 es un mimético de BH3 desarrollado en el laboratorio del Dr. John Reed (*The Burnham Institute*) que inhibe específicamente la interacción Bim:BCL2L10.

Los experimentos en que se utilizaron las células con silenciamiento de BCL2L10 mostraron que, ABT-737 indujo mayor citotoxicidad en las células A375-shBCL2L10 (I y II), en forma significativa, en comparación con las células A375-SCR (**Fig. 58A**), confirmando que BCL2L10 está implicado en la resistencia de las células de melanoma a ABT-737. Dado que la concentración utilizada de ABT-737 se considera alta (10 µM), es improbable que este efecto se deba a una inhibición sub-óptima de las proteínas Bcl-2 por el fármaco. En cambio, la

muerte celular adicional observada en las células A375-shBCL2L10 se puede atribuir a funciones de BCL2L10 distintas a las de los blancos de ABT-737. Al emplear el compuesto ML258 se observó que este tuvo un efecto citotóxico pobre por sí mismo, pero indujo un aumento significativo en la muerte celular en presencia de ABT-737, según lo determinado en el ensayo de citotoxicidad de cristal violeta (**Fig. 58B**) y tinción de Anexina V (**Fig. 58 C-D**), confirmando los resultados obtenidos en células con silenciamiento de BCL2L10.

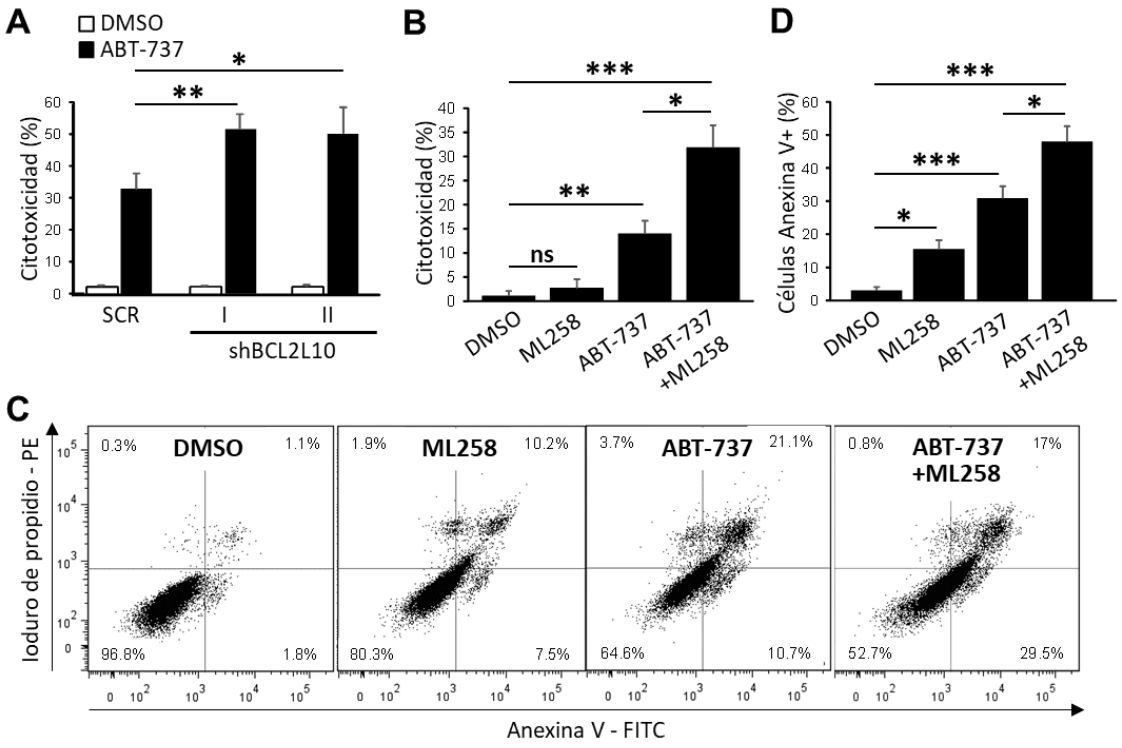


Fig. 58. La inhibición de BCL2L10 aumenta la muerte por ABT-737. *(A) Células A375-SCR, A375-shBCL2L10 I y A375-shBCL2L10 II se trataron con 10 µM de ABT-737 y se determinó el porcentaje de citotoxicidad mediante el ensayo de cristal violeta. El gráfico de barras muestra media ± DE (n = 3) del porcentaje de citotoxicidad. (B) Células A375 wt se trataron con 2.5 µM de ABT-737 y 10 µM de ML258 (solos o en combinación) y se determinó el porcentaje de citotoxicidad mediante el ensayo de citotoxicidad de cristal violeta. El gráfico de barras muestra la media ± DE (n = 3) del porcentaje de citotoxicidad. (C) Células A375 se trataron con 10 µM de ABT-737 y 40 µM de ML258 (solos o en combinación) durante 24 hs, se tiñeron con Anexina V/IP y analizaron por flujo citometría. En cada panel se muestran gráficos de puntos representativos de cada condición experimental. (D) Gráfico de barras de la media ± DE (n = 3) del porcentaje de células positivas a Anexina V respecto del total para células del experimento en (C). La significancia estadística se calculó utilizando ANOVA + prueba de Tukey. ns: no significativo. *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001.*

En conjunto, estos resultados indican que BCL2L10 está implicado en la resistencia a ABT-737, tiene funciones compartidas y distintivas con BCL2, BCL-XL y/o BCL-W (blancos de ABT-737) y no se superpone con la función de MCL1 (blanco de TW-37).

4.2.3.4 BCL2L10 aumenta la supervivencia de células de melanoma tratadas con PLX-4032 y Cisplatino o ABT-737

Las mutaciones en BRAF son frecuentes en melanoma, por lo que su inhibición es uno de los enfoques actuales para tratar a los pacientes con melanoma. Sin embargo, esta estrategia solo es efectiva en el corto plazo, debido al desarrollo de resistencia al tratamiento. Por ello se encuentra actualmente en estudio la combinación de inhibidores de BRAF con otras estrategias terapéuticas (inmunoterapia, quimioterapia estándar o el uso de miméticos de BH3).

Por este motivo, en esta sección se estudiará el rol de BCL2L10 cuando el insulto citotóxico se produce al inhibir BRAF mediante el empleo de PLX-4032 (inhibidor de BRAFV600E) en conjunto con Cis o ABT-737. Para ello se utilizaron células M2-vacío y M2-BCL2L10-myc que fueron tratadas por 48 hs con los tratamientos antes mencionados.

Como se ve en la **Fig. 59**, ambos tratamientos combinados tuvieron mayor citotoxicidad que cualquier droga sola. Además, las células M2-BCL2L10-myc presentaron una citotoxicidad significativamente menor en comparación con las células M2-vacío tras el tratamiento tanto con PLX + Cis como con PLX + ABT-737.

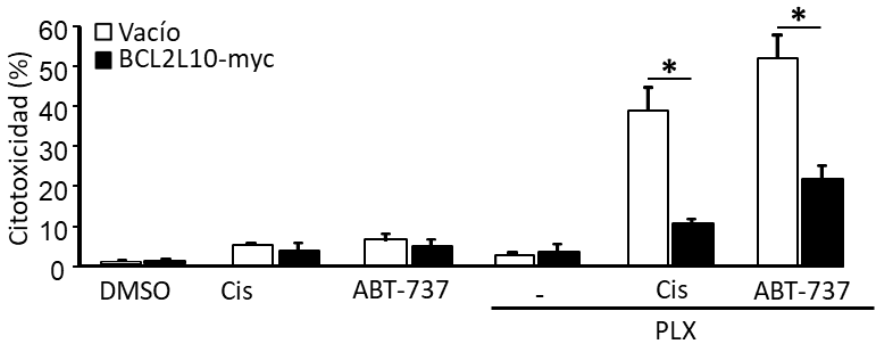


Fig. 59. BCL2L10 protege las células de melanoma de la muerte celular tras el tratamiento con PLX más Cis o ABT-737. *Células M2-vacío y M2-BCL2L10-myc fueron tratados durante 48 hs con 1 µM de PLX, 10 µM de Cis y 2.5 µM de ABT-737. El porcentaje de citotoxicidad se determinó utilizando el ensayo de cristal violeta. El gráfico de barras muestra la media ± DE (n = 3) del porcentaje de citotoxicidad. La significancia estadística se calculó utilizando ANOVA + prueba de Tukey. PLX: PLX-4032, Cis: cisplatino. *: p < 0.05.*

Este resultado indica que la expresión BCL2L10 protege a las células de melanoma del Cis y ABT-737, incluso cuando estos medicamentos se combinan con inhibidores de BRAF.

Conclusiones

5. Conclusiones

A continuación, se enumerarán las conclusiones obtenidas a lo largo de esta Tesis Doctoral. En razón del material utilizado durante la misma, estas conclusiones son válidas en el contexto de melanoma.

- ROR1 se expresa alta y frecuentemente en todos los estadios de la enfermedad, aún en los poco avanzados (**Fig. 20** y **Tabla 2**).
- Se observó expresión de ROR1 en más del 90% de los pacientes analizados (**Tabla 2**).
- ROR1 regula positivamente a AKT (**Fig. 22**), ERK (**Fig. 23**) y p65 (**Fig. 24**).
- ROR1 activa a STAT3 promoviendo su fosforilación (**Fig. 25**).
- El enriquecimiento de DEGs mostró que ROR1 y ROR2 se vinculan a la activación de genes involucrados en la firma genética "HALLMARK EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION" (TEM) y en los procesos biológicos asociados, como motilidad, migración y locomoción celular y organización de la matriz extracelular en pacientes con melanoma PRI y MET (**Tabla 5**, **Tabla 6** y **Anexo D.4**).
- El análisis de los genes obtenidos en la firma genética "HALLMARK EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION" para ROR1 y ROR2 mostró que ROR1 se asocia a genes TEM exclusivos y compartidos con ROR2 (**Fig. 27** y **Fig. 28**).
- El enriquecimiento de DEGs mostró que ROR1, ROR2 y PTK7 se asocian a la activación, en contraposición con RYK que se vincula a la inhibición, de genes relacionados a migración y locomoción celular (**Tabla 5** y **Anexo D.4**).
- El enriquecimiento de DEGs mostró que ROR1, RYK y PTK7 se relacionan a la inhibición, en contraposición con ROR2 que se asocia a la activación, de genes involucrados en firmas genéticas relacionadas con "HALLMARK Apoptosis" en pacientes con melanoma MET (**Tabla 5** y **Tabla 6**).
- El enriquecimiento de DEGs mostró que ROR1, RYK y PTK7 se asocian a la inhibición, en contraposición con ROR2 que se relaciona a la activación, de genes involucrados en firmas genéticas relacionadas con la respuesta inmune anti-tumoral como "HALLMARK IL2 STAT5 SIGNALING", "HALLMARK COMPLEMENT" y "HALLMARK INFLAMMATORY RESPONSE" en pacientes con melanoma MET (**Tabla 5** y **Tabla 6**).
- La comparación entre los DEGs DN de ROR1 y UP de ROR2 obtenidos en la firma genética "HALLMARK APOPTOSIS" mostró muy poca superposición, lo que sugiere que ROR1 y ROR2 se asociaron con diferentes genes implicados en la apoptosis (**Fig. 29**).
- La comparación de las firmas genéticas obtenidas del enriquecimiento de DEGs de ROR1, ROR2, RYK y PTK7 entre muestras PRI y MET indica que el papel de ROR1 y PTK7, a diferencia de ROR2 y RYK, variaría a lo largo de la progresión del melanoma

(dado que no se observan similitudes entre las firmas genéticas obtenidas en PRI y MET) (**Tabla 5**, **Tabla 6**, **Anexo D.4** y **Anexo D.5**).

- ROR1 reduce el clivaje de PARP1 y CASP3, reflejando una disminución de la actividad de caspasas y de la apoptosis (**Fig. 30** y **Fig. 31**).
- ROR1 inhibe la apoptosis inducida por los tratamientos con cisplatino, PLX-4032, doxorrubicina, estaurosporina y camptotecina (**Fig. 34**, **Fig. 35**, **Fig. 37** y **Fig. 38**).
- ROR1 regula positivamente la expresión de las proteínas anti-apoptóticas BCL2, BCL-XL, MCL1 y BCL2L10 (**Fig. 39** y **Fig. 40**).
- ROR1 regula a BCL2, BCL-XL y BCL2L10 vía STAT3 (**Fig. 42** y **Fig. 44**).
- BCL2L10 se expresa frecuente y fuertemente en el melanoma (**Fig. 45**, **Fig. 48** y **Tabla 8**).
- La transcripción de BCL2L10 es activada por STAT3 a través de dos sitios reguladores presentes en el promotor de BCL2L10 en las posiciones -1306 y -559 (**Fig. 50B**).
- BCL2L10 promueve la supervivencia celular de células sometidas al tratamiento con agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN (**Fig. 54** y **Fig. 55**).
- BCL2L10 contribuye a la resistencia al cisplatino (**Fig. 56**).
- BCL2L10 contribuye a la resistencia a ABT-737 (**Fig. 57** y **Fig. 58**).
- BCL2L10 puede desempeñar funciones similares y distintas a BCL2, BCL-XL y/o BCL-W; y no tendría superposición con la función de MCL1 (**Fig. 57** y **Fig. 58**).
- BCL2L10 protege de la muerte celular provocada por el cisplatino y ABT-737, incluso cuando estos medicamentos se combinan con inhibidores de BRAF como PLX-4032 (**Fig. 59**).

Discusión

6. Discusión

Los trabajos de investigación realizados en la última década han consolidado a ROR1 como una proteína de interés en cáncer. Uno de los ejes en los que se basa este interés es que se ha establecido que ROR1 se sobreexpresa en diferentes tipos de cánceres, tanto en neoplasias hematológicas como en tumores sólidos (166). En numerosos casos, ROR1 incluso ha sido propuesto como un nuevo marcador pronóstico, como por ejemplo, en cáncer de ovario (200), pulmón (201), mama (202) y colon (203). Más aun, en función de su patrón de expresión, se ha catalogado a ROR1 como un antígeno oncofetal. Esta definición obedece a que su expresión es observada durante el desarrollo embrionario y en tejidos tumorales en el adulto. Se deduce de ello, y se ha verificado experimentalmente, que su expresión es baja o nula en tejidos normales en el individuo adulto. Esta característica singular representa una gran ventaja a la hora de pensar estrategias terapéuticas en cáncer ya que minimiza el impacto de reacciones adversas por interferencias de la terapia con procesos vitales de las células normales. El segundo eje de importancia en la consideración de ROR1 como una proteína relevante en cáncer es el rol biológico que juega en la célula tumoral. La expresión desregulada de ROR1 se ha asociado con varias características celulares que promueven la malignidad, como proliferación celular, supervivencia, disminución de la apoptosis, migración, invasión y metástasis.

Por estas características, ROR1 ha sido postulado como un nuevo blanco terapéutico en distintos tipos de cáncer. A diferencia de otros blancos terapéuticos, en el caso de ROR1 se han estudiado dos estrategias terapéuticas marcadamente diferentes. En la primera de ellas ROR1 es utilizado como antígeno tumoral por su marcada expresión en tejidos tumorales. En la segunda estrategia se busca inhibir su actividad biológica asociada a distintos mecanismos de la progresión tumoral. En esta tesis se trabajó sobre ambos aspectos.

La primera de las estrategias terapéuticas aprovecha la expresión diferencial de ROR1 en las células tumorales con respecto al tejido normal. En esta estrategia, la expresión de ROR1 en el tumor es utilizada para dirigir moléculas o células específicamente contra el tumor, mediante el acoplamiento a anticuerpos contra ROR1. Una aplicación de esta estrategia es la utilización de toxinas que son dirigidas por el anticuerpo directamente hasta las células tumorales. Esta estrategia también es utilizada para aumentar la citotoxicidad de las células tumorales por parte de las células inmunes mediante el uso de anticuerpos biespecíficos (biAbs) o de células inmunes implantadas en el contexto de terapias CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T-Cell*). En muchos casos, como se detalló en la **Introducción**, estos enfoques terapéuticos contra ROR1 se encuentran en proceso de evaluación en ensayos clínicos. Tal es el caso de VLS-101, un anticuerpo monoclonal contra ROR1 acoplado a la citotoxina antimicrotúbulo monometil auristatina E (MMAE). La unión de VLS-101 a ROR1 resulta en una rápida internalización celular y liberación de MMAE induciendo la muerte de las células tumorales. VLS-101 fue probado en un ensayo clínico de fase I (NCT03833180), donde se observó que este compuesto presenta un perfil de seguridad tolerable y una actividad

antitumoral prometedora en pacientes con distintos tipos de linfomas previamente tratados (220). Otro ejemplo es el desarrollo de células CAR-T ROR1, que también se encuentran en un estudio de fase I (NCT02706392), el cual incluye pacientes con distintas neoplasias. Si bien este estudio no arrojó resultados relevantes, dado que las células CAR-T no pudieron penetrar en el tumor (228), otros ensayos clínicos con células CAR-T ROR1 se encuentran previstos (229).

Para trasladar el uso de estas herramientas terapéuticas a otros tipos de cáncer, como por ejemplo melanoma, es de vital importancia conocer que características posee la expresión de ROR1 en cada caso. Los trabajos que han investigado la expresión de ROR1 en melanoma publicados hasta la fecha son escasos. En el año 2013, O'Connell y col. mostraron la expresión de ROR1 en líneas celulares de melanoma y describieron que la expresión de ROR1 es mayor en líneas celulares con un fenotipo proliferativo y poco invasivo, y que disminuye en las líneas con fenotipo invasivo y poco proliferativo (212). En el año 2015, Fernández y col. analizaron distintas líneas celulares de melanoma, y mostraron la expresión de ROR1 en niveles similares tanto en las células de origen primario como metastásico (208). Además, en contraposición con los resultados de O'Connell y col. demostraron que ROR1 se expresa por igual en las líneas celulares de ambos fenotipos, invasivos y proliferativos (208). Una de las observaciones más importantes de ese trabajo es la descripción por primera vez de datos de la expresión de ROR1 en pacientes con melanoma. En la presente tesis doctoral estas observaciones se profundizaron mediante análisis bioinformáticos y de inmunohistoquímica. En primer lugar, se ha confirmado que ROR1 presenta una elevada expresión en melanomas primarios y metastásicos. Más aun, por primera vez se ha estudiado la expresión de ROR1 en pacientes en distintos estadíos TNM de la enfermedad. Este análisis concluyó que ROR1 se expresa en forma elevada en todos los estadios de la enfermedad, aún en los menos avanzados como el *in situ* (Estadío 0).

Los estudios realizados muestran que ROR1 se expresa en el 90.9% de los pacientes. Esta fracción elevadísima de pacientes positivos para ROR1 resultó mayor a la descripta en otros tipos tumorales. En pacientes con adenocarcinoma de pulmón se ha encontrado un porcentaje de expresión de ROR1 positivo del 42.3% para pacientes masculinos y del 28.4% para pacientes femeninas (201). En cáncer de ovario se ha reportado un 50% de pacientes positivos para ROR1, con tinción de ROR1 por inmunohistoquímica predominantemente de membrana y citoplasmática (193). En pacientes con cáncer de mama, el 57% de las muestras fueron ROR1 positivas (193). Un estudio realizado en el año 2024 reportó, mediante análisis inmunohistoquímicos, una alta prevalencia de expresión de ROR1 en mesotelioma (84.6%), liposarcoma (36.1%), tumores del estroma gastrointestinal (33.3%) y carcinoma endometrioide uterino (28.9%) (301). En otros tipos tumorales, como carcinoma hepatocelular, urotelial y de colon, mostraron una menor expresión general de ROR1, que osciló entre el 0.9% y el 13% (301). Esta comparación con lo observado en otros tipos de cáncer sustenta el uso de ROR1 como antígeno tumoral en terapias dirigidas contra el tumor en pacientes con melanoma.

Interesantemente, el análisis de algunas bases de datos públicas de pacientes con melanoma reveló que una elevada expresión de ROR1 se asoció a una menor Sobrevida Post-Recurrencia (208). Sin embargo, no resulta claro que características particulares de esos distintos grupos de pacientes hacen que ROR1 se comporte como marcador de sobrevida solo en algunos de ellos. Por este motivo, uno de los objetivos iniciales era estudiar la expresión de ROR1 en melanoma en pacientes locales en un contexto que permitiera realizar estudios de sobrevida. Lamentablemente, hemos encontrado muchas dificultades para obtener muestras de pacientes con melanoma con una historia clínica detallada. En la mayoría de los casos la información asociada a las muestras se limitó al estadio TNM, edad y sexo del paciente y sitio de extracción. Otros datos de relevancia, como Sobrevida Global, Sobrevida Libre de Recaída Local, Sobrevida Libre de Recaída a Distancia y Sobrevida Libre de Progresión, no han sido registrados en ninguna de las tres instituciones que nos han proporcionado las muestras para nuestro estudio, imposibilitando estudiar el impacto de ROR1 en la evolución de los pacientes.

La segunda estrategia terapéutica que se está estudiando para ROR1 utiliza inhibidores farmacológicos que inhiben la actividad de ROR1 en la célula tumoral y, por consiguiente, los mecanismos biológicos controlados por ROR1. En este sentido se destaca el desarrollo del compuesto KAN0439834, que se une al dominio tirosina quinasa e inhibe tanto vías de señalización ubicadas río abajo como algunos procesos biológicos mediados por ROR1 en cáncer de páncreas (231,232). Alternativamente, las actividades mediadas por ROR1 también pueden ser inhibidas empleando un anticuerpo monoclonal. Este es el caso de un monoclonal denominado cirmtuzumab que ha sido evaluado en ensayos clínicos de fase I y II en neoplasias malignas hematológicas de células B, donde ROR1 ha sido identificado como un marcador tumoral, y en tumores sólidos que expresan ROR1, como es el caso del cáncer de mama (302).

Resulta evidente que para emplear esta última estrategia terapéutica en melanoma es indispensable conocer en detalle los mecanismos biológicos regulados por ROR1, que comenzaron a ser explorados recién en la segunda década de este siglo. Los primeros trabajos en ese sentido mostraron que una mayor expresión de ROR1 se asociaba con una mayor tumorigénesis y que ROR1 mediaba proliferación, migración, invasión, TEM, metástasis y crecimiento tumoral in vivo. El primer trabajo que estudió ROR1 en melanoma fue publicado en el año 2013 y, sorprendentemente, describió un rol totalmente opuesto para esta proteína. O'Connell y col. mostraron que la eliminación de ROR1 aumentó la invasión *in vitro* así como la metástasis *in vivo* (212). En el año 2016, un trabajo de nuestro laboratorio refutó las observaciones de O'Connell y colaboradores demostrando que ROR1 aumenta la proliferación celular, disminuye la adhesión celular y aumenta la motilidad y migración celular en melanoma, además de inducir la expresión de marcadores mesenquimales, como N-cadherina y Vimentina favoreciendo la TEM (208). Con el correr de los años, estas últimas observaciones fueron ratificadas y quedó claro que ROR1 es un factor pro-tumorigénico en melanoma y en cáncer en general. El presente trabajo ha contribuido al entendimiento de las funciones de ROR1, al describir su rol en la supervivencia celular.

Recientemente, el conjunto de evidencias que describen los procesos celulares regulados por ROR1 en cáncer, así como los mecanismos moleculares involucrados, han sido recopilados en el trabajo de revisión realizado por Quezada y Lopez-Bergami (2023).

Esta tesis doctoral ha explorado funciones no descriptas de ROR1 hasta la fecha y ha profundizado en el conocimiento de otras ya descriptas. Uno de los abordajes utilizados en esta Tesis Doctoral fue el análisis bioinformático de datos de expresión génica.

Los estudios tradicionales destinados a conocer la función de una proteína en cáncer suelen tener un enfoque reduccionista ya que exploran uno o unos pocos mecanismos biológicos a la vez. Frecuentemente, esto ocurre por limitaciones inherentes a la investigación científica. En estos casos, la elección de los mecanismos biológicos a estudiar responde, en muchos casos, a distintos factores tales como la experiencia previa del laboratorio, las técnicas que ese laboratorio desarrolla, inclinaciones particulares de los investigadores, o por algún hallazgo previo. Si bien estos estudios poseen gran importancia y han cimentado nuestro conocimiento actual, no permiten, por si solos, contar con una mirada amplia de los distintos procesos biológicos que regula la proteína en estudio. Por el contrario, los estudios bioinformáticos permiten conocer sin influencias ni condicionamiento externo y sin datos previos, una serie de procesos de una forma en que quizás sería difícil de hacer mediante estudios convencionales.

Por este motivo, se decidió estudiar el rol de ROR1 en melanoma empleando análisis bioinformáticos. Además, esta estrategia permitió cumplir con otro objetivo de este trabajo, que es establecer similitudes y diferencias en los roles de los cuatro receptores de tirosina quinasa de WNT5A.

Es importante mencionar que para el análisis bioinformático se utilizaron datos de expresión génica (ARN mensajero) de pacientes con melanoma de forma tal de determinar los genes diferencialmente expresados (DEGs) asociados a cada receptor mencionado. La utilización de datos proteómicos, que quizás sería mucho más reveladora, no es posible por el momento. Otro punto a tener en cuenta es que, el trabajo realizado se basa en el análisis de seis datasets. Si bien, a nuestro criterio, este número de datasets permite llegar a conclusiones relevantes y válidas, hubiese sido deseable poder trabajar con un mayor número de datasets. Esto no ha sido posible, en parte, porque el número de análisis de este tipo disponibles para melanoma es pequeño comparado con otros tipos de tumores. Otro factor es que muchos datasets tuvieron que ser descartados al no cumplir con los criterios de inclusión determinados.

El primer resultado para destacar, del análisis bioinfomático realizado, es que el mismo asoció a ROR1 con procesos biológicos que ya habían sido vinculados a ROR1 a partir del trabajo experimental con líneas celulares. Este es el caso de procesos tales como TEM, motilidad, migración, locomoción, organización de la matriz extracelular y diferenciación celular (208,282). Este resultado también actúa como un importante y necesario mecanismo de validación del análisis bioinformático realizado, dando certezas acerca de la relevancia de

otras observaciones surgidas de dicho análisis y que no pueden ser contrastadas con la evidencia experimental, por no contar con ella.

El análisis también posibilitó obtener DEGs asociados a otros receptores de WNT5A como ROR2, RYK y PTK7, y así poder extraer distintas conclusiones en cuanto a sus respectivos roles en melanoma. En primer lugar, los resultados del análisis permitieron confirmar la relación directa existente entre ambos receptores ROR y la inducción de TEM descripta previamente. Se pudo observar que ROR1 y ROR2 se asocian positivamente a genes relacionados a TEM tanto en etapas tempranas (melanoma primario) como en tardías (melanoma metastásico). En el caso de ROR1 se observó un mayor enriquecimiento de TEM en las muestras metastásicas que en las primarias, lo que podría indicar una asociación más fuerte de ROR1 con TEM en esta etapa de la enfermedad. El análisis realizado mostró, además, que ambos receptores poseen cierta superposición en la regulación de genes TEM, pero, por otra parte, también poseen mecanismos propios exclusivos de cada receptor. De esta manera, puede esperarse que una mayor expresión en forma simultánea de ROR1 y ROR2 potenciará mucho más la aparición del fenotipo mesenquimal.

De los resultados obtenidos surge con claridad la noción de las profundas diferencias que existen en la función de ROR1 y ROR2, por un lado y, RYK y PTK, por el otro, en relación al proceso de TEM. En efecto, a diferencia de la fuerte asociación de ROR1 y ROR2 con este proceso, no se detectó que RYK y PTK7 estén asociados a genes relacionados con TEM. RYK presenta otras características que lo ubican en las antípodas de ROR1 y ROR2, ya que se observó que este receptor se asoció a firmas genéticas que inhiben la motilidad, migración y locomoción celular en muestras MET. Esto muestra que los receptores de WNT5A pueden mediar efectos totalmente contrapuestos en la migración celular y TEM. Antecedentes previos han descripto la señalización Wnt/RYK en varios tipos de cáncer, pero sin llegar a establecer con claridad el rol de esta proteína. Estos estudios describen que RYK está asociado a estadios avanzados de cáncer de próstata (303), presenta correlación con tumorigénesis en cáncer gástrico (304) y es esencial para la invasividad dependiente de WNT5A en glioblastoma (305). Nuestros resultados destacan la utilidad de este tipo de análisis bioinformáticos, ya que han permitido inferir el rol de RYK en cáncer, un receptor que ha sido muy poco estudiado en esta enfermedad. En cuanto a PTK7, se pudo ver que al igual que ROR1, está relacionado positivamente con la adhesión y migración celular y la locomoción, resultados similares validados experimentalmente fueron observados en cáncer de ovario (306) y de pulmón (307).

Otros procesos biológicos en los que ha sido posible realizar comparaciones entre los cuatro receptores de WNT5A, es en lo relativo a la regulación de la respuesta inmune y apoptosis. Nuestro análisis reveló que ROR1, RYK y PTK7 tendrían un rol similar contribuyendo a inhibir estos procesos, mientras que ROR2 antagonizaría esta función promoviendo la respuesta inmune y la apoptosis. Interesantemente se ha visto que PTK7 regula apoptosis inhibiéndola en cáncer de tiroides (308), células madre cancerosas (309), carcinoma esofágico de células escamosas (310) y cáncer de colon (311). Respecto a ROR2,

se ha descrito un rol dual en apoptosis en diferentes tipos de tumores (167), pero en ningún caso se ha estudiado su función en apoptosis en melanoma.

Resulta particularmente interesante que, hasta la fecha, ninguno de los cuatro receptores de WNT5A aquí estudiados han sido implicados en la regulación de la respuesta inmune. Sin embargo, sí se ha descripto un rol dual de WNT5A en la regulación de la respuesta inmune en el microambiente tumoral. Primero, activando la vía autocrina AKT/p65 que promueve la inflamación y la quimiotaxis de las células inmunitarias. Luego, WNT5A activa la vía TLR/MyD88/p50 exclusivamente en células mielomonocíticas, promoviendo la síntesis de la citoquina anti-inflamatoria IL10 y un fenotipo tolerogénico. Como resultado de estos mecanismos, WNT5A desempeña un papel negativo en la función de las células inmunitarias, lo que contribuye a un microambiente tumoral inmunosupresor que podría contribuir a la resistencia a la inmunoterapia (312,313). En el mismo sentido, Hugo y col. describieron que WNT5A forma parte de una firma transcripcional presente en tumores con resistencia innata a PD-1, conocida como IPRES (*Innate anti-PD-1 Resistance* o Resistencia Innata anti-PD-1) (127). Queda por determinar si WNT5A contribuye significativamente al fenómeno de la resistencia innata a PD-1 o si es simplemente un biomarcador de este proceso. Dicho rol de WNT5A en la limitación de la respuesta anti-tumoral, coincide con la asociación predicha para los DEGs vinculados a ROR1, RYK y PTK7, en contraposición a los DEGs asociados a ROR2. Esto sugire que ROR1, RYK o PTK7 serían los mediadores de esta función de WNT5A. Este campo de estudio tan relevante y tan poco investigado será foco de la atención del laboratorio en los próximos años.

En resumen, el análisis bioinformático reveló que ROR1 contribuiría a la progresión de melanoma al activar TEM, adhesión, migración y motilidad celular, locomoción y quimiotaxis, y al inhibir apoptosis y distintos genes relacionados a respuesta inflamatoria anti-tumoral como los pertenecientes a las firmas genéticas relacionadas con respuesta interferón gamma, señalización IL2-STAT5, rechazo de aloinjerto y el complemento.

En párrafos anteriores se describió como el resultado del análisis bioinformático puede ser útil para inferir el rol de una proteína que ha sido poco estudiada, como por ejemplo RYK, o para guiar futuras investigaciones, como por ejemplo el rol de ROR1 en la respuesta inmune anti-tumoral. En la presente tesis doctoral, los indicios que surgieron del análisis bioinformático motivaron la realización de investigaciones para validar experimentalmente esas observaciones. Este es el caso de lo ocurrido respecto del rol de ROR1 en apoptosis. Luego de que el análisis bioinformático indicara una regulación negativa de este proceso por ROR1, se decidió verificarlo experimentalmente. Esta vinculación no había sido estudiada hasta el presente en melanoma, aunque si lo fue en otros tipos tumorales, donde se vio que ROR1 aumenta la supervivencia celular (234,295,314–319). Los estudios aquí realizados, empleando células con ganancia y perdida de función de ROR1 permitieron confirmar experimentalmente que ROR1 promueve la inhibición de la muerte celular luego de insultos citotóxicos tales como el tratamiento con camptotecina, PLX-4032, cisplatino, doxorrubicina y estaurosporina.

Dado el invariable rol de ROR1 en la inhibición de la apoptosis en cáncer, no es de extrañar que ROR1 favorezca la resistencia a la terapia contra el cáncer tanto en cultivos celulares como en pacientes tratados con quimioterapia o terapia dirigida (166). En muchos modelos de líneas celulares y células primarias, la eliminación de ROR1 mejoró la sensibilidad a varios inhibidores de moléculas pequeñas en uso clínico actual (166). Numerosas vías de señalización han sido involucradas en esta función de ROR1, entre ellas se encuentran las vías de PI3K/AKT, MEK/ERK, NF-κB y STAT3 (166,198). Si bien en esta Tesis Doctoral se demostró que ROR1 regula estas cuatro vías de señalización en melanoma se puso especial énfasis en estudiar el efecto de ROR1 en la activación de STAT3.

La señalización de STAT3 se activa con frecuencia durante el desarrollo del cáncer, varios estudios demostraron, *in vitro*, *in vivo* y en ensayos clínicos, que la inhibición de la vía STAT3 puede ser un potencial tratamiento terapéutico para contrarrestar la progresión tumoral (320,321). STAT3 es un FT que posee un rol crítico en el desarrollo y la progresión tumoral mediante la promoción de la proliferación y el crecimiento celular descontrolados, la supervivencia celular, la inducción de la angiogénesis y la supresión de la vigilancia inmune del huésped (322). La activación de STAT3 se ha demostrado en una amplia gama de tumores sólidos y cánceres hematológicos (323–326). STAT3 es un punto crítico de convergencia que se encuentra río abajo de varios RTKs hiperactivados que están mutados o amplificados en melanoma, como KIT, ERBB4, EPH, FGFR, EGFR y PDGRFA, entre otros (327). En melanoma se ha visto que STAT3 se encuentra constitutivamente activado y fosforilado (44–47) en Tyr705, un marcador de activación, y la elevada transactivación dependiente de STAT3 de sus genes blanco ha sido documentada e implicada en la progresión del melanoma (48,49). Como se mencionó y explicó en la **Introducción**, ROR1 activa la vía de STAT3 en distintos tipos de cánceres, como en mesotelioma pleural maligno y distintos tipos de leucemias (198). En este trabajo pudimos demostrar que ROR1 activa a STAT3 en melanoma aumentando su fosforilación en Tyr705. Aunque está claro que STAT3 es activado por ROR1, no está claro si STAT3 es un blanco directo o indirecto de ROR1. Se cree que dos mecanismos coexisten y permiten la activación de STAT3 en diferentes marcos de tiempo (198). Además de una regulación de STAT3 por ROR1 que puede ser o no mediada por SRC, una importante quinasa de STAT3, se ha postulado un mecanismo más indirecto a través de la vía WNT5A/ROR1/NF-κB/IL6. La regulación de SRC por ROR1 (por fosforilación en Tyr416 de SRC) ha sido descripta en células de LLC y de carcinoma de páncreas (231,232). En este trabajo se pudo demostrar que existe regulación de ROR1 sobre STAT3 vía SRC y JAK2, en melanoma, ya que se observaron cambios en la activación de STAT3 tanto al tratar con el inhibidor SKY606 como con AG490. Es decir que, ROR1 activaría a STAT3 de una forma más directa vía SRC, dado que esta activación disminuye al tratar con el inhibidor SKY606. Y, además, ROR1 activaría a STAT3 de una forma más indirecta vía JAK2, dado que esta activación disminuye al tratar con el inhibidor AG490. En esta última observación de regulación indirecta, la regulación de ROR1 vía JAK2 sería a través del circuito de retroalimentación ROR1/STAT3/IL6 (198).

Dado que STAT3 regula una gran cantidad de funciones celulares, además de apoptosis y quimioresistencia, estudiamos la vinculación de ROR1 con proteínas de la familia Bcl-2, que están más directamente relacionadas a la apoptosis y a la resistencia a terapias. Esta familia de proteínas cumple un rol crítico en melanoma. Muchas proteínas de esta familia están desreguladas en melanoma contribuyendo en forma sustancial a la marcada resistencia que el melanoma presenta frente a los tratamientos de quimioterapia y radioterapia (74). Estas estrategias, que actualmente no se utilizan (por su ineficacia y por el advenimiento de las terapias dirigidas e inmunoterapias) fueron, sin embargo, las terapias que se utilizaron durante décadas.

La apoptosis mitocondrial es regulada por un delicado balance de miembros de la familia Bcl-2 con papeles opuestos, los miembros pro-apoptóticos y anti-apoptóticos. Es por ello que el camino hacia la vida/muerte celular está determinada por la abundancia relativa de estos miembros y sus perfiles de unión (254). La subfamilia de proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas está conformada por BCL2, BCL-XL, MCL1, BCL-W, BFL1 y BCL2L10, las cuales representan un interesante blanco para la terapia del cáncer ya que su inhibición desencadenaría la función pro-apoptótica. Los BH3-miméticos, moléculas pequeñas inhibitorias de miembros de esta subfamilia, provocan que las proteínas BH3-only pro-apoptóticas no sean inhibidas por las anti-apoptóticas, promoviendo así la liberación y activación de BAX y/o BAK (253,254). Dos puntos muy importantes a tener en cuenta es que distintos BH3-miméticos pueden dirigirse a diferentes proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y que estas proteínas son funcionalmente redundantes (250–252). Por ello, cualquier intento racional de inhibir a las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 idealmente debe comenzar por comprender cuál o cuáles de ellas se expresan en un tipo de tumor y paciente determinados, además de bajo qué circunstancias. De lo contrario, estos intentos terapéuticos están condenados al fracaso, tal como ocurrió con las terapias dirigidas a BCL2 o BCL2/BCL-XL en tumores ricos en MCL1 (328–331).

En este trabajo se pudo demostrar que, en melanoma, ROR1 regula la expresión de los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, BCL2, BCL-XL, MCL-1 y BCL2L10. Similarmente, en cáncer de pulmón se han reportado en varios trabajos que ROR1 previene la apoptosis (204,234,315,319,332,333) y que regula positivamente a las proteínas anti-apoptóticas BCL2 y BCL-XL (204,332). Interesantemente, uno de los mecanismos por el cual STAT3 mejora la sobrevida de las células tumorales es aumentando la actividad anti-apoptótica, promoviendo la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 como BCL2, BCL-XL y MCL1 (334–336). Aquí se pudo observar que ROR1 puede ejercer su regulación sobre las proteínas anti-apoptóticas BCL-2, BCL-XL y BCL2L10 a través de la activación de STAT3, observación que sustenta el rol de ROR1 en supervivencia celular y quimioresistencia.

Durante los últimos 20 años, el estudio de esta subfamilia de proteínas estuvo netamente enfocado en BCL2, BCL-XL y MCL1 (246–249). Las otras tres proteínas de la subfamilia BCL-W, BFL1 y BCL2L10 han sido muy poco estudiadas, y ello despertó nuestro interés. En particular, nos focalizamos en la proteína BCL2L10 ya que es la menos estudiada de las seis y, además, nunca ha sido objeto de estudio en melanoma. La carencia de estudios

sobre el rol de BCL-W, BFL1 y BCL2L10 ha sido probablemente influenciada por algunos estudios iniciales que minimizaron la importancia de estas proteínas. A modo de ejemplo, cabe citar el trabajo de Placzek y col. que en el año 2010 utilizaron técnicas de PCR cuantitativas para evaluar los niveles de expresión del ARNm de los seis miembros de la subfamilia anti-apoptótica Bcl-2 en 69 líneas celulares tumorales, de las cuales 12 correspondían a melanoma (337). En dicho estudio la expresión de BCL2L10 fue desestimada ya que todas las líneas celulares, excepto una (68 de 69, incluidos las 12 de melanoma) presentaron niveles de BCL2L10 por debajo del nivel basal. La ausencia de la expresión de BCL2L10 en líneas celulares de leucemia, cáncer mama, próstata, colorrectal y pulmón en el estudio mencionado son difíciles de conciliar con la observación posterior de que BCL2L10 está sobreexpresado en todos estos tipos tumorales (257,259,273,274). Más aún, cuatro de las doce líneas celulares de melanoma (Mewo, SKMel28, WM35 y WM115 -datos no mostrados para SKMel28 y WM35-) se incluyeron en esta tesis doctoral y mostraron una fuerte expresión de BCL2L10, según lo evaluado mediante Western blot. Esta discrepancia refleja la inexactitud en la elaboración de perfiles de niveles de ARNm de BCL2L10 en cáncer, tal como se señaló en algunas publicaciones (259,338), la importancia del establecimiento de los niveles basales y las condiciones del entorno en que se evalúa.

Nuestro trabajo pone fin a esta situación al demostrar que BCL2L10 se expresa y cumple importantes funciones en melanoma. En el presente estudio, se ha determinado que BCL2L10 se expresa con frecuencia y en niveles elevados en melanoma. Esto se observó tanto en líneas celulares como en el 90% de los pacientes analizados. Desafortunadamente, al trabajar con una cohorte reducida de pacientes, no fue posible evaluar con certeza posibles cambios en la expresión de BCL2L10 en diferentes etapas del melanoma.

A pesar de que BCL2L10 se encuentra sobreexpresado en distintos tipos de tumores (257–259), no se había investigado hasta la fecha los mecanismos responsables de su sobreexpresión. En este trabajo se describió por primera vez un mecanismo de regulación de BCL2L10. Este estudio ha permitido determinar que BCL2L10 es regulado por STAT3 que a su vez se encuentra regulado por ROR1. Aquí, se ha probado la activación transcripcional de BCL2L10 por unión de STAT3 a su región promotora. STAT3 posee un conocido rol en la supervivencia de las células cancerosas al regular la transcripción de otros miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, como BCL2, BCL-XL y MCL1 (334–336), por lo que es muy probable que STAT3 impulse la regulación positiva de BCL2L10 en otros tipos de tumores que presenten actividad constitutiva de STAT3.

Considerando que las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 fueron y son evaluadas como probables objetivos terapéuticos en el melanoma (339), es llamativo que el papel de BCL2L10 en melanoma no haya sido estudiado hasta ahora. Se demostró que BCL2L10 promueve e inhibe la muerte celular en diferentes sistemas, se han descripto tanto actividades pro-apoptóticas, en cáncer de ovario, gástrico y carcinoma hepatocelular (260–264), como anti-apoptóticas, en cáncer de mama, pulmón y mieloma múltiple (265–268). Por lo que, dilucidar el rol de BCL2L10 en el melanoma no es una cuestión trivial. Los resultados mostrados en este trabajo indican que BCL2L10 es una proteína pro-

supervivencia que contribuye a proteger a las células de melanoma frente a distintos tipos de estrés, como por ejemplo el causado por agentes que dañan al ADN, como el cisplatino y la dacarbazina. Dicha función de BCL2L10 es similar a la de BCL2, BCL-XL y MCL1, que también se expresan abundantemente en melanoma y están implicados en la resistencia al cisplatino (340–343). Otra función de BCL2L10, probada en este trabajo por tres enfoques distintos (sobreexpresión e inhibición genética y química de BCL2L10), es que actúa como un factor importante que contribuye a la resistencia a ABT-737. Este resultado es consonante con resultados reportados previamente, que indicaron que la expresión de BCL2L10 causa resistencia a ABT-737 en las líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda J16 y MOLT-4 (344). En conjunto, estos hallazgos posicionan a BCL2L10 como un factor nuevo importante de pro-supervivencia en melanoma.

Un punto a tener en cuenta, para comprender mejor el papel del BCL2L10, es la determinación de si esta proteína tiene funciones distintivas o superpuestas con los otros cinco miembros anti-apoptóticos Bcl-2, dada la conocida redundancia funcional de sus integrantes (250–252). En el presente trabajo se demostró que la expresión de BCL2L10 inhibe la citotoxicidad inducida por ABT-737 pero no por TW-37. Esta observación sugiere que no hay superposición entre la función de MCL1 y de BCL2L10. La diferencia funcional puede ser debida, muy probablemente, a la asociación diferencial con distintas proteínas *BH3-only* pro-apoptóticas. Por ejemplo, NOXA y HRK interactúan con MCL1 y, BIK y Bim con BCL2L10. Interesantemente, en este trabajo también se pudo ver que ROR1 regula vía STAT3 a BCL2L10 pero no a MCL1. Por otra parte, BCL2L10 compartiría funciones con los blancos de ABT-737 (BCL2, BCL-XL y BCL-W). Al igual que BCL2L10, BCL-XL y BCL-W también interactúan con BIK, además de con otras *BH3-only* pro-apoptóticas. Por ello, es tentador pensar que BCL-XL y BCL-W, en lugar de BCL2 (que interactúa con BMF y BAD, pero no con BIK), son los que poseerían algunas similitudes funcionales con BCL2L10. Por lo tanto, el restringido y único perfil de unión de BCL2L10 con las proteínas *BH3-only* pro-apoptóticas (BIK y Bim) puede determinar su función biológica. Es más, a diferencia de la otras cinco proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, BCL2L10 inhibe exclusivamente la muerte celular dependiente de BAX, y no se encuentra involucrado en la apoptosis dependiente de BAK. Estas observaciones concuerdan con análisis de secuencia y filogenéticos que sugieren que BCL2L10 es el miembro anti-apoptótico Bcl-2 más divergente de la subfamilia (345). Por otro lado, al inhibir BCL2L10, ya sea por shARN o con el inhibidor ML258, se observó un aumento de la muerte celular en células tratadas con ABT-737 respecto al control (SCR para shARN y sin ML258 para el tratamiento con ML258), este resultado sugiere que BCL2L10 además posee funciones distintas a las de los blancos de ABT-737 (BCL-2, BCL-XL y BCL-W). Esta observación no contradice la conclusión anterior, donde se indicó que las funciones del BCL2L10 se superponen con las de los blancos de ABT-737, sino que agrega otra capa de complejidad a la función BCL2L10. No obstante, estos experimentos representan sólo una exploración inicial de las similitudes y diferencias de BCL2L10 con las otras cinco proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, más experimentos son necesarios para dilucidar más concretamente este aspecto.

Los mecanismos subyacentes de BCL2L10 por los cuales aumenta la supervivencia celular en melanoma no se ha investigado en este trabajo. Pero la interpretación convencional es que BCL2L10 aumentaría la supervivencia celular inhibiendo la vía apoptótica intrínseca por interacción con proteínas *BH3-only* pro-apoptóticas (255,266,268,346). También se demostró que BCL2L10 previene la apoptosis por mecanismos independientes de proteínas *BH3-only* pro-apoptóticas y mediante la unión a APAF1 (265,267,347), un componente crítico del apoptosoma implicado en el clivaje de la caspasa iniciadora procaspasa-9. Por otro lado, también se demostró que el efecto anti-apoptótico de BCL2L10 es consecuencia de la inhibición de la mitofagia (348) o la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico (273). Estudios futuros son necesarios para determinar específicamente cuáles de estos mecanismos están operando en las células de melanoma.

La activación constitutiva de la vía BRAF/MEK/ERK es una característica distintiva del melanoma. La inhibición farmacológica de esta vía mejora fuertemente la expresión o actividad de casi todas las proteínas pro-apoptóticas Bcl-2 (349). Sin embargo, el efecto inicial de los inhibidores de BRAF, por lo general, no es citotóxico sino citostático (arresto del ciclo celular en G1) ya que la acumulación de proteínas *BH3-only* pro-apoptóticas es neutralizada por la cantidad abundante de proteínas anti-apoptóticas que usualmente se expresan en las células de melanoma. Sin embargo, la inducción de proteínas *BH3-only* por la inhibición de BRAF prepara eficientemente a las células tumorales para la apoptosis, permitiéndoles inclinar la balanza hacia la muerte celular al apuntar conjuntamente a los miembros de la familia Bcl-2 que promueven la supervivencia celular (los anti-apoptóticos). De acuerdo con este modelo, se ha demostrado que ABT-737 y otros BH3-miméticos se combinan sinérgicamente con inhibidores de MAPK (como vemurafenib, también llamado PLX-4032) en la destrucción de las células de melanoma con BRAF mutado (350–352). Por ello, esta combinación se ha usado en ensayos clínicos en pacientes con melanoma (ABT-263 más dabrafenib y trametinib, ensayo clínico NCT01989585) (353) con el fin de retrasar la aparición de resistencia a inhibidores de BRAF. Este fenómeno de “preparación” para la apoptosis por parte de los inhibidores de BRAF también puede mejorar la citotoxicidad provocada por la quimioterapia convencional (354–357). En este trabajo se ha evaluado el papel de BCL2L10 en los dos escenarios terapéuticos posibles (PLX-4032 + Cisplatino y PLX-4032 + ABT-737, **Fig. 59**), donde se demostró que BCL2L10 puede prevenir la muerte celular tanto por cisplatino como por ABT-737, en presencia de PLX-4032. Cabe destacar que el rol protectivo de BCL2L10 fue mucho más pronunciado al combinar los tratamientos con PLX-4032 (comparación de **Fig. 59** con **Fig. 54A** para cisplatino y con **Fig. 57A** para ABT-737). Esta diferencia puede deberse a la regulación positiva de BIK, una de las pocas proteínas *BH3-only* pro-apoptóticas que interactúa con BCL2L10, después de la inhibición de la vía ERK (debida a la inhibición de BRAF) (358,359). De ser cierta esta hipótesis, podría indicar que la inhibición de BCL2L10 puede incorporarse como una forma adicional con el fin de mejorar la eficacia clínica de los tratamientos donde se utilice inhibidores de BRAF.

En esta Tesis Doctoral se estudió fundamentalmente a las proteínas ROR1 y BCL2L10. En ambos casos se estableció que estas proteínas se encuentran muy frecuentemente

expresadas en niveles elevados en pacientes de melanoma. También se ha caracterizado sus funciones en melanoma, que en ambos casos son favorables a un mayor desarrollo y progresión de la enfermedad.

En el caso de ROR1 se determinó su rol como inhibidor de la apoptosis y mediante el análisis bioinformático se describió una nueva función relacionada a la inhibición de la respuesta inmune y se amplió nuestra comprensión de su participación en la promoción de la TEM y la migración celular. El análisis de firmas génicas asociadas a ROR1, ROR2, RYK y PTK7 permite concluir que las funciones a las cuales se relaciona ROR1 se asemejan fuertemente a las funciones atribuidas a WNT5A. Por ello, si bien no resulta adecuado hablar de cuál de los receptores es más importante, sí puede afirmarse que WNT5A presenta una fuerte asociación funcional con ROR1, mayor que la observada con los otros receptores, una conclusión que no había sido establecida hasta el presente.

Por otra parte, este trabajo describe por primera vez el rol de la proteína BCL2L10 mediando la supervivencia de melanoma frente a compuestos citotóxicos. Dada la profundidad del análisis realizado, estos resultados realizan un aporte de gran importancia para comprender el rol de esta proteína en cáncer, ya que ha sido muy poco estudiada hasta el presente.

Interesantemente, las dos proteínas estudiadas en esta Tesis Doctoral, se encuentran interconectadas por el factor de transcripción STAT3 que es activado por ROR1 y promueve la transcripción de BCL2L10. De esta forma, se ha caracterizado una nueva vía de señalización: ROR1/STAT3/BCL2L10 que cumple un rol altamente relevante en la inhibición de la apoptosis y la quimioresistencia de melanoma.

En resumen, dada la expresión aberrante de ROR1 y BCL2L10 en melanoma y sus funciones asociadas a la progresión y supervivencia tumoral, ambas proteínas representan dos nuevos y atractivos blancos terapéuticos en melanoma.

Bibliografía

7. Bibliografía

1. Kierszenbaum AL. Histology and Cell Biology, 2nd Edition. 2006.

2. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. Physiol Rev. octubre de 2004;84(4):1155-228.

3. Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM. Toward a Molecular Classification of Melanoma. J Clin Oncol. 20 de abril de 2007;25(12):1606-20.

4. Girotti MR, Saturno G, Lorigan P, Marais R. No longer an untreatable disease: How targeted and immunotherapies have changed the management of melanoma patients. Mol Oncol. septiembre de 2014;8(6):1140-58.

5. Loria D, Abriata G, Santoro F, Latorre C. Cutaneous melanoma in Argentina: an analysis of its characteristics and regional differences. ecancermedicalscience [Internet]. 5 de marzo de 2020 [citado 25 de junio de 2024];14. Disponible en: https://ecancer.org/en/journal/article/1017-cutaneous-melanoma-in-argentina-an-analysis-of-its-characteristics-and-regional-differences

6. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. CA Cancer J Clin. enero de 2014;64(1):9-29.

7. Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. N Engl J Med. 6 de julio de 2006;355(1):51-65.

8. Palmieri G, Capone M, Ascierto ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, et al. Main roads to melanoma. J Transl Med. diciembre de 2009;7(1):86.

9. Clark WH, Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. Hum Pathol. diciembre de 1984;15(12):1147-65.

10. Bennett DC. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? Pigment Cell Melanoma Res. febrero de 2008;21(1):27-38.

11. Haass NK, Smalley KSM, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. Pigment Cell Res. junio de 2005;18(3):150-9.

12. Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, et al. Improving Melanoma Classification by Integrating Genetic and Morphologic Features. Rees J, editor. PLoS Med. 3 de junio de 2008;5(6):e120.

13. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. N Engl J Med. 12 de noviembre de 2015;373(20):1926-36.

14. Xu W, McArthur G. Cell Cycle Regulation and Melanoma. Curr Oncol Rep. junio de 2016;18(6):34.

15. Lopez-Bergami P, Fitchman B, Ronai Z. Understanding Signaling Cascades in Melanoma †. Photochem Photobiol. marzo de 2008;84(2):289-306.

16. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. junio de 2002;417(6892):949-54.

17. Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 de diciembre de 2003;9(17):6483-8.

18. Satyamoorthy K, Li G, Gerrero MR, Brose MS, Volpe P, Weber BL, et al. Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. Cancer Res. 15 de febrero de 2003;63(4):756-9.

19. Gray-Schopfer VC, Dias SDR, Marais R. The role of B-RAF in melanoma. Cancer Metastasis Rev. enero de 2005;24(1):165-83.

20. Meier F. The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. Front Biosci. 2005;10(1-3):2986.

21. Flores JF, Walker GJ, Glendening JM, Haluska FG, Castresana JS, Rubio MP, et al. Loss of the p16INK4a and p15INK4b genes, as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma. Cancer Res. 1 de noviembre de 1996;56(21):5023-32.

22. Gray-Schopfer VC, Cheong SC, Chong H, Chow J, Moss T, Abdel-Malek ZA, et al. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? Br J Cancer. agosto de 2006;95(4):496-505.

23. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. N Engl J Med. 17 de noviembre de 2005;353(20):2135-47.

24. Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, et al. Deregulated Akt3 Activity Promotes Development of Malignant Melanoma. Cancer Res. 1 de octubre de 2004;64(19):7002-10.

25. Hoxhaj G, Manning BD. The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. Nat Rev Cancer. febrero de 2020;20(2):74-88.

26. Kandel ES, Hay N. The Regulation and Activities of the Multifunctional Serine/Threonine Kinase Akt/PKB. Exp Cell Res. noviembre de 1999;253(1):210-29.

27. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer. 1 de julio de 2002;2(7):489-501.

28. Mirmohammadsadegh A, Marini A, Nambiar S, Hassan M, Tannapfel A, Ruzicka T, et al. Epigenetic Silencing of the *PTEN* Gene in Melanoma. Cancer Res. 1 de julio de 2006;66(13):6546-52.

29. Vidwans SJ, Flaherty KT, Fisher DE, Tenenbaum JM, Travers MD, Shrager J. A Melanoma Molecular Disease Model. Ravasi T, editor. PLoS ONE. 30 de marzo de 2011;6(3):e18257.

30. Omholt K, Kröckel D, Ringborg U, Hansson J. Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. Melanoma Res. abril de 2006;16(2):197-200.

31. Carnero A, Paramio JM. The PTEN/PI3K/AKT Pathway in vivo, Cancer Mouse Models. Front Oncol [Internet]. 23 de septiembre de 2014 [citado 25 de junio de 2024];4. Disponible en: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2014.00252/abstract

32. Easty DJ, Gray SG, O'Byrne KJ, O'Donnell D, Bennett DC. Receptor tyrosine kinases and their activation in melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. junio de 2011;24(3):446-61.

33. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, et al. A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. Cell. julio de 2012;150(2):251-63.

34. Lopez-Bergami P, Ronai Z. Requirements for PKC-augmented JNK activation by MKK4/7. Int J Biochem Cell Biol. enero de 2008;40(5):1055-64.

35. Paluncic J, Kovacevic Z, Jansson PJ, Kalinowski D, Merlot AM, Huang MLH, et al. Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res. abril de 2016;1863(4):770-84.

36. Yang N, Lopez-Bergami P, Goydos JS, Yip D, Walker AM, Pasquale EB, et al. The EphB4 receptor promotes the growth of melanoma cells expressing the ephrin-B2 ligand. Pigment Cell Melanoma Res. octubre de 2010;23(5):684-7.

37. Horvath CM. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. Trends Biochem Sci. octubre de 2000;25(10):496-502.

38. Fathi N, Rashidi G, Khodadadi A, Shahi S, Sharifi S. STAT3 and apoptosis challenges in cancer. Int J Biol Macromol. octubre de 2018;117:993-1001.

39. Kortylewski M, Yu H. Role of Stat3 in suppressing anti-tumor immunity. Curr Opin Immunol. abril de 2008;20(2):228-33.

40. Kim E, Kim M, Woo DH, Shin Y, Shin J, Chang N, et al. Phosphorylation of EZH2 Activates STAT3 Signaling via STAT3 Methylation and Promotes Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells. Cancer Cell. junio de 2013;23(6):839-52.

41. Herrmann A, Kortylewski M, Kujawski M, Zhang C, Reckamp K, Armstrong B, et al. Targeting Stat3 in the Myeloid Compartment Drastically Improves the *In vivo* Antitumor

Functions of Adoptively Transferred T Cells. Cancer Res. 1 de octubre de 2010;70(19):7455-64.

42. Yang CL, Liu YY, Ma YG, Xue YX, Liu DG, Ren Y, et al. Curcumin Blocks Small Cell Lung Cancer Cells Migration, Invasion, Angiogenesis, Cell Cycle and Neoplasia through Janus Kinase-STAT3 Signalling Pathway. Singh RP, editor. PLoS ONE. 25 de mayo de 2012;7(5):e37960.

43. Baek SH, Ko JH, Lee H, Jung J, Kong M, Lee J woo, et al. Resveratrol inhibits STAT3 signaling pathway through the induction of SOCS-1: Role in apoptosis induction and radiosensitization in head and neck tumor cells. Phytomedicine. mayo de 2016;23(5):566-77.

44. Kortylewski M, Jove R, Yu H. Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts. Cancer Metastasis Rev. junio de 2005;24(2):315-27.

45. Sakaguchi M, Oka M, Iwasaki T, Fukami Y, Nishigori C. Role and Regulation of STAT3 Phosphorylation at Ser727 in Melanocytes and Melanoma Cells. J Invest Dermatol. julio de 2012;132(7):1877-85.

46. Niu G, Bowman T, Huang M, Shivers S, Reintgen D, Daud A, et al. Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. Oncogene. 10 de octubre de 2002;21(46):7001-10.

47. Xie T xin, Huang FJ, Aldape KD, Kang SH, Liu M, Gershenwald JE, et al. Activation of Stat3 in Human Melanoma Promotes Brain Metastasis. Cancer Res. 15 de marzo de 2006;66(6):3188-96.

48. Messina JL, Yu H, Riker AI, Munster PN, Jove RL, Daud AI. Activated Stat-3 in Melanoma. Cancer Control. julio de 2008;15(3):196-201.

49. Lee I, Fox PS, Ferguson SD, Bassett R, Kong LY, Schacherer CW, et al. The Expression of p-STAT3 in Stage IV Melanoma: Risk of CNS Metastasis and Survival. Oncotarget. 31 de marzo de 2012;3(3):336-44.

50. Liu F, Cao J, Wu J, Sullivan K, Shen J, Ryu B, et al. Stat3-Targeted Therapies Overcome the Acquired Resistance to Vemurafenib in Melanomas. J Invest Dermatol. agosto de 2013;133(8):2041-9.

51. Girotti MR, Pedersen M, Sanchez-Laorden B, Viros A, Turajlic S, Niculescu-Duvaz D, et al. Inhibiting EGF Receptor or SRC Family Kinase Signaling Overcomes BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. Cancer Discov. 1 de febrero de 2013;3(2):158-67.

52. Vultur A, Villanueva J, Krepler C, Rajan G, Chen Q, Xiao M, et al. MEK inhibition affects STAT3 signaling and invasion in human melanoma cell lines. Oncogene. 3 de abril de 2014;33(14):1850-61.

53. Sos ML, Levin RS, Gordan JD, Oses-Prieto JA, Webber JT, Salt M, et al. Oncogene Mimicry as a Mechanism of Primary Resistance to BRAF Inhibitors. Cell Rep. agosto de 2014;8(4):1037-48.

54. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. J Cell Sci. 15 de marzo de 2004;117(8):1281-3.

55. O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine Signaling in 2002. Cell. abril de 2002;109(2):S121-31.

56. Ihle JN, Kerr IM. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. Trends Genet. febrero de 1995;11(2):69-74.

57. Hebenstreit D, Horejs-Hoeck J, Duschl A. JAK/STAT-Dependent Gene Regulation by Cytokines. Drug News Perspect. 2005;18(4):243.

58. Jatiani SS, Baker SJ, Silverman LR, Reddy EP. JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies. Genes Cancer. 1 de octubre de 2010;1(10):979-93.

59. Yadav A, Kalita A, Dhillon S, Banerjee K. JAK/STAT3 Pathway Is Involved in Survival of Neurons in Response to Insulin-like Growth Factor and Negatively Regulated by Suppressor of Cytokine Signaling-3. J Biol Chem. septiembre de 2005;280(36):31830-40.

60. Darnell JE, Kerr LM, Stark GR. Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. Science. 3 de junio de 1994;264(5164):1415-21.

61. Vogel TP, Milner JD, Cooper MA. The Ying and Yang of STAT3 in Human Disease. J Clin Immunol. octubre de 2015;35(7):615-23.

62. Kim LC, Song L, Haura EB. Src kinases as therapeutic targets for cancer. Nat Rev Clin Oncol. octubre de 2009;6(10):587-95.

63. Buettner R, Mesa T, Vultur A, Lee F, Jove R. Inhibition of Src Family Kinases with Dasatinib Blocks Migration and Invasion of Human Melanoma Cells. Mol Cancer Res. 1 de noviembre de 2008;6(11):1766-74.

64. Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. Cancer Res. marzo de 1969;29(3):705-27.

65. Heenan PJ. Nodular melanoma is not a distinct entity. Arch Dermatol. marzo de 2003;139(3):387; author reply 387-388.

66. McGovern VJ, Mihm MC, Bailly C, Booth JC, Clark WH, Cochran AJ, et al. The classification of malignant melanoma and its histologic reporting. Cancer. diciembre de 1973;32(6):1446-57.

67. Porras BH, Cockerell CJ. Cutaneous malignant melanoma: Classification and clinical diagnosis. Semin Cutan Med Surg. junio de 1997;16(2):88-96.

68. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S jaw, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. J Clin Oncol. 20 de diciembre de 2009;27(36):6199-206.

69. Weyers W, Euler M, Diaz-Cascajo C, Schill WB, Bonczkowitz M. Classification of cutaneous malignant melanoma: A reassessment of histopathologic criteria for the distinction of different types. Cancer. 15 de julio de 1999;86(2):288-99.

70. Ackerman AB, David KM. A unifying concept of malignant melanoma: Biologic aspects. Hum Pathol. mayo de 1986;17(5):438-40.

71. Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, et al. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. Cancer. 15 de marzo de 2000;88(6):1484-91.

72. Luke JJ, Schwartz GK. Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. Clin Dermatol. mayo de 2013;31(3):290-7.

73. Lee C, Thomas CM, Ng KE. An Overview of the Changing Landscape of Treatment for Advanced Melanoma. Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther. marzo de 2017;37(3):319-33.

74. Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. Oncogene. 19 de mayo de 2003;22(20):3138-51.

75. Singh B, Salama A. Updates in Therapy for Advanced Melanoma. Cancers. 15 de enero de 2016;8(1):17.

76. Munhoz RR, Postow MA. Combinatorial Approaches to the Treatment of Advanced Melanoma. Hematol Oncol Clin North Am. febrero de 2021;35(1):145-58.

77. Giunta EF, De Falco V, Napolitano S, Argenziano G, Brancaccio G, Moscarella E, et al. Optimal treatment strategy for metastatic melanoma patients harboring *BRAF-V600* mutations. Ther Adv Med Oncol. enero de 2020;12:175883592092521.

78. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. N Engl J Med. 30 de junio de 2011;364(26):2507-16.

79. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, et al. Survival in BRAF V600–Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. N Engl J Med. 23 de febrero de 2012;366(8):707-14.

80. Kudchadkar RR, Gonzalez R, Lewis K. New Targeted Therapies in Melanoma. Cancer Control. octubre de 2013;20(4):282-8.

81. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. N Engl J Med. 26 de agosto de 2010;363(9):809-19.

82. Hauschild A, Grobb J, Demidov L, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. An Update on Overall Survival (Os) and Follow-On Therapies in Break-3, a Phase Iii, Randomized Trial: Dabrafenib (D) Vs. Dacarbazine (Dtic) in Patients (Pts) with Braf V600E Mutation-Positive Metastatic Melanoma (Mm). Ann Oncol. septiembre de 2014;25:iv378.

83. Ugurel S, Röhmel J, Ascierto PA, Flaherty KT, Grob JJ, Hauschild A, et al. Survival of patients with advanced metastatic melanoma: the impact of novel therapies–update 2017. Eur J Cancer. septiembre de 2017;83:247-57.

84. Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM, et al. The Genetic Landscape of Clinical Resistance to RAF Inhibition in Metastatic Melanoma. Cancer Discov. 1 de enero de 2014;4(1):94-109.

85. Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). Nature. 15 de diciembre de 2011;480(7377):387-90.

86. Shi H, Moriceau G, Kong X, Lee MK, Lee H, Koya RC, et al. Melanoma whole-exome sequencing identifies V600EB-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. Nat Commun. 6 de marzo de 2012;3(1):724.

87. Johnson DB, Childress MA, Chalmers ZR, Frampton GM, Ali SM, Rubinstein SM, et al. BRAF internal deletions and resistance to BRAF / MEK inhibitor therapy. Pigment Cell Melanoma Res. mayo de 2018;31(3):432-6.

88. Ostrowski SM, Fisher DE. Biology of Melanoma. Hematol Oncol Clin North Am. febrero de 2021;35(1):29-56.

89. Fainboim L. Introducción a la inmunología humana. 6a edición. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2012.

90. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. marzo de 2011;144(5):646-74.

91. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. Science. 6 de octubre de 2006;314(5796):126-9.

92. O'Day SJ, Hamid O, Urba WJ. Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4): A novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies. Cancer. 15 de diciembre de 2007;110(12):2614-27.

93. Liu D, Schilling B, Liu D, Sucker A, Livingstone E, Jerby-Arnon L, et al. Integrative molecular and clinical modeling of clinical outcomes to PD1 blockade in patients with metastatic melanoma. Nat Med. diciembre de 2019;25(12):1916-27.

94. Eggermont AMM, Blank CU, Mandala M, Long GV, Atkinson V, Dalle S, et al. Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. N Engl J Med. 10 de mayo de 2018;378(19):1789-801.

95. Schoenfeld AJ, Hellmann MD. Acquired Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors. Cancer Cell. abril de 2020;37(4):443-55.

96. Wend P, Holland JD, Ziebold U, Birchmeier W. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. Semin Cell Dev Biol. octubre de 2010;21(8):855-63.

97. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. Genes Dev. 15 de diciembre de 1997;11(24):3286-305.

98. Sharma R. Wingless a new mutant in Drosophila melanogaster. Inf Serv. 1973;50, 134.

99. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. Cell. agosto de 1987;50(4):649-57.

100. Cabrera CV, Alonso MC, Johnston P, Phillips RG, Lawrence PA. Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene. Cell. agosto de 1987;50(4):659-63.

101. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, et al. A new nomenclature for int-1 and related genes: The Wnt gene family. Cell. enero de 1991;64(2):231.

102. Welters HJ, Kulkarni RN. Wnt signaling: relevance to β-cell biology and diabetes. Trends Endocrinol Metab. diciembre de 2008;19(10):349-55.

103. Inestrosa NC, Varela-Nallar L. Wnt signaling in the nervous system and in Alzheimer's disease. J Mol Cell Biol. 1 de febrero de 2014;6(1):64-74.

104. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/β-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. Dev Cell. julio de 2009;17(1):9-26.

105. Clevers H, Nusse R. Wnt/β-Catenin Signaling and Disease. Cell. junio de 2012;149(6):1192-205.

106. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. Nat Rev Cancer. enero de 2013;13(1):11-26.

107. Morin PJ, Weeraratna AT. Wnt Signaling in Human Cancer. En: Frank DA, editor. Signal Transduction in Cancer [Internet]. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2004 [citado 3

de julio de 2024]. p. 169-87. (Cancer Treatment and Research; vol. 115). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/0-306-48158-8_7

108. Smolich BD, McMahon JA, McMahon AP, Papkoff J. Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface. Mol Biol Cell. diciembre de 1993;4(12):1267-75.

109. Kurayoshi M, Yamamoto H, Izumi S, Kikuchi A. Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling. Biochem J. 15 de marzo de 2007;402(3):515-23.

110. Rao TP, Kühl M. An Updated Overview on Wnt Signaling Pathways: A Prelude for More. Circ Res. 25 de junio de 2010;106(12):1798-806.

111. Endo M, Nishita M, Fujii M, Minami Y. Insight into the Role of Wnt5a-Induced Signaling in Normal and Cancer Cells. En: International Review of Cell and Molecular Biology [Internet]. Elsevier; 2015 [citado 3 de julio de 2024]. p. 117-48. Disponible en: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1937644814000069

112. McDonald SL, Silver A. The opposing roles of Wnt-5a in cancer. Br J Cancer. julio de 2009;101(2):209-14.

113. Dejmek J, Dejmek A, Säfholm A, Sjölander A, Andersson T. Wnt-5a Protein Expression in Primary Dukes B Colon Cancers Identifies a Subgroup of Patients with Good Prognosis. Cancer Res. 15 de octubre de 2005;65(20):9142-6.

114. Jönsson M, Dejmek J, Bendahl PO, Andersson T. Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas. Cancer Res. 15 de enero de 2002;62(2):409-16.

115. Blanc E, Roux GL, Bénard J, Raguénez G. Low expression of Wnt-5a gene is associated with high-risk neuroblastoma. Oncogene. 10 de febrero de 2005;24(7):1277-83.

116. Kremenevskaja N, Von Wasielewski R, Rao AS, Schöfl C, Andersson T, Brabant G. Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. Oncogene. 24 de marzo de 2005;24(13):2144-54.

117. Da Forno PD, Pringle JH, Hutchinson P, Osborn J, Huang Q, Potter L, et al. WNT5A Expression Increases during Melanoma Progression and Correlates with Outcome. Clin Cancer Res. 15 de septiembre de 2008;14(18):5825-32.

118. Fernandez-Cobo M, Zammarchi F, Mandeli J, Holland JF, Pogo BGT. Expression of Wnt5A and Wnt10B in non-immortalized breast cancer cells. Oncol Rep. abril de 2007;17(4):903-7.

119. Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, et al. Expression of Wnt-5a Is Correlated with Aggressiveness of Gastric Cancer by Stimulating Cell Migration and Invasion. Cancer Res. 1 de noviembre de 2006;66(21):10439-48.

120. Ripka S, Konig A, Buchholz M, Wagner M, Sipos B, Kloppel G, et al. WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. Carcinogenesis. 18 de enero de 2007;28(6):1178-87.

121. Yamamoto H, Oue N, Sato A, Hasegawa Y, Yamamoto H, Matsubara A, et al. Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. Oncogene. 8 de abril de 2010;29(14):2036-46.

122. Iozzo RV, Eichstetter I, Danielson KG. Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy. Cancer Res. 15 de agosto de 1995;55(16):3495-9.

123. Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. Nature. 3 de agosto de 2000;406(6795):536-40.

124. Ekström EJ, Bergenfelz C, Von Bülow V, Serifler F, Carlemalm E, Jönsson G, et al. WNT5A induces release of exosomes containing pro-angiogenic and immunosuppressive factors from malignant melanoma cells. Mol Cancer. diciembre de 2014;13(1):88.

125. Linnskog R, Mohapatra P, Moradi F, Prasad CP, Andersson T. Demonstration of a WNT5A-IL-6 positive feedback loop in melanoma cells: Dual interference of this loop more effectively impairs melanoma cell invasion. Oncotarget. 21 de junio de 2016;7(25):37790-802.

126. Dissanayake SK, Olkhanud PB, O'Connell MP, Carter A, French AD, Camilli TC, et al. Wnt5A Regulates Expression of Tumor-Associated Antigens in Melanoma via Changes in Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Phosphorylation. Cancer Res. 15 de diciembre de 2008;68(24):10205-14.

127. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. Cell. marzo de 2016;165(1):35-44.

128. Anastas JN, Kulikauskas RM, Tamir T, Rizos H, Long GV, Von Euw EM, et al. WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors. J Clin Invest. 1 de julio de 2014;124(7):2877-90.

129. Morgan R, Ankrah R, El-Tanani S, Loadman PM, Pattterson L, Rudland PS, et al. Wnt Signaling as a Therapeutic Target in Cancer and Metastasis. En: Introduction to Cancer Metastasis [Internet]. Elsevier; 2017 [citado 15 de julio de 2024]. p. 375-94. Disponible en: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128040034000207

130. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, et al. A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. Nature. julio de 1996;382(6588):225-30.

131. Slusarski DC, Corces VG, Moon RT. Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. Nature. noviembre de 1997;390(6658):410-3.

132. Wang H yu, Liu T, Malbon CC. Structure-function analysis of Frizzleds. Cell Signal. julio de 2006;18(7):934-41.

133. Xu YK, Nusse R. The Frizzled CRD domain is conserved in diverse proteins including several receptor tyrosine kinases. Curr Biol. junio de 1998;8(12):R405-6.

134. Huang HC, Klein PS. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. Genome Biol. 2004;5(7):234.

135. Weeraratna AT. A Wnt-er Wonderland—The complexity of Wnt signaling in melanoma. Cancer Metastasis Rev. junio de 2005;24(2):237-50.

136. Bilić J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, et al. Wnt Induces LRP6 Signalosomes and Promotes Dishevelled-Dependent LRP6 Phosphorylation. Science. 15 de junio de 2007;316(5831):1619-22.

137. Cong F, Schweizer L, Varmus H. Wnt signals across the plasma membrane to activate the β-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. Development. 15 de octubre de 2004;131(20):5103-15.

138. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. Nature. septiembre de 2000;407(6803):530-5.

139. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. Cell. junio de 2010;141(7):1117-34.

140. Berger H, Wodarz A, Borchers A. PTK7 Faces the Wnt in Development and Disease. Front Cell Dev Biol [Internet]. 5 de abril de 2017 [citado 8 de julio de 2024];5. Disponible en: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2017.00031/full

141. Masiakowski P, Carroll RD. A novel family of cell surface receptors with tyrosine kinase-like domain. J Biol Chem. 25 de diciembre de 1992;267(36):26181-90.

142. Masiakowski P, Yancopoulos GD. The Wnt receptor CRD domain is also found in MuSK and related orphan receptor tyrosine kinases. Curr Biol. junio de 1998;8(12):R407.

143. Yu J, Chen L, Cui B, Widhopf GF, Shen Z, Wu R, et al. Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation. J Clin Invest. febrero de 2016;126(2):585-98.

144. Gentile A, Lazzari L, Benvenuti S, Trusolino L, Comoglio PM. The ROR1 pseudokinase diversifies signaling outputs in MET-addicted cancer cells. Int J Cancer. 15 de noviembre de 2014;135(10):2305-16.

145. Bicocca VT, Chang BH, Masouleh BK, Muschen M, Loriaux MM, Druker BJ, et al. Crosstalk between ROR1 and the Pre-B Cell Receptor Promotes Survival of t(1;19) Acute Lymphoblastic Leukemia. Cancer Cell. noviembre de 2012;22(5):656-67.

146. Bainbridge TW, DeAlmeida VI, Izrael-Tomasevic A, Chalouni C, Pan B, Goldsmith J, et al. Evolutionary Divergence in the Catalytic Activity of the CAM-1, ROR1 and ROR2 Kinase Domains. Kannan N, editor. PLoS ONE. 16 de julio de 2014;9(7):e102695.

147. Forrester WC. The Ror receptor tyrosine kinase family. Cell Mol Life Sci CMLS. 1 de enero de 2002;59(1):83-96.

148. Stacker SA, Hovens CM, Vitali A, Pritchard MA, Baker E, Sutherland GR, et al. Molecular cloning and chromosomal localisation of the human homologue of a receptor related to tyrosine kinases (RYK). Oncogene. mayo de 1993;8(5):1347-56.

149. Patthy L. The WIF module. Trends Biochem Sci. 1 de enero de 2000;25(1):12-3.

150. Yoshikawa S, McKinnon RD, Kokel M, Thomas JB. Wnt-mediated axon guidance via the Drosophila Derailed receptor. Nature. abril de 2003;422(6932):583-8.

151. Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, et al. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activites. Nature. abril de 1999;398(6726):431-6.

152. Hovens CM, Stacker SA, Andres AC, Harpur AG, Ziemiecki A, Wilks AF. RYK, a receptor tyrosine kinase-related molecule with unusual kinase domain motifs. Proc Natl Acad Sci. 15 de diciembre de 1992;89(24):11818-22.

153. Simoneaux DK, Fletcher FA, Jurecic R, Shilling HG, Van NT, Patel P, et al. The receptor tyrosine kinase-related gene (ryk) demonstrates lineage and stage-specific expression in hematopoietic cells. J Immunol Baltim Md 1950. 1 de febrero de 1995;154(3):1157-66.

154. Murphy JM, Zhang Q, Young SN, Reese ML, Bailey FP, Eyers PA, et al. A robust methodology to subclassify pseudokinases based on their nucleotide-binding properties. Biochem J. 15 de enero de 2014;457(2):323-34.

155. Katso RM, Russell RB, Ganesan TS. Functional Analysis of H-Ryk, an Atypical Member of the Receptor Tyrosine Kinase Family. Mol Cell Biol. 1 de septiembre de 1999;19(9):6427-40.

156. Lee ST, Strunk KM, Spritz RA. A survey of protein tyrosine kinase mRNAs expressed in normal human melanocytes. Oncogene. diciembre de 1993;8(12):3403-10.

157. Mossie K, Jallal B, Alves F, Sures I, Plowman GD, Ullrich A. Colon carcinoma kinase-4 defines a new subclass of the receptor tyrosine kinase family. Oncogene. 16 de noviembre de 1995;11(10):2179-84.

158. Jung JW, Ji AR, Lee J, Kim UJ, Lee ST. Organization of the human PTK7 gene encoding a receptor protein tyrosine kinase-like molecule and alternative splicing of its mRNA. Biochim Biophys Acta BBA - Gene Struct Expr. diciembre de 2002;1579(2-3):153-63.

159. Martinez S, Scerbo P, Giordano M, Daulat AM, Lhoumeau AC, Thomé V, et al. The PTK7 and ROR2 Protein Receptors Interact in the Vertebrate WNT/Planar Cell Polarity (PCP) Pathway. J Biol Chem. diciembre de 2015;290(51):30562-72.

160. Miller MA, Steele RE. Lemon Encodes an Unusual Receptor Protein-Tyrosine Kinase Expressed during Gametogenesis in Hydra. Dev Biol. agosto de 2000;224(2):286-98.

161. Kroiher M, Miller MA, Steele RE. Deceiving appearances: signaling by “dead” and “fractured” receptor protein-tyrosine kinases. BioEssays. 21 de diciembre de 2000;23(1):69-76.

162. Shnitsar I, Borchers A. PTK7 recruits dsh to regulate neural crest migration. Development. 15 de diciembre de 2008;135(24):4015-24.

163. Puppo F, Thomé V, Lhoumeau A, Cibois M, Gangar A, Lembo F, et al. Protein tyrosine kinase 7 has a conserved role in Wnt/β-catenin canonical signalling. EMBO Rep. enero de 2011;12(1):43-9.

164. Andreeva A, Lee J, Lohia M, Wu X, Macara IG, Lu X. PTK7-Src Signaling at Epithelial Cell Contacts Mediates Spatial Organization of Actomyosin and Planar Cell Polarity. Dev Cell. abril de 2014;29(1):20-33.

165. Asem M, Buechler S, Wates R, Miller D, Stack M. Wnt5a Signaling in Cancer. Cancers. 26 de agosto de 2016;8(9):79.

166. Menck K, Heinrichs S, Baden C, Bleckmann A. The WNT/ROR Pathway in Cancer: From Signaling to Therapeutic Intervention. Cells. 12 de enero de 2021;10(1):142.

167. Castro MV, Lopez-Bergami P. Cellular and molecular mechanisms implicated in the dual role of ROR2 in cancer. Crit Rev Oncol Hematol. febrero de 2022;170:103595.

168. Kafka A, Bašić-Kinda S, Pećina-Šlaus N. The cellular story of dishevelleds. Croat Med J. octubre de 2014;55(5):459-46667.

169. Boutros M, Paricio N, Strutt DI, Mlodzik M. Dishevelled Activates JNK and Discriminates between JNK Pathways in Planar Polarity and wingless Signaling. Cell. julio de 1998;94(1):109-18.

170. Wharton KA. Runnin’ with the Dvl: Proteins That Associate with Dsh/Dvl and Their Significance to Wnt Signal Transduction. Dev Biol. enero de 2003;253(1):1-17.

171. Bullions LC, Levine AJ. The role of beta-catenin in cell adhesion, signal transduction, and cancer: Curr Opin Oncol. enero de 1998;10(1):81-7.

172. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. New Insights into the Mechanism of Wnt Signaling Pathway Activation. En: International Review of Cell and Molecular Biology [Internet]. Elsevier; 2011 [citado 14 de julio de 2024]. p. 21-71. Disponible en: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123860354000021

173. Morin PJ. β-catenin signaling and cancer. BioEssays. 1 de diciembre de 1999;21(12):1021-30.

174. Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of β-Catenin Adhesion and Signaling Functions. Physiology. octubre de 2007;22(5):303-9.

175. Malbon CC, Wang H yu, Moon RT. Wnt Signaling and Heterotrimeric G-Proteins: Strange Bedfellows or a Classic Romance? Biochem Biophys Res Commun. septiembre de 2001;287(3):589-93.

176. Peters JM, McKay RM, McKay JP, Graff JM. Casein kinase I transduces Wnt signals. Nature. septiembre de 1999;401(6751):345-50.

177. Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R. Nuclear localization of β-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. Mech Dev. septiembre de 1996;59(1):3-10.

178. Itoh K, Antipova A, Ratcliffe MJ, Sokol S. Interaction of Dishevelled and *Xenopus* Axin-Related Protein Is Required for Wnt Signal Transduction. Mol Cell Biol. 1 de marzo de 2000;20(6):2228-38.

179. Behrens J, Von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, et al. Functional interaction of β-catenin with the transcription factor LEF-1. Nature. agosto de 1996;382(6592):638-42.

180. Tetsu O, McCormick F. β-Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. Nature. abril de 1999;398(6726):422-6.

181. Van De Wetering M, Sancho E, Verweij C, De Lau W, Oving I, Hurlstone A, et al. The B-Catenin/Tcf-4 Complex Imposes a Crypt Progenitor Phenotype on Colorectal Cancer Cells. Cell. octubre de 2002;111(2):241-50.

182. Jenny A, Mlodzik M. Planar cell polarity signaling: a common mechanism for cellular polarization. Mt Sinai J Med N Y. septiembre de 2006;73(5):738-50.

183. Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: β-Catenin-independent pathways. Cell Calcium. septiembre de 2005;38(3-4):439-46.

184. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A Second Canon. Dev Cell. septiembre de 2003;5(3):367-77.

185. Zallen JA. Planar Polarity and Tissue Morphogenesis. Cell. junio de 2007;129(6):1051-63.

186. Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. The Wnt/Ca2+ pathway. Trends Genet. julio de 2000;16(7):279-83.

187. Jessen JR. Noncanonical Wnt Signaling in Tumor Progression and Metastasis. Zebrafish. marzo de 2009;6(1):21-8.

188. De A. Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. Acta Biochim Biophys Sin. 1 de octubre de 2011;43(10):745-56.

189. Semenov MV, Habas R, MacDonald BT, He X. SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. Cell. diciembre de 2007;131(7):1378.e1-1378.e2.

190. Reddy UR, Phatak S, Pleasure D. Human neural tissues express a truncated Ror1 receptor tyrosine kinase, lacking both extracellular and transmembrane domains. Oncogene. 3 de octubre de 1996;13(7):1555-9.

191. Tseng HC, Lyu PC, Lin W chang. Nuclear localization of orphan receptor protein kinase (Ror1) is mediated through the juxtamembrane domain. BMC Cell Biol. diciembre de 2010;11(1):48.

192. Zhang S, Chen L, Wang-Rodriguez J, Zhang L, Cui B, Frankel W, et al. The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers. Am J Pathol. diciembre de 2012;181(6):1903-10.

193. Balakrishnan A, Goodpaster T, Randolph-Habecker J, Hoffstrom BG, Jalikis FG, Koch LK, et al. Analysis of ROR1 Protein Expression in Human Cancer and Normal Tissues. Clin Cancer Res. 15 de junio de 2017;23(12):3061-71.

194. Kaucká M, Krejčí P, Plevová K, Pavlová Š, Procházková J, Janovská P, et al. Post-translational modifications regulate signalling by Ror1. Acta Physiol. noviembre de 2011;203(3):351-62.

195. Hojjat-Farsangi M, Khan AS, Daneshmanesh AH, Moshfegh A, Sandin A, Mansouri L, et al. The tyrosine kinase receptor ROR1 is constitutively phosphorylated in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. PloS One. 2013;8(10):e78339.

196. Karvonen H, Perttilä R, Niininen W, Hautanen V, Barker H, Murumägi A, et al. Wnt5a and ROR1 activate non-canonical Wnt signaling via RhoA in TCF3-PBX1 acute lymphoblastic leukemia and highlight new treatment strategies via Bcl-2 co-targeting. Oncogene. abril de 2019;38(17):3288-300.

197. Janovska P, Poppova L, Plevova K, Plesingerova H, Behal M, Kaucka M, et al. Autocrine Signaling by Wnt-5a Deregulates Chemotaxis of Leukemic Cells and Predicts Clinical Outcome in Chronic Lymphocytic Leukemia. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 de enero de 2016;22(2):459-69.

198. Quezada MJ, Lopez-Bergami P. The signaling pathways activated by ROR1 in cancer. Cell Signal. abril de 2023;104:110588.

199. Barbero G, Castro MV, Villanueva MB, Quezada MJ, Fernández NB, DeMorrow S, et al. An Autocrine Wnt5a Loop Promotes NF-κB Pathway Activation and Cytokine/Chemokine Secretion in Melanoma. Cells. 10 de septiembre de 2019;8(9):E1060.

200. Zhang S, Cui B, Lai H, Liu G, Ghia EM, Widhopf GF, et al. Ovarian cancer stem cells express ROR1, which can be targeted for anti-cancer-stem-cell therapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2 de diciembre de 2014;111(48):17266-71.

201. Zheng YZ, Ma R, Zhou JK, Guo CL, Wang YS, Li ZG, et al. ROR1 is a novel prognostic biomarker in patients with lung adenocarcinoma. Sci Rep. 10 de noviembre de 2016;6(1):36447.

202. Chien HP, Ueng SH, Chen SC, Chang YS, Lin YC, Lo YF, et al. Expression of ROR1 has prognostic significance in triple negative breast cancer. Virchows Arch. mayo de 2016;468(5):589-95.

203. Zhou JK, Zheng YZ, Liu XS, Gou Q, Ma R, Guo CL, et al. ROR1 expression as a biomarker for predicting prognosis in patients with colorectal cancer. Oncotarget. 16 de mayo de 2017;8(20):32864-72.

204. Zhou Q, Zhou S, Wang H, Li Y, Xiao X, Yang J. Stable silencing of ROR1 regulates cell cycle, apoptosis, and autophagy in a lung adenocarcinoma cell line. Int J Clin Exp Pathol. 2020;13(5):1108-20.

205. Fultang N, Illendula A, Lin J, Pandey MK, Klase Z, Peethambaran B. ROR1 regulates chemoresistance in Breast Cancer via modulation of drug efflux pump ABCB1. Sci Rep. 4 de febrero de 2020;10(1):1821.

206. Yamaguchi T, Lu C, Ida L, Yanagisawa K, Usukura J, Cheng J, et al. ROR1 sustains caveolae and survival signalling as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1. Nat Commun. 4 de enero de 2016;7:10060.

207. Yamaguchi T, Hayashi M, Ida L, Yamamoto M, Lu C, Kajino T, et al. ROR1-CAVIN3 interaction required for caveolae-dependent endocytosis and pro-survival signaling in lung adenocarcinoma. Oncogene. junio de 2019;38(26):5142-57.

208. Fernández NB, Lorenzo D, Picco ME, Barbero G, Dergan-Dylon LS, Marks MP, et al. ROR1 contributes to melanoma cell growth and migration by regulating N-cadherin expression via the PI3K/Akt pathway. Mol Carcinog. noviembre de 2016;55(11):1772-85.

209. Cao J, Wang X, Dai T, Wu Y, Zhang M, Cao R, et al. Twist promotes tumor metastasis in basal-like breast cancer by transcriptionally upregulating ROR1. Theranostics. 2018;8(10):2739-51.

210. Cetin M, Odabas G, Douglas LR, Duriez PJ, Balcik-Ercin P, Yalim-Camci I, et al. ROR1 Expression and Its Functional Significance in Hepatocellular Carcinoma Cells. Cells. 2 de marzo de 2019;8(3):210.

211. Tseng HC, Kao HW, Ho MR, Chen YR, Lin TW, Lyu PC, et al. Cytoskeleton network and cellular migration modulated by nuclear-localized receptor tyrosine kinase ROR1. Anticancer Res. diciembre de 2011;31(12):4239-49.

212. O'Connell MP, Marchbank K, Webster MR, Valiga AA, Kaur A, Vultur A, et al. Hypoxia Induces Phenotypic Plasticity and Therapy Resistance in Melanoma via the Tyrosine Kinase Receptors ROR1 and ROR2. Cancer Discov. 1 de diciembre de 2013;3(12):1378-93.

213. Choi MY, Widhopf GF, Wu CCN, Cui B, Lao F, Sadarangani A, et al. Pre-clinical Specificity and Safety of UC-961, a First-In-Class Monoclonal Antibody Targeting ROR1. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. junio de 2015;15:S167-9.

214. Choi MY, Widhopf GF, Ghia EM, Kidwell RL, Hasan MK, Yu J, et al. Phase I Trial: Cirmtuzumab Inhibits ROR1 Signaling and Stemness Signatures in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. Cell Stem Cell. 1 de junio de 2018;22(6):951-959.e3.

215. Zhang S, Zhang H, Ghia EM, Huang J, Wu L, Zhang J, et al. Inhibition of chemotherapy resistant breast cancer stem cells by a ROR1 specific antibody. Proc Natl Acad Sci U S A. 22 de enero de 2019;116(4):1370-7.

216. Shatsky RA, Batra-Sharma H, Helsten T, Schwab RB, Pittman EI, Pu M, et al. A phase 1b study of zilovertamab in combination with paclitaxel for locally advanced/unresectable or metastatic HER2-negative breast cancer. Breast Cancer Res. 26 de febrero de 2024;26(1):32.

217. Yu J, Chen L, Cui B, Wu C, Choi MY, Chen Y, et al. Cirmtuzumab inhibits Wnt5a-induced Rac1 activation in chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib. Leukemia. junio de 2017;31(6):1333-9.

218. Choi MY, Wierda WG, Lee HJ, Tzachanis D, Ianopulos X, Jezior D, et al. Phase 1/2 trial of cirmtuzumab and ibrutinib: Planned analysis of phase 1 CLL cohorts. J Clin Oncol. 20 de mayo de 2019;37(15_suppl):7527-7527.

219. Vaisitti T, Arruga F, Vitale N, Lee TT, Ko M, Chadburn A, et al. ROR1 targeting with the antibody-drug conjugate VLS-101 is effective in Richter syndrome patient–derived xenograft mouse models. Blood. 17 de junio de 2021;137(24):3365-77.

220. Spurgeon S, Mei M, Barr PM, Barrientos J, De Vos S, Furman R, et al. P1200: ZILOVERTAMAB VEDOTIN (MK-2140) IN RELAPSED OR REFRACTORY (R/R) NON-HODGKIN LYMPHOMA (NHL): UPDATED RESULTS FROM THE PHASE 1 WAVELINE-001 STUDY. HemaSphere. 8 de agosto de 2023;7(S3):e54506b2.

221. Beerli RR, Waldmeier L, Gébleux R, Pretto F, Grawunder U. Abstract LB-197: NBE-002, an anthracycline-based immune-stimulatory antibody drug conjugate (iADC) targeting ROR1

for the treatment of triple-negative breast cancer. Cancer Res. 1 de julio de 2019;79(13_Supplement):LB-197-LB-197.

222. Suryadevara CM, Gedeon PC, Sanchez-Perez L, Verla T, Alvarez-Breckenridge C, Choi BD, et al. Are BiTEs the "missing link" in cancer therapy? OncoImmunology. 3 de junio de 2015;4(6):e1008339.

223. Qi J, Li X, Peng H, Cook EM, Dadashian EL, Wiestner A, et al. Potent and selective antitumor activity of a T cell-engaging bispecific antibody targeting a membrane-proximal epitope of ROR1. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 12 de junio de 2018 [citado 3 de agosto de 2024];115(24). Disponible en: https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1719905115

224. Li J, Stagg NJ, Johnston J, Harris MJ, Menzies SA, DiCara D, et al. Membrane-Proximal Epitope Facilitates Efficient T Cell Synapse Formation by Anti-FcRH5/CD3 and Is a Requirement for Myeloma Cell Killing. Cancer Cell. marzo de 2017;31(3):383-95.

225. Gohil SH, Paredes-Moscosso SR, Harrasser M, Vezzalini M, Scarpa A, Morris E, et al. An ROR1 bi-specific T-cell engager provides effective targeting and cytotoxicity against a range of solid tumors. OncoImmunology. 17 de mayo de 2017;e1326437.

226. Wallstabe L, Göttlich C, Nelke LC, Kühnemundt J, Schwarz T, Nerreter T, et al. ROR1-CAR T cells are effective against lung and breast cancer in advanced microphysiologic 3D tumor models. JCI Insight. 19 de septiembre de 2019;4(18):e126345.

227. Huang X, Park H, Greene J, Pao J, Mulvey E, Zhou SX, et al. IGF1R- and ROR1-Specific CAR T Cells as a Potential Therapy for High Risk Sarcomas. Castresana JS, editor. PLOS ONE. 14 de julio de 2015;10(7):e0133152.

228. Srivastava S, Furlan SN, Jaeger-Ruckstuhl CA, Sarvothama M, Berger C, Smythe KS, et al. Immunogenic Chemotherapy Enhances Recruitment of CAR-T Cells to Lung Tumors and Improves Antitumor Efficacy when Combined with Checkpoint Blockade. Cancer Cell. febrero de 2021;39(2):193-208.e10.

229. Osorio-Rodríguez DA, Camacho BA, Ramírez-Segura C. Anti-ROR1 CAR-T cells: Architecture and performance. Front Med. 17 de febrero de 2023;10:1121020.

230. Wu D, Yu X, Wang J, Hui X, Zhang Y, Cai Y, et al. Ovarian Cancer Stem Cells with High ROR1 Expression Serve as a New Prophylactic Vaccine for Ovarian Cancer. J Immunol Res. 17 de marzo de 2019;2019:1-16.

231. Hojjat-Farsangi M, Daneshmanesh AH, Khan AS, Shetye J, Mozaffari F, Kharaziha P, et al. First-in-class oral small molecule inhibitor of the tyrosine kinase ROR1 (KAN0439834) induced significant apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. Leukemia. octubre de 2018;32(10):2291-5.

232. Daneshmanesh AH, Hojjat-Farsangi M, Ghaderi A, Moshfegh A, Hansson L, Schultz J, et al. A receptor tyrosine kinase ROR1 inhibitor (KAN0439834) induced significant apoptosis

of pancreatic cells which was enhanced by erlotinib and ibrutinib. Ahmad A, editor. PLOS ONE. 1 de junio de 2018;13(6):e0198038.

233. Ghaderi A, Daneshmanesh AH, Moshfegh A, Kokhaei P, Vågberg J, Schultz J, et al. ROR1 Is Expressed in Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) and a Small Molecule Inhibitor of ROR1 (KAN0441571C) Induced Apoptosis of Lymphoma Cells. Biomedicines. 23 de junio de 2020;8(6):E170.

234. Liu X, Pu W, He H, Fan X, Zheng Y, Zhou JK, et al. Novel ROR1 inhibitor ARI-1 suppresses the development of non-small cell lung cancer. Cancer Lett. 28 de agosto de 2019;458:76-85.

235. Shabani M, Naseri J, Shokri F. Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1: a novel target for cancer immunotherapy. Expert Opin Ther Targets. 3 de julio de 2015;19(7):941-55.

236. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. Cell Death Differ. noviembre de 2005;12(S2):1463-7.

237. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ. marzo de 2018;25(3):486-541.

238. Voss AK, Strasser A. The essentials of developmental apoptosis. F1000Research. 26 de febrero de 2020;9:148.

239. Thompson CB. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. Science. 10 de marzo de 1995;267(5203):1456-62.

240. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell Death Differ. enero de 2012;19(1):107-20.

241. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control. Microb Cell. 7 de marzo de 2016;3(3):101-8.

242. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. Nat Rev Mol Cell Biol. enero de 2014;15(1):49-63.

243. Roos WP, Thomas AD, Kaina B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. Nat Rev Cancer. enero de 2016;16(1):20-33.

244. Brinkmann K, Ng AP, De Graaf CA, Strasser A. What can we learn from mice lacking pro-survival BCL-2 proteins to advance BH3 mimetic drugs for cancer therapy? Cell Death Differ. junio de 2022;29(6):1079-93.

245. Kaloni D, Diepstraten ST, Strasser A, Kelly GL. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. Apoptosis. febrero de 2023;28(1-2):20-38.

246. D'Aguanno S, Del Bufalo D. Inhibition of Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins in Preclinical and Clinical Studies: Current Overview in Cancer. Cells. 21 de mayo de 2020;9(5):1287.

247. Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. Cell Death Dis. 21 de febrero de 2019;10(3):177.

248. Eberle J, Hossini A. Expression and Function of Bcl-2 Proteins in Melanoma. Curr Genomics. 1 de septiembre de 2008;9(6):409-19.

249. Hartman ML, Czyz M. Anti-apoptotic proteins on guard of melanoma cell survival. Cancer Lett. abril de 2013;331(1):24-34.

250. Eichhorn JM, Alford SE, Sakurikar N, Chambers TC. Molecular analysis of functional redundancy among anti-apoptotic Bcl-2 proteins and its role in cancer cell survival. Exp Cell Res. abril de 2014;322(2):415-24.

251. Campbell KJ, Tait SWG. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. Open Biol. mayo de 2018;8(5):180002.

252. Carrington EM, Zhan Y, Brady JL, Zhang JG, Sutherland RM, Anstee NS, et al. Anti-apoptotic proteins BCL-2, MCL-1 and A1 summate collectively to maintain survival of immune cell populations both in vitro and in vivo. Cell Death Differ. mayo de 2017;24(5):878-88.

253. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. Cell Death Differ. enero de 2018;25(1):65-80.

254. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol. 1 de abril de 2013;5(4):a008714-a008714.

255. Ke N, Godzik A, Reed JC. Bcl-B, a Novel Bcl-2 Family Member That Differentially Binds and Regulates Bax and Bak. J Biol Chem. abril de 2001;276(16):12481-4.

256. Zhai D, Ke N, Zhang H, Ladror U, Joseph M, Eichinger A, et al. Characterization of the anti-apoptotic mechanism of Bcl-B. Biochem J. 15 de noviembre de 2003;376(1):229-36.

257. Krajewska M, Kitada S, Winter JN, Variakojis D, Lichtenstein A, Zhai D, et al. Bcl-B Expression in Human Epithelial and Nonepithelial Malignancies. Clin Cancer Res. 15 de mayo de 2008;14(10):3011-21.

258. Lee IH, Kang K, Kang BW, Lee SJ, Bae WK, Hwang JE, et al. Genetic variations using whole-exome sequencing might predict response for neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. Med Oncol. noviembre de 2018;35(11):145.

259. Hamouda MA, Jacquel A, Robert G, Puissant A, Richez V, Cassel R, et al. BCL-B (BCL2L10) is overexpressed in patients suffering from multiple myeloma (MM) and drives an MM-like disease in transgenic mice. J Exp Med. 22 de agosto de 2016;213(9):1705-22.

260. Imazeki. BCL2L10 is frequently silenced by promoter hypermethylation in gastric cancer. Oncol Rep [Internet]. 23 de abril de 2010 [citado 13 de agosto de 2024];23(6). Disponible en: http://www.spandidos-publications.com/or/23/6/1701

261. Bai Y, Wang J, Han J, Xie X, Ji C, Yin J, et al. BCL2L10 inhibits growth and metastasis of hepatocellular carcinoma both in vitro and in vivo. Mol Carcinog. marzo de 2017;56(3):1137-49.

262. Lee R min, Chen J, Matthews CP, McDougall JK, Neiman PE. Characterization of NR13-related human cell death regulator, Boo/Diva, in normal and cancer tissues. Biochim Biophys Acta BBA - Gene Struct Expr. septiembre de 2001;1520(3):187-94.

263. Liu X, Hu X, Kuang Y, Yan P, Li L, Li C, et al. BCLB, methylated in hepatocellular carcinoma, is a starvation stress sensor that induces apoptosis and autophagy through the AMPK-mTOR signaling cascade. Cancer Lett. junio de 2017;395:63-71.

264. Xu JD, Cao XX, Long ZW, Liu XP, Furuya T, Xu JW, et al. BCL2L10 protein regulates apoptosis/proliferation through differential pathways in gastric cancer cells. J Pathol. febrero de 2011;223(3):400-9.

265. Inohara N, Gourley TS, Carrio R, Muñiz M, Merino J, Garcia I, et al. Diva, a Bcl-2 Homologue that Binds Directly to Apaf-1 and Induces BH3-independent Cell Death. J Biol Chem. diciembre de 1998;273(49):32479-86.

266. Aouacheria A, Arnaud E, Venet S, Lalle P, Gouy M, Rigal D, et al. Nrh, a human homologue of Nr-13 associates with Bcl-Xs and is an inhibitor of apoptosis. Oncogene. 13 de septiembre de 2001;20(41):5846-55.

267. Song Q. Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. EMBO J. 4 de enero de 1999;18(1):167-78.

268. Zhang H. Bcl2-L-10, a novel anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, blocks apoptosis in the mitochondria death pathway but not in the death receptor pathway. Hum Mol Genet. 1 de octubre de 2001;10(21):2329-39.

269. Robert G, Gastaldi C, Puissant A, Hamouda A, Jacquel A, Dufies M, et al. The anti-apoptotic Bcl-B protein inhibits BECN1-dependent autophagic cell death. Autophagy. abril de 2012;8(4):637-49.

270. Qiu DM, Wang GL, Chen L, Xu YY, He S, Cao XL, et al. The expression of beclin-1, an autophagic gene, in hepatocellular carcinoma associated with clinical pathological and prognostic significance. BMC Cancer. diciembre de 2014;14(1):327.

271. Lee S, Kwon J, Woo JH, Kim K, Lee K. Bcl2l10 mediates the proliferation, invasion and migration of ovarian cancer cells. Int J Oncol [Internet]. 23 de diciembre de 2019 [citado 13 de agosto de 2024]; Disponible en: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2019.4949

272. Xu JD, Furuya T, Cao XX, Liu XL, Li QQ, Wang WJ, et al. Loss of BCL2L10 protein expression as prognostic predictor for poor clinical outcome in gastric carcinoma. Histopathology. diciembre de 2010;57(6):814-24.

273. Nougarede A, Popgeorgiev N, Kassem L, Omarjee S, Borel S, Mikaelian I, et al. Breast Cancer Targeting through Inhibition of the Endoplasmic Reticulum-Based Apoptosis Regulator Nrh/BCL2L10. Cancer Res. 15 de marzo de 2018;78(6):1404-17.

274. Cluzeau T, Robert G, Mounier N, Karsenti JM, Dufies M, Puissant A, et al. BCL2L10 is a predictive factor for resistance to Azacitidine in MDS and AML patients. Oncotarget. 30 de abril de 2012;3(4):490-501.

275. Guo B, Zhai D, Cabezas E, Welsh K, Nouraini S, Satterthwait AC, et al. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. Nature. mayo de 2003;423(6938):456-61.

276. Bhatnagar S, Gazin C, Chamberlain L, Ou J, Zhu X, Tushir JS, et al. TRIM37 is a new histone H2A ubiquitin ligase and breast cancer oncoprotein. Nature. diciembre de 2014;516(7529):116-20.

277. Zou J, Ardecky R, Pinkerton AB, Sergienko E, Su Y, Stonich D, et al. Selective Bcl-2 Inhibitor Probes. En: Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2010 [citado 5 de septiembre de 2024]. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK133437/

278. Zhang S, Chen L, Cui B, Chuang HY, Yu J, Wang-Rodriguez J, et al. ROR1 Is Expressed in Human Breast Cancer and Associated with Enhanced Tumor-Cell Growth. Li J, editor. PLoS ONE. 5 de marzo de 2012;7(3):e31127.

279. Crowe MS, Zavorotinskaya T, Voliva CF, Shirley MD, Wang Y, Ruddy DA, et al. RAF-Mutant Melanomas Differentially Depend on ERK2 Over ERK1 to Support Aberrant MAPK Pathway Activation and Cell Proliferation. Mol Cancer Res. 1 de junio de 2021;19(6):1063-75.

280. Castro MV, Barbero GA, Villanueva MB, Grumolato L, Nsengimana J, Newton-Bishop J, et al. ROR2 has a protective role in melanoma by inhibiting Akt activity, cell-cycle progression, and proliferation. J Biomed Sci. 13 de noviembre de 2021;28(1):76.

281. Castro MV, Barbero GA, Máscolo P, Ramos R, Quezada MJ, Lopez-Bergami P. ROR2 increases the chemoresistance of melanoma by regulating p53 and Bcl2-family proteins via ERK hyperactivation. Cell Mol Biol Lett. diciembre de 2022;27(1):23.

282. Castro MV, Barbero GA, Máscolo P, Villanueva MB, Nsengimana J, Newton-Bishop J, et al. ROR2 promotes epithelial-mesenchymal transition by hyperactivating ERK in melanoma. J Cell Commun Signal. marzo de 2023;17(1):75-88.

283. Zhao B, Shah P, Budanov AV, Qiang L, Ming M, Aplin A, et al. Sestrin2 Protein Positively Regulates AKT Enzyme Signaling and Survival in Human Squamous Cell Carcinoma and Melanoma Cells. J Biol Chem. diciembre de 2014;289(52):35806-14.

284. Cichorek M, Kozlowska K, Bryl E. The activity of caspases in spontaneous and camptothecin-induced death of melanotic and amelanotic melanoma cell. Cancer Biol Ther. marzo de 2007;6(3):346-53.

285. Li G, Bush JA, Ho VC. p53-Dependent Apoptosis in Melanoma Cells After Treatment with Camptothecin 1. J Invest Dermatol. marzo de 2000;114(3):514-9.

286. Alshammari FM, Reda SM, Ghannam MM. Potential effects of gamma irradiation on the stability and therapeutic activity of anticancer drug, doxorubicin. J Radiat Res Appl Sci. abril de 2017;10(2):103-9.

287. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-β. Nature. enero de 2000;403(6765):98-103.

288. Belmokhtar CA, Hillion J, Ségal-Bendirdjian E. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. Oncogene. 7 de junio de 2001;20(26):3354-62.

289. Sullivan R, Paré GC, Frederiksen LJ, Semenza GL, Graham CH. Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is associated with decreased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity. Mol Cancer Ther. 1 de julio de 2008;7(7):1961-73.

290. Marchetti P, Trinh A, Khamari R, Kluza J. Melanoma metabolism contributes to the cellular responses to MAPK/ERK pathway inhibitors. Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj. abril de 2018;1862(4):999-1005.

291. Antonsson A, Persson JL. Induction of apoptosis by staurosporine involves the inhibition of expression of the major cell cycle proteins at the G(2)/m checkpoint accompanied by alterations in Erk and Akt kinase activities. Anticancer Res. agosto de 2009;29(8):2893-8.

292. Malsy M, Bitzinger D, Graf B, Bundscherer A. Staurosporine induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells PaTu 8988t and Panc-1 via the intrinsic signaling pathway. Eur J Med Res. diciembre de 2019;24(1):5.

293. Sangweni NF, Gabuza K, Huisamen B, Mabasa L, Van Vuuren D, Johnson R. Molecular insights into the pathophysiology of doxorubicin-induced cardiotoxicity: a graphical representation. Arch Toxicol. junio de 2022;96(6):1541-50.

294. Chen Y, Chen L, Yu J, Ghia EM, Choi MY, Zhang L, et al. Cirmtuzumab blocks Wnt5a/ROR1 stimulation of NF-κB to repress autocrine STAT3 activation in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 26 de septiembre de 2019;134(13):1084-94.

295. Miyake N, Ochi N, Yamane H, Fukazawa T, Ikeda T, Yokota E, et al. Targeting ROR1 in combination with pemetrexed in malignant mesothelioma cells. Lung Cancer Amst Neth. enero de 2020;139:170-8.

296. Choi HJ, Han JS. Overexpression of phospholipase D enhances Bcl-2 expression by activating STAT3 through independent activation of ERK and p38MAPK in HeLa cells. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res. junio de 2012;1823(6):1082-91.

297. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, et al. Constitutive Activation of Stat3 Signaling Confers Resistance to Apoptosis in Human U266 Myeloma Cells. Immunity. enero de 1999;10(1):105-15.

298. Becker TM, Boyd SC, Mijatov B, Gowrishankar K, Snoyman S, Pupo GM, et al. Mutant B-RAF-Mcl-1 survival signaling depends on the STAT3 transcription factor. Oncogene. 27 de febrero de 2014;33(9):1158-66.

299. Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, Turkson J, Oshiro M, Kothapalli R, et al. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. J Clin Invest. 1 de febrero de 2001;107(3):351-62.

300. Oh YM, Kim JK, Choi Y, Choi S, Yoo JY. Prediction and Experimental Validation of Novel STAT3 Target Genes in Human Cancer Cells. Hannenhalli S, editor. PLoS ONE. 4 de septiembre de 2009;4(9):e6911.

301. Raso MG, Barrientos Toro E, Evans K, Rizvi Y, Lazcano R, Akcakanat A, et al. Heterogeneous Profile of ROR1 Protein Expression across Tumor Types. Cancers. 15 de mayo de 2024;16(10):1874.

302. Choi MY, Widhopf GF, Ghia EM, Kidwell RL, Hasan MK, Yu J, et al. Phase I Trial: Cirmtuzumab Inhibits ROR1 Signaling and Stemness Signatures in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. Cell Stem Cell. junio de 2018;22(6):951-959.e3.

303. Thiele S, Zimmer A, Göbel A, Rachner TD, Rother S, Fuessel S, et al. Role of WNT5A receptors FZD5 and RYK in prostate cancer cells. Oncotarget. 5 de junio de 2018;9(43):27293-304.

304. Fu Y, Chen Y, Huang J, Cai Z, Wang Y. RYK, a receptor of noncanonical Wnt ligand Wnt5a, is positively correlated with gastric cancer tumorigenesis and potential of liver metastasis. Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol. 1 de febrero de 2020;318(2):G352-60.

305. Habu M, Koyama H, Kishida M, Kamino M, Iijima M, Fuchigami T, et al. Ryk is essential for Wnt-5a-dependent invasiveness in human glioma. J Biochem (Tokyo). 1 de julio de 2014;156(1):29-38.

306. Raivola J, Dini A, Karvonen H, Piki E, Salokas K, Niininen W, et al. Multiomics characterization implicates PTK7 in ovarian cancer EMT and cell plasticity and offers strategies for therapeutic intervention. Cell Death Dis. 17 de agosto de 2022;13(8):714.

307. Tsai T, Gow C, Liu Y, Tsai M, Chang T, Wu S, et al. MiR-503 pleiotropically regulates epithelial-mesenchymal transition and targets PTK7 to control lung cancer metastasis. Cancer Med. julio de 2023;12(13):14511-25.

308. Duan F, Tang J, Kong FL, Zou HW, Ni BL, Yu JC. Identification of PTK7 as a promising therapeutic target for thyroid cancer. Eur Rev Med Pharmacol Sci. junio de 2020;24(12):6809-17.

309. Bie J, Hu X, Yang M, Shi X, Zhang X, Wang Z. PTK7 promotes the malignant properties of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell lines. Hum Cell. abril de 2020;33(2):356-65.

310. Liu K, Song G, Zhang X, Li Q, Zhao Y, Zhou Y, et al. PTK7 is a novel oncogenic target for esophageal squamous cell carcinoma. World J Surg Oncol. diciembre de 2017;15(1):105.

311. Meng L, Sefah K, O'Donoghue MB, Zhu G, Shangguan D, Noorali A, et al. Silencing of PTK7 in Colon Cancer Cells: Caspase-10-Dependent Apoptosis via Mitochondrial Pathway. Zhou Z, editor. PLoS ONE. 16 de noviembre de 2010;5(11):e14018.

312. Lopez-Bergami P, Barbero G. The emerging role of Wnt5a in the promotion of a pro-inflammatory and immunosuppressive tumor microenvironment. Cancer Metastasis Rev. septiembre de 2020;39(3):933-52.

313. Patel S, Alam A, Pant R, Chattopadhyay S. Wnt Signaling and Its Significance Within the Tumor Microenvironment: Novel Therapeutic Insights. Front Immunol. 16 de diciembre de 2019;10:2872.

314. Fultang N, Illendula A, Chen B, Wu C, Jonnalagadda S, Baird N, et al. Strictinin, a novel ROR1-inhibitor, represses triple negative breast cancer survival and migration via modulation of PI3K/AKT/GSK3ß activity. PloS One. 2019;14(5):e0217789.

315. Nakagawa N, Miyake N, Ochi N, Yamane H, Takeyama M, Nagasaki Y, et al. Targeting ROR1 in combination with osimertinib in EGFR mutant lung cancer cells. Exp Cell Res. diciembre de 2021;409(2):112940.

316. Ida L, Yamaguchi T, Yanagisawa K, Kajino T, Shimada Y, Suzuki M, et al. Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1, a target of NKX2-1/TTF-1 lineage-survival oncogene, inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated pro-apoptotic signaling in lung adenocarcinoma. Cancer Sci. febrero de 2016;107(2):155-61.

317. Ma W, He X, Zhang H, Liu T, Feng X, Zhou Q. [Down-regulation of receptor-tyrosine-kinase-like orphan receptor 1 suppresses cell growth and enhances apoptosis in human

colorectal carcinoma]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin J Cell Mol Immunol. mayo de 2016;32(5):655-9, 665.

318. Mao Y, Xu L, Wang J, Zhang L, Hou N, Xu J, et al. ROR1 associates unfavorable prognosis and promotes lymphoma growth in DLBCL by affecting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. BioFactors Oxf Engl. mayo de 2019;45(3):416-26.

319. Liu Y, Yang H, Chen T, Luo Y, Xu Z, Li Y, et al. Silencing of Receptor Tyrosine Kinase ROR1 Inhibits Tumor-Cell Proliferation via PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Lung Adenocarcinoma. PloS One. 2015;10(5):e0127092.

320. Nunez Lopez O, Bohanon FJ, Wang X, Ye N, Corsello T, Rojas-Khalil Y, et al. STAT3 inhibition suppresses hepatic stellate cell fibrogenesis: HJC0123, a potential therapeutic agent for liver fibrosis. RSC Adv. 2016;6(102):100652-63.

321. Chai EZP, Shanmugam MK, Arfuso F, Dharmarajan A, Wang C, Kumar AP, et al. Targeting transcription factor STAT3 for cancer prevention and therapy. Pharmacol Ther. junio de 2016;162:86-97.

322. Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. Nat Rev Cancer. noviembre de 2014;14(11):736-46.

323. Bournazou E, Bromberg J. Targeting the tumor microenvironment: JAK-STAT3 signaling. JAK-STAT. abril de 2013;2(2):e23828.

324. Avalle L, Pensa S, Regis G, Novelli F, Poli V. STAT1 and STAT3 in tumorigenesis: A matter of balance. JAK-STAT. 1 de abril de 2012;1(2):65-72.

325. Sellier H, Rébillard A, Guette C, Barré B, Coqueret O. How should we define STAT3 as an oncogene and as a potential target for therapy? JAK-STAT. 15 de julio de 2013;2(3):e24716.

326. Zhang HF, Lai R. STAT3 in Cancer—Friend or Foe? Cancers. 3 de julio de 2014;6(3):1408-40.

327. Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. Genes Dev. 15 de agosto de 2006;20(16):2149-82.

328. Rudin CM, Hann CL, Garon EB, Ribeiro De Oliveira M, Bonomi PD, Camidge DR, et al. Phase II Study of Single-Agent Navitoclax (ABT-263) and Biomarker Correlates in Patients with Relapsed Small Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res. 1 de junio de 2012;18(11):3163-9.

329. Mazumder S, Choudhary GS, Al-harbi S, Almasan A. Mcl-1 Phosphorylation Defines ABT-737 Resistance That Can Be Overcome by Increased NOXA Expression in Leukemic B cells. Cancer Res. 15 de junio de 2012;72(12):3069-79.

330. Yecies D, Carlson NE, Deng J, Letai A. Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. Blood. 22 de abril de 2010;115(16):3304-13.

331. Geserick P, Wang J, Feoktistova M, Leverkus M. The ratio of Mcl-1 and Noxa determines ABT737 resistance in squamous cell carcinoma of the skin. Cell Death Dis. 11 de septiembre de 2014;5(9):e1412-e1412.

332. Wang Q, Lu B, Zhang Y, Yu J, Guo J, Zhou Q, et al. STAT3 inhibitor BBI608 enhances the antitumor effect of gefitinib on EGFR-mutated non-small cell lung cancer cells. Hum Cell. noviembre de 2021;34(6):1855-65.

333. Ida L, Yamaguchi T, Yanagisawa K, Kajino T, Shimada Y, Suzuki M, et al. Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1, a target of NKX2-1/TTF-1 lineage-survival oncogene, inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated pro-apoptotic signaling in lung adenocarcinoma. Cancer Sci. febrero de 2016;107(2):155-61.

334. Karni R, Jove R, Levitzki A. Inhibition of pp60c-Src reduces Bcl-XL expression and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors. Oncogene. 19 de agosto de 1999;18(33):4654-62.

335. Zushi S, Shinomura Y, Kiyohara T, Miyazaki Y, Kondo S, Sugimachi M, et al. STAT3 mediates the survival signal in oncogenicras-transfected intestinal epithelial cells. Int J Cancer. 29 de octubre de 1998;78(3):326-30.

336. Liu H, Ma Y, Cole SM, Zander C, Chen KH, Karras J, et al. Serine phosphorylation of STAT3 is essential for Mcl-1 expression and macrophage survival. Blood. 1 de julio de 2003;102(1):344-52.

337. Placzek WJ, Wei J, Kitada S, Zhai D, Reed JC, Pellecchia M. A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. Cell Death Dis. 6 de mayo de 2010;1(5):e40-e40.

338. Beverly LJ, Lockwood WW, Shah PP, Erdjument-Bromage H, Varmus H. Ubiquitination, localization, and stability of an anti-apoptotic BCL2-like protein, BCL2L10/BCLb, are regulated by Ubiquilin1. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 17 de enero de 2012 [citado 9 de diciembre de 2024];109(3). Disponible en: https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1119167109

339. Mukherjee N, Schwan JV, Fujita M, Norris DA, Shellman YG. Alternative Treatments For Melanoma: Targeting BCL-2 Family Members to De-Bulk and Kill Cancer Stem Cells. J Invest Dermatol. septiembre de 2015;135(9):2155-61.

340. Wacheck V, Losert D, Günsberg P, Vornlocher HP, Hadwiger P, Geick A, et al. Small Interfering RNA Targeting Bcl-2 Sensitizes Malignant Melanoma. Oligonucleotides. octubre de 2003;13(5):393-400.

341. Zupi G, Scarsella M, Semple SC, Mottolese M, Natali PG, Leonetti C. Antitumor Efficacy of *bcl-2* and *c-myc* Antisense Oligonucleotides in Combination with Cisplatin in Human Melanoma Xenografts: Relevance of the Administration Sequence. Clin Cancer Res. 1 de marzo de 2005;11(5):1990-8.

342. Heere-Ress E, Thallinger C, Lucas T, Schlagbauer-Wadl H, Wacheck V, Monia BP, et al. Bcl-X_L is a chemoresistance factor in human melanoma cells that can be inhibited by antisense therapy. Int J Cancer. mayo de 2002;99(1):29-34.

343. Sinnberg T, Lasithiotakis K, Niessner H, Schittek B, Flaherty KT, Kulms D, et al. Inhibition of PI3K-AKT-mTOR Signaling Sensitizes Melanoma Cells to Cisplatin and Temozolomide. J Invest Dermatol. junio de 2009;129(6):1500-15.

344. Rooswinkel RW, Van De Kooij B, Verheij M, Borst J. Bcl-2 is a better ABT-737 target than Bcl-xL or Bcl-w and only Noxa overcomes resistance mediated by Mcl-1, Bfl-1, or Bcl-B. Cell Death Dis. 9 de agosto de 2012;3(8):e366-e366.

345. Aouacheria A, Brunet F, Gouy M. Phylogenomics of Life-Or-Death Switches in Multicellular Animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip Families of Apoptotic Regulators. Mol Biol Evol. 1 de diciembre de 2005;22(12):2395-416.

346. Guillemin Y, Cornut-Thibaut A, Gillet G, Penin F, Aouacheria A. Characterization of Unique Signature Sequences in the Divergent Maternal Protein Bcl2l10. Mol Biol Evol. 1 de diciembre de 2011;28(12):3271-83.

347. Naumann U, Weit S, Wischhusen J, Weller M. Diva/Boo is a negative regulator of cell death in human glioma cells. FEBS Lett. 7 de septiembre de 2001;505(1):23-6.

348. Ding Q, Xie XL, Wang MM, Yin J, Tian JM, Jiang XY, et al. The role of the apoptosis-related protein BCL-B in the regulation of mitophagy in hepatic stellate cells during the regression of liver fibrosis. Exp Mol Med. enero de 2019;51(1):1-13.

349. Sale MJ, Cook SJ. That which does not kill me makes me stronger; combining ERK 1/2 pathway inhibitors and BH 3 mimetics to kill tumour cells and prevent acquired resistance. Br J Pharmacol. agosto de 2013;169(8):1708-22.

350. Cragg MS, Jansen ES, Cook M, Harris C, Strasser A, Scott CL. Treatment of B-RAF mutant human tumor cells with a MEK inhibitor requires Bim and is enhanced by a BH3 mimetic. J Clin Invest. 3 de noviembre de 2008;118(11):3651-9.

351. Wroblewski D, Mijatov B, Mohana-Kumaran N, Lai F, Gallagher SJ, Haass NK, et al. The BH3-mimetic ABT-737 sensitizes human melanoma cells to apoptosis induced by selective BRAF inhibitors but does not reverse acquired resistance. Carcinogenesis. 1 de febrero de 2013;34(2):237-47.

352. Serasinghe MN, Missert DJ, Asciolla JJ, Podgrabinska S, Wieder SY, Izadmehr S, et al. Anti-apoptotic BCL-2 proteins govern cellular outcome following B-RAFV600E inhibition and can be targeted to reduce resistance. Oncogene. 12 de febrero de 2015;34(7):857-67.

353. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, et al. ABT-263: A Potent and Orally Bioavailable Bcl-2 Family Inhibitor. Cancer Res. 1 de mayo de 2008;68(9):3421-8.

354. Mattila KE, Vihinen P, Ramadan S, Skyttä T, Tiainen L, Vuoristo MS, et al. Combination chemotherapy with temozolomide, lomustine, vincristine and interferon-alpha (TOL-IFN) plus vemurafenib or TOL-IFN as first-line treatment for patients with advanced melanoma. Acta Oncol. 3 de marzo de 2020;59(3):310-4.

355. Makino E, Gutmann V, Kosnopfel C, Niessner H, Forschner A, Garbe C, et al. Melanoma cells resistant towards MAPK inhibitors exhibit reduced TAp73 expression mediating enhanced sensitivity to platinum-based drugs. Cell Death Dis. 11 de septiembre de 2018;9(9):930.

356. Bhatty M, Kato S, Piha-Paul SA, Naing A, Subbiah V, Huang HJ, et al. Phase 1 study of the combination of vemurafenib, carboplatin, and paclitaxel in patients with *BRAF* -mutated melanoma and other advanced malignancies. Cancer. febrero de 2019;125(3):463-72.

357. Simon A, Kourie HR, Kerger J. Is there still a role for cytotoxic chemotherapy after targeted therapy and immunotherapy in metastatic melanoma? A case report and literature review. Chin J Cancer. diciembre de 2017;36(1):10.

358. Borst A, Haferkamp S, Grimm J, Rösch M, Zhu G, Guo S, et al. BIK is involved in BRAF/MEK inhibitor induced apoptosis in melanoma cell lines. Cancer Lett. septiembre de 2017;404:70-8.

359. Sale MJ, Cook SJ. The increase in BIK expression following ERK1/2 pathway inhibition is a consequence of G1 cell-cycle arrest and not a direct effect on BIK protein stability. Biochem J. 1 de mayo de 2014;459(3):513-24.

ANEXOS

ANEXOS

A. Recetas de soluciones y buffers

Buffer Citrato (IHQ): 10mM citrato de sodio dihidratado y 0.5% Tween 20 en H_2Od (agua destilada), pH 6.

Buffer de Corrida: 25 mM Tris-HCl pH 8.8, 192 mM Glicina y 0.1% m/v SDS.

Buffer de Lisis celular (Extracción de Proteínas): 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% v/v NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM DTT y 10% v/v glicerol. Suplementado con inhibidores de proteasas (10 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml pepstatina A, 5 µg/ml aprotinina) e inhibidores de fosfatasas (1 mM flúor fenilmetilsulfonil, 50 mM β-glicerofosfato, 10 mM PNPP, 10 mM fluoruro de sodio y 1 mM ortovanadato de sodio).

Buffer de Siembra: 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% m/v SDS, 10% v/v glicerol, 0.01% m/v azul de bromofenol y 2% v/v β-mercaptoetanol.

Buffer TB: 10 mM Pipes, 55 mM $MnCl_2$, 15 mM $CaCl_2.2H_2O$, 250 mM KCl pH 6.7.

Buffer de Transferencia: 25 mM Tris-HCl pH 8.8, 192 mM glicina y 20% v/v metanol.

Buffer de Unión de Anexina V: 10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl y 2.5 mM $CaCl_2$ en H_2Od.

Buffer Tris-EDTA (IHQ): 10mM Tris y 1mM EDTA disódico en H_2Od, pH 9.

Gel Concentrador (WB): 3,9% Acrilamida:Bisacrilamida (29:1), 250 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1 % m/v SDS, 0.2% m/v persulfato de amonio y 0.075% v/v TEMED.

Gel Separador (WB): 10 o 12% Acrilamida:Bisacrilamida (29:1), 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.2 % m/v SDS, 0.2% m/v persulfato de amonio y 0.075% v/v TEMED.

Medio LB: 10 g/l NaCl, 5 g/l extracto de levadura y 10 g/l triptona en H_2Od.

Medio LB-agar: 15 g/l de ágar en LB.

HBS (2X): 50 mM HEPES, 10 mM KCl, 12 mM Glucosa, 1.5 mM Na_2HPO_4 y 280 mM NaCl, pH 7.05.

PFA 4%: 4% m/v de PFA en 100 ml de PBS 1X.

PBS 1X: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM, Na_2HPO_4 y 2 mM KH_2PO_4, pH 7.2.

PBS-Tween: 0.05% v/v Tween 20 en PBS 1X.

Solución de ácido acético 10%: 10% v/v de ácido acético en H_2Od.

Solución de Bloqueo (IHQ): 3% SFB en PBS 1X, pH 7.4 – 7.6.

Solución de Bloqueo (WB): 5% m/v leche en polvo descremada (Svelty) en PBS-Tween.

Solución de Bloqueo de Peroxidasa Endógena (IHQ): 0.5 o 1.5% H_2O_2 en alcohol metílico absoluto.

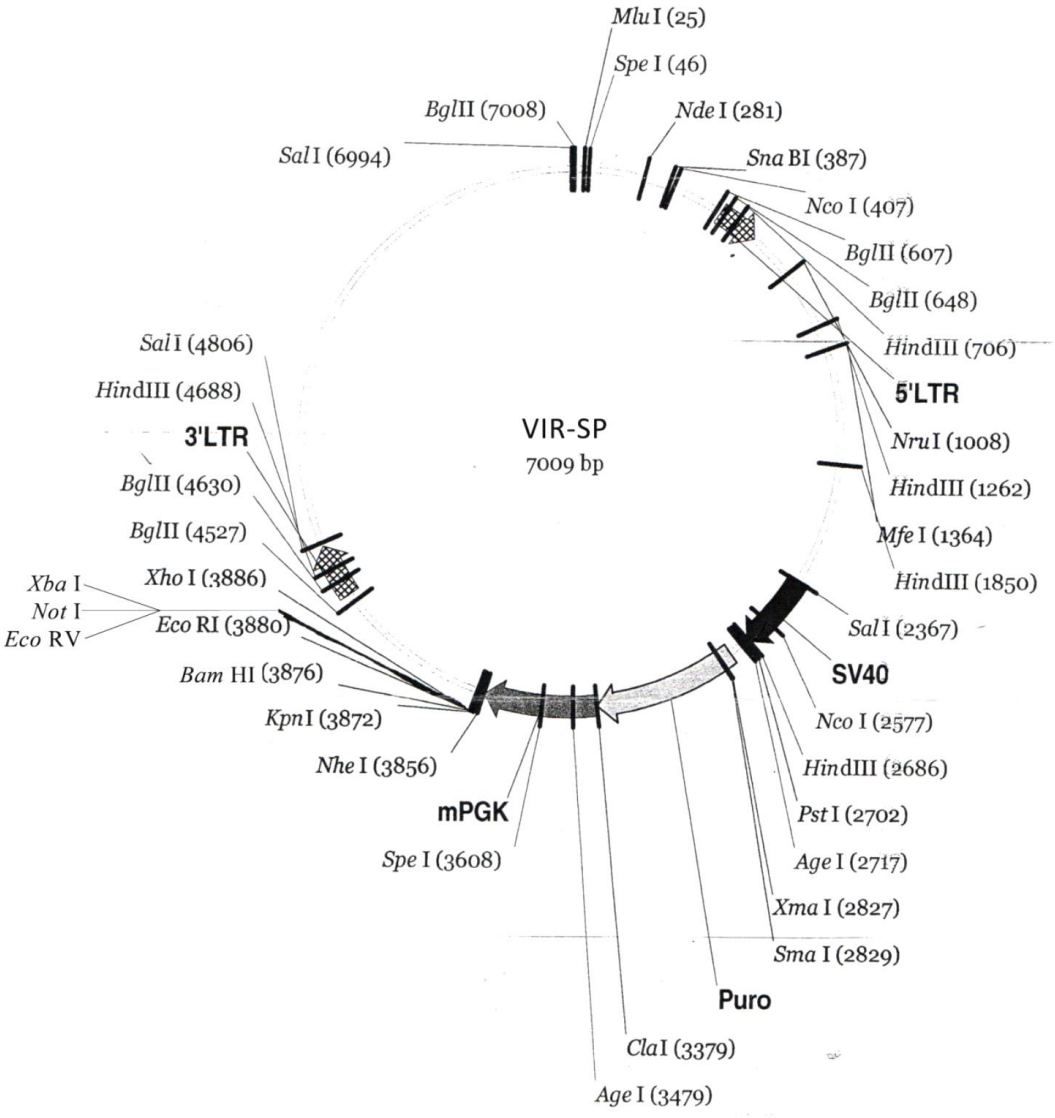
Solución de Cristal Violeta: 0.1% m/v de cristal violeta en una solución 10% v/v de etanol en H_2Od.

Solución de Ensayo de Luciferasa: 25 mM Glicilglicina pH 7.8, 5 mM ATP, 10 mM MgSO4 y 330 nM Luciferina.

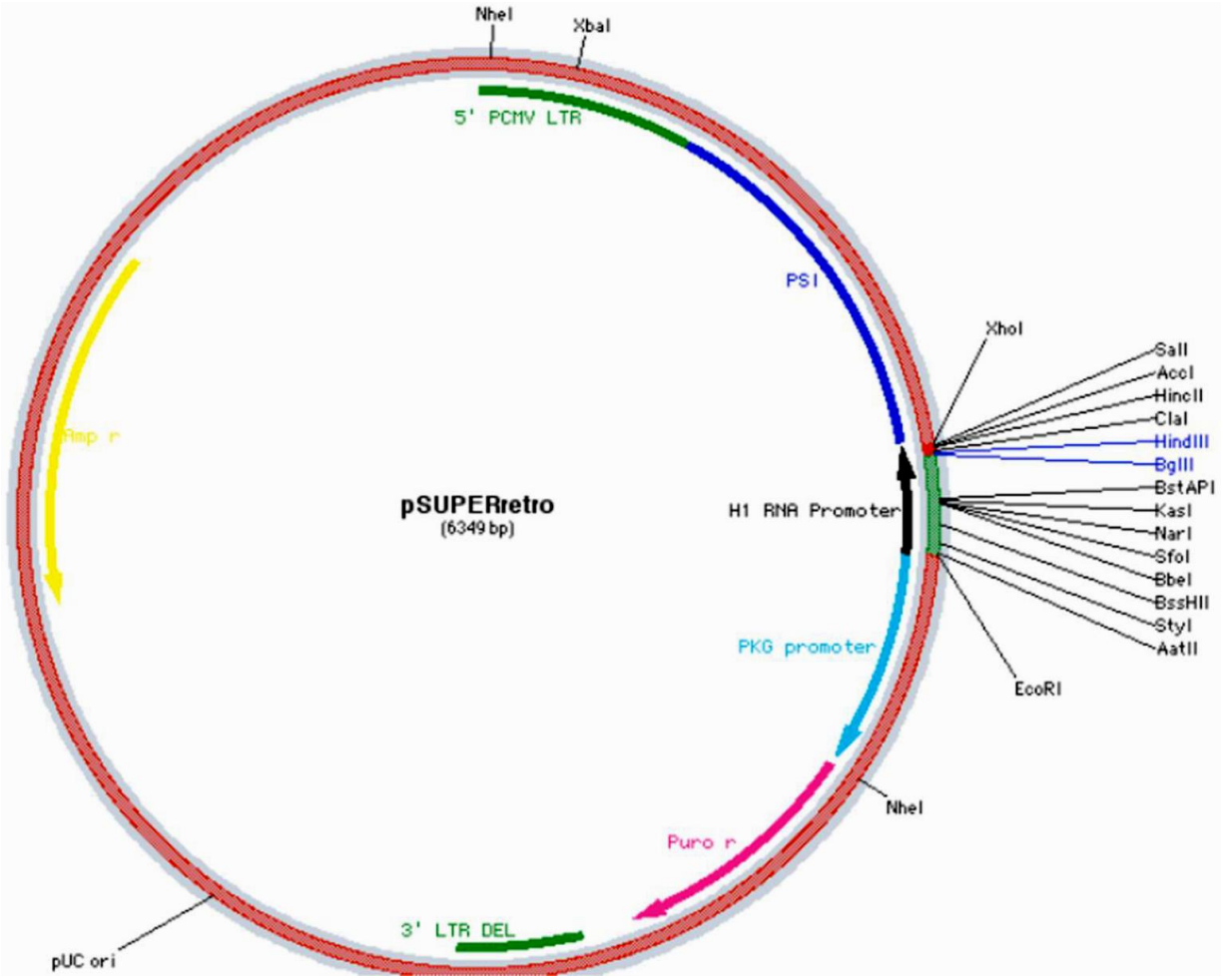
Solución de Rojo Ponceau: 0.2% m/v de Rojo Ponceau S en 0,5% v/v de ácido acético en H_2Od.

B. Plásmidos

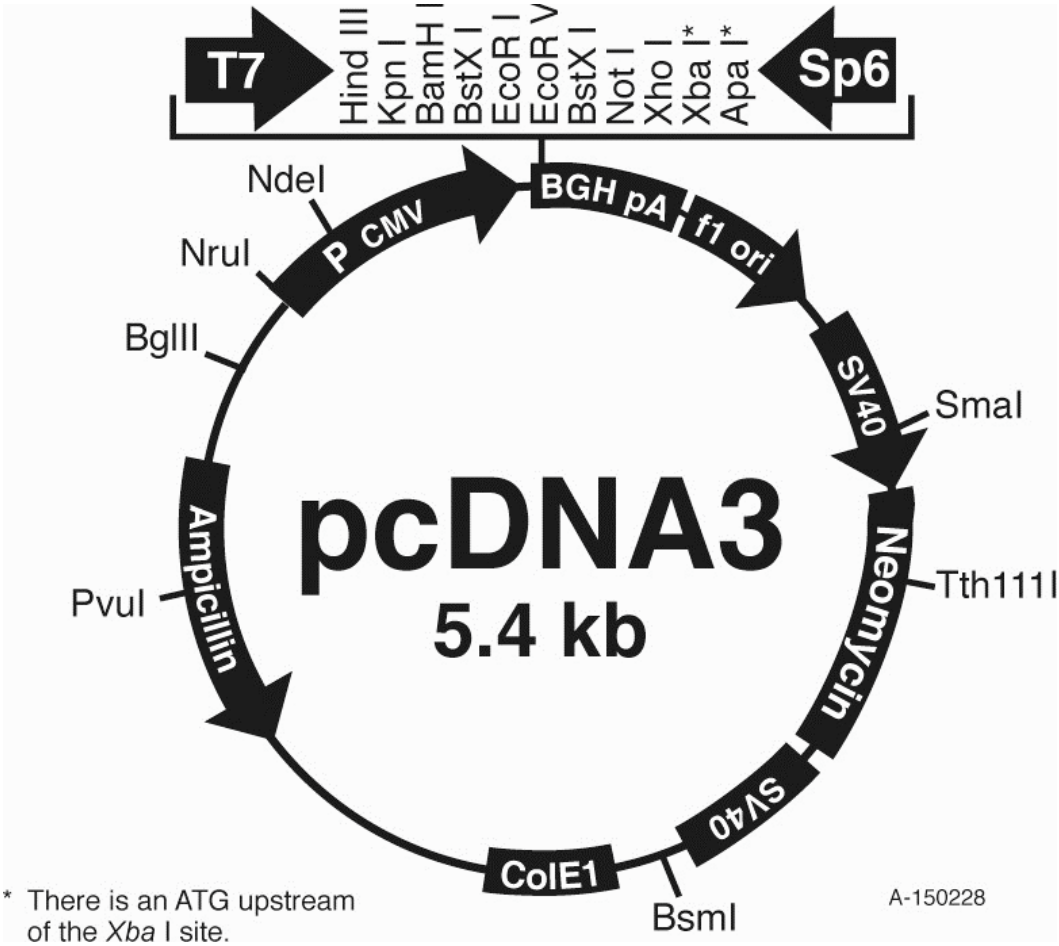
B.1 Vector Vir-SP



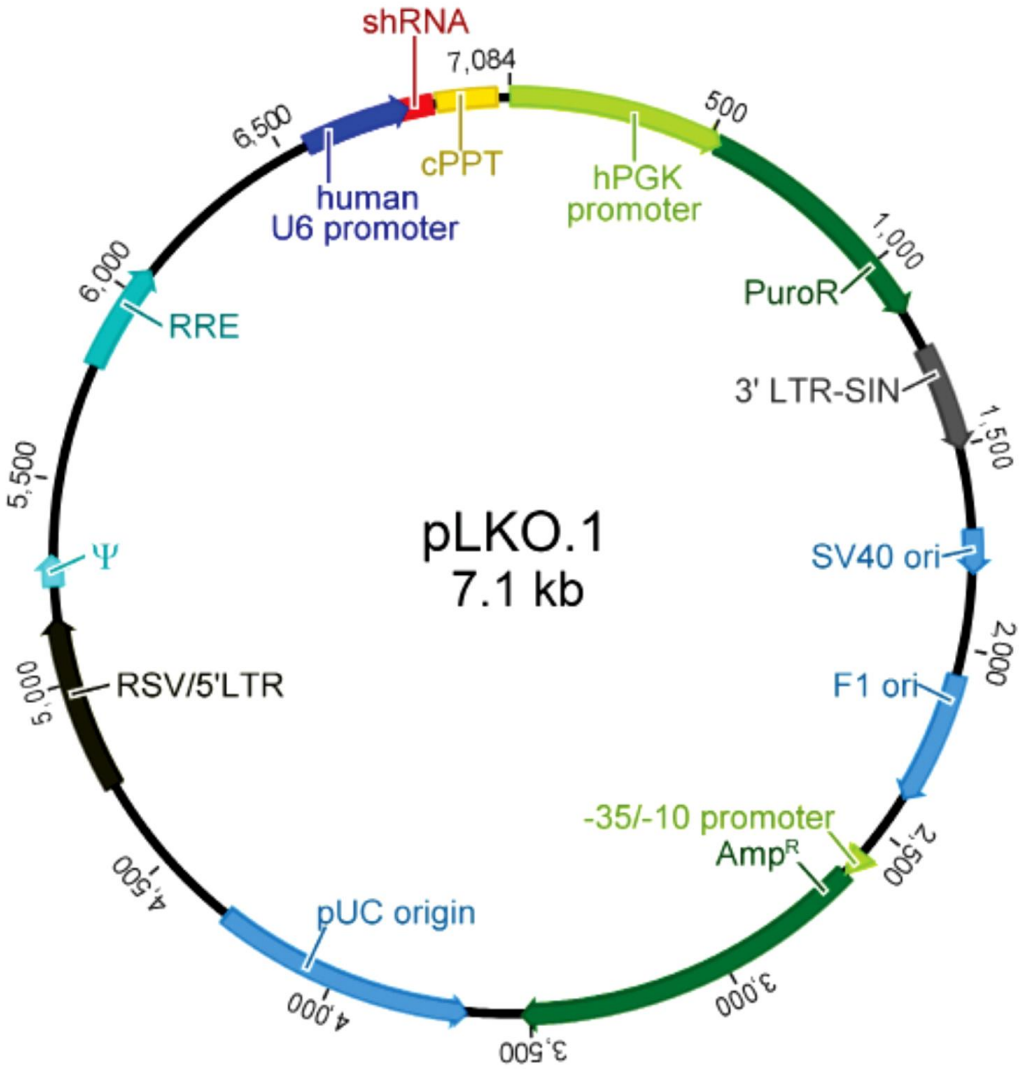
B.2 Vector pSUPER.retro.puro



B.3 Vector pCDNA3-myc



B.4 Vector pLKO.1



C. Anticuerpos

C.1 Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Marca	N° de catálogo	Técnica	Dilución
β-Actina	Sigma	A5441	WB	1:4000
AKT	Cell Signaling	#9272	WB	1:1000
pAKT	Cell Signaling	#9271	WB	1:1000
BAX	Santa Cruz Biotechnology	sc-7480	WB	1:100
BCL2	abcam	ab692	WB	1:500
BCL2L10	Cell Signaling	#3869	WB	1:500
BCL-B (BCL2L10)	Invitrogen	PA5-22190	IHQ	1:300
BCL-XL	Santa Cruz Biotechnology	sc-7195	WB	1:200
BMF	Cell Signaling	#4692	WB	1:200
C3	Santa Cruz Biotechnology	sc-7148	WB	1:800
C3-clivada	Cell Signaling	#9664	WB	1:600
C8	BD Pharmingen	66231A	WB	1:1000
ERK	Cell Signaling	#9102	WB	1:1000
pERK	Cell Signaling	#9106	WB	1:1000
HSP90	Stressgen	SPA830	WB	1:1000
MCL1	Cell Signaling	#5453	WB	1:500
p65	Santa Cruz Biotechnology	sc-109	WB	1:1000
PARP1	Santa Cruz Biotechnology	sc-25780	WB	1:2000
PUMAα/β	Santa Cruz Biotechnology	sc-374223	WB	1:100
ROR1	abcam	ab135669	WB, IHQ	1:1000 (WB), 1:300 (IHQ)
STAT3	Santa Cruz Biotechnology	sc-482	WB	1:1000
pSTAT3	Santa Cruz Biotechnology	sc-8059	WB, IHQ	1:400 (WB), 1:100 (IHQ)
Vinculina	Santa Cruz Biotechnology	sc-25336	WB	1:3000

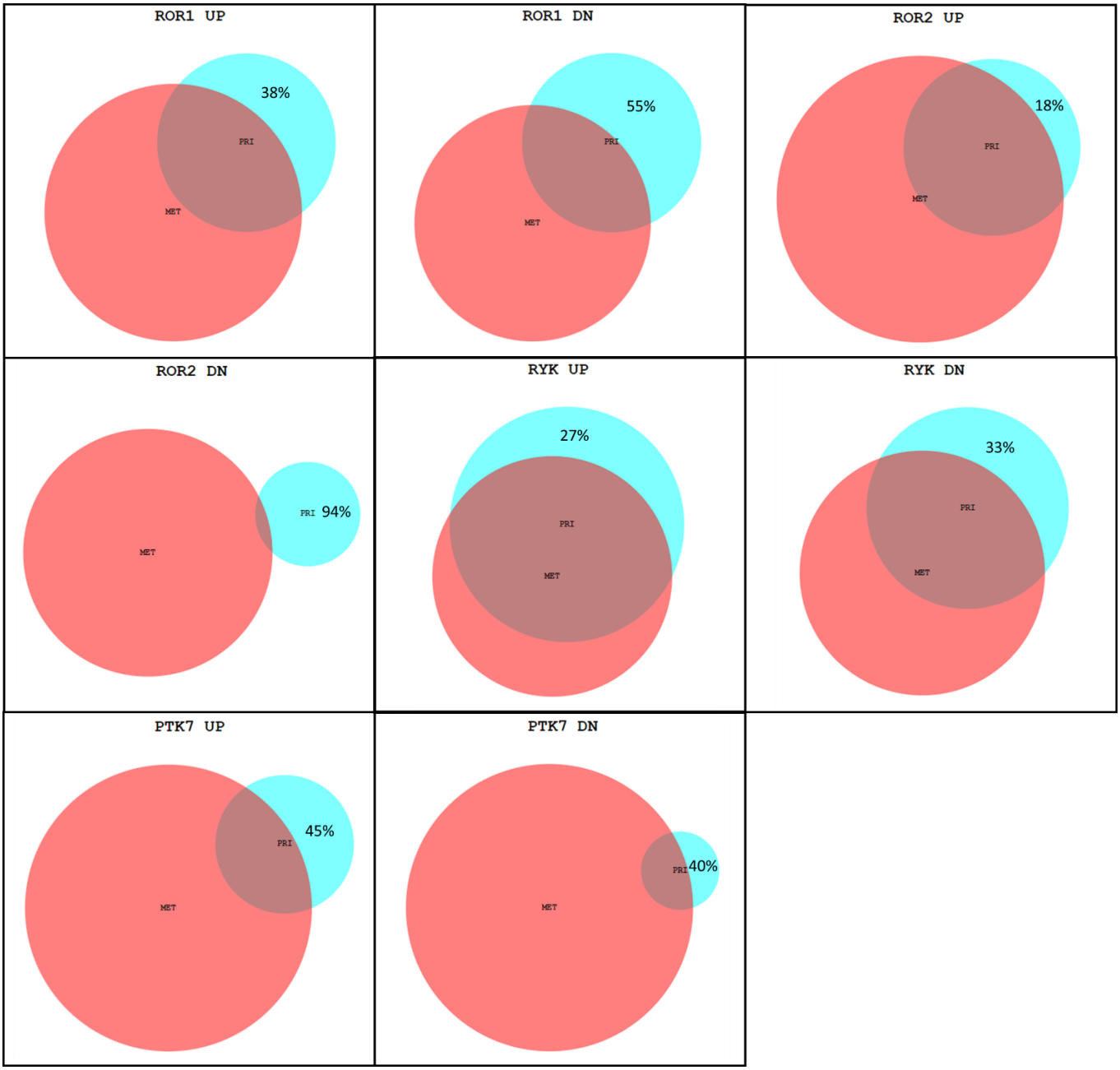
C.2 Anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Marca	N° de catálogo	Técnica	Dilución
Anti-conejo IgG-HRP	BioRad	170-6515	WB	1:3000
Anti-ratón IgG-HRP	BioRad	170-6516	WB	1:3000

D. Resultados suplementarios del Análisis Bioinformático

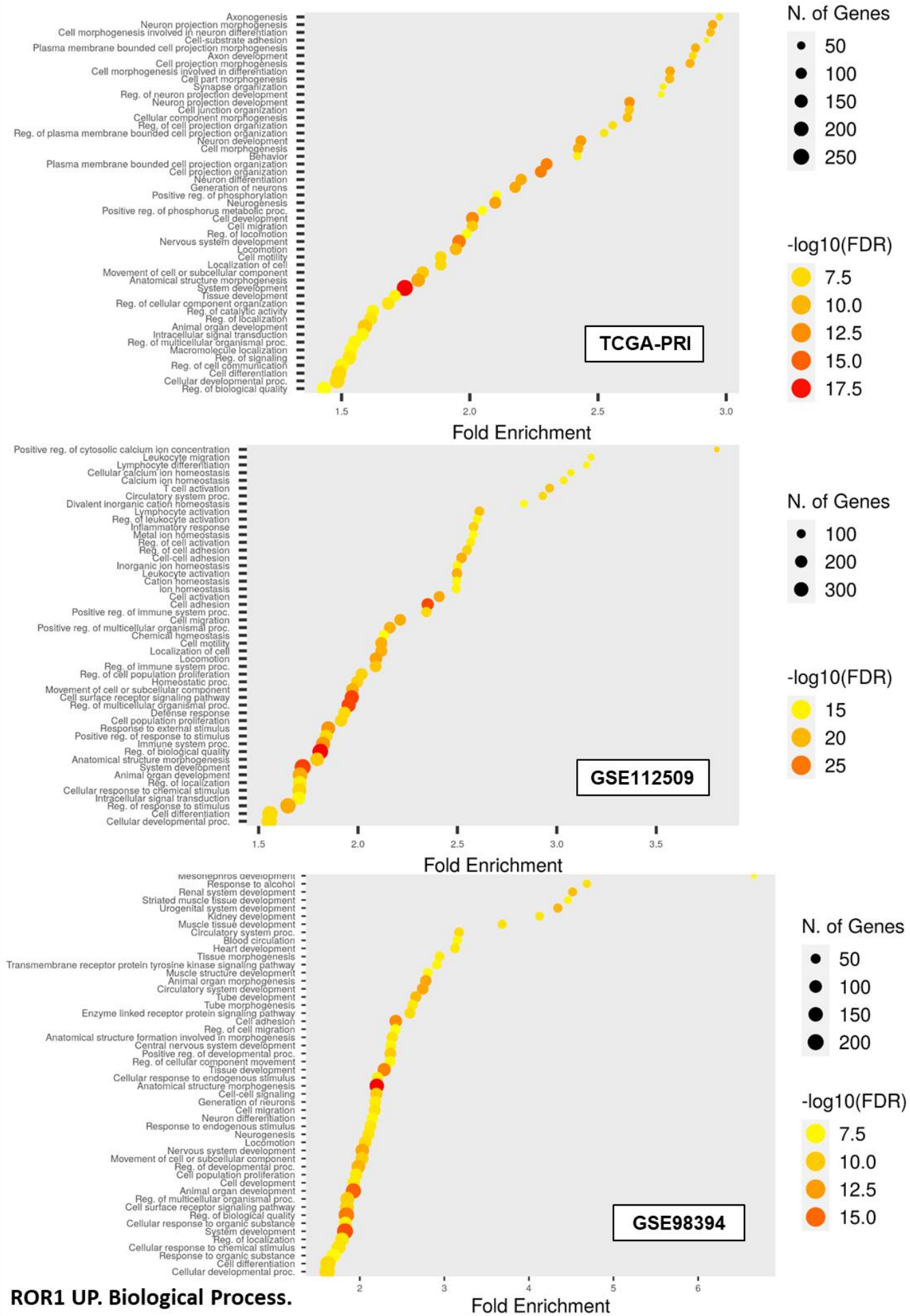
D.1 Gráficos de Venn de los DEGs UP y DN de TCGA-PRI vs DEGs TCGA-MET para ROR1, ROR2, RYK y PTK7

En esta sección se muestran los gráficos de Venn proporcionales para los DEGs UP y DN de los 4 receptores RTKs de WNT5A, ROR1, ROR2, RYK y PTK7. En cada caso se detalla el % de DEGs "no compartidos" para melanoma primario. En rojo PRI y en magenta MET. DEGs: genes diferencialmente expresados, UP: DEGs de alta expresión, DN: DEGs de baja expresión, PRI: primario, MET: metastásico.

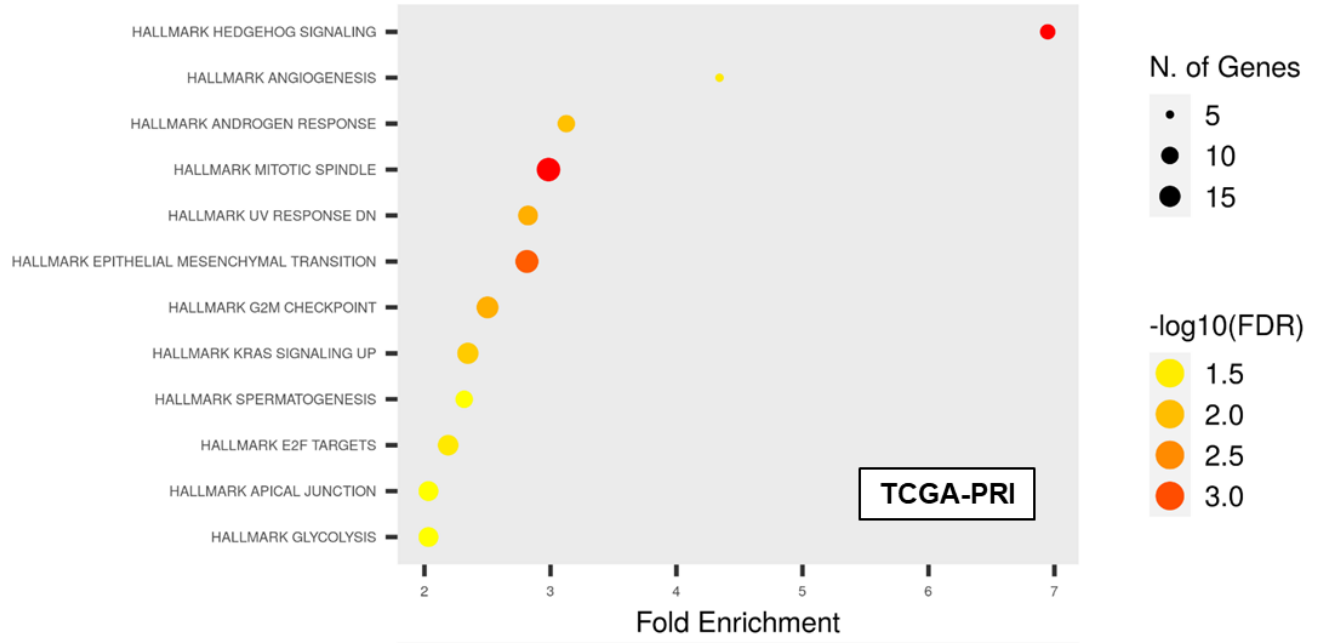


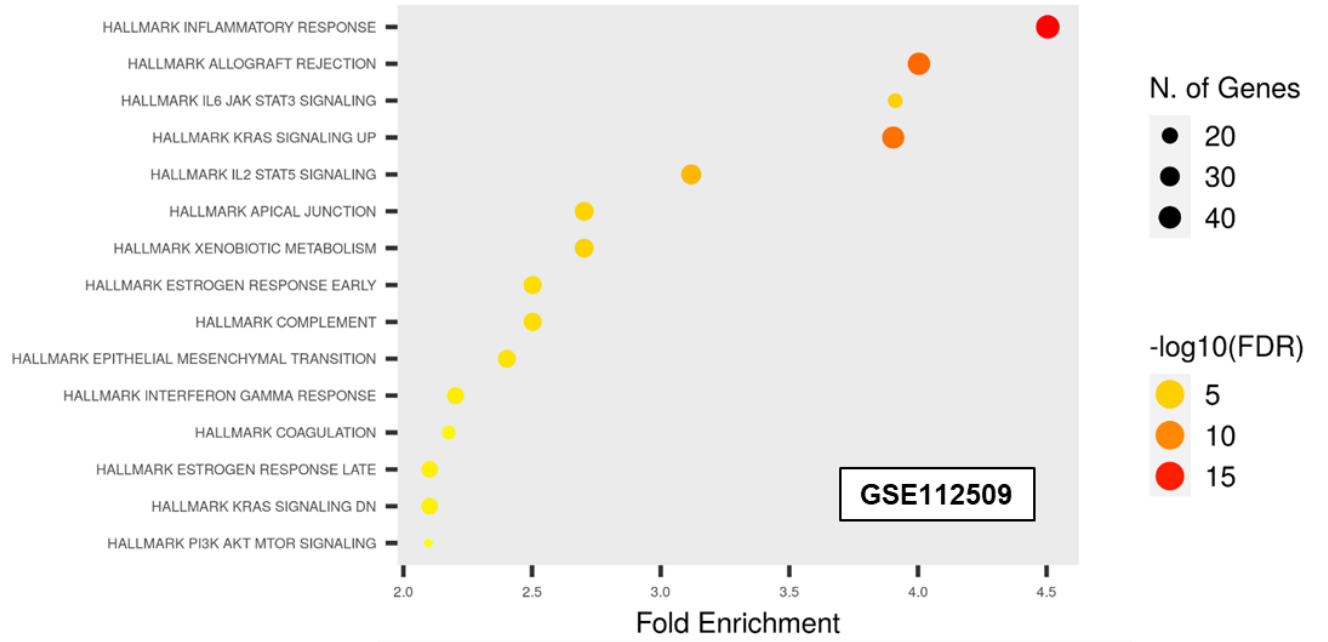
D.2 Enriquecimientos en las categorías “Biological Process”, “Hallmark” y “Oncogenic MSigDb” para ROR1, ROR2, RYK y PTK7 de datasets de pacientes con melanoma primario.

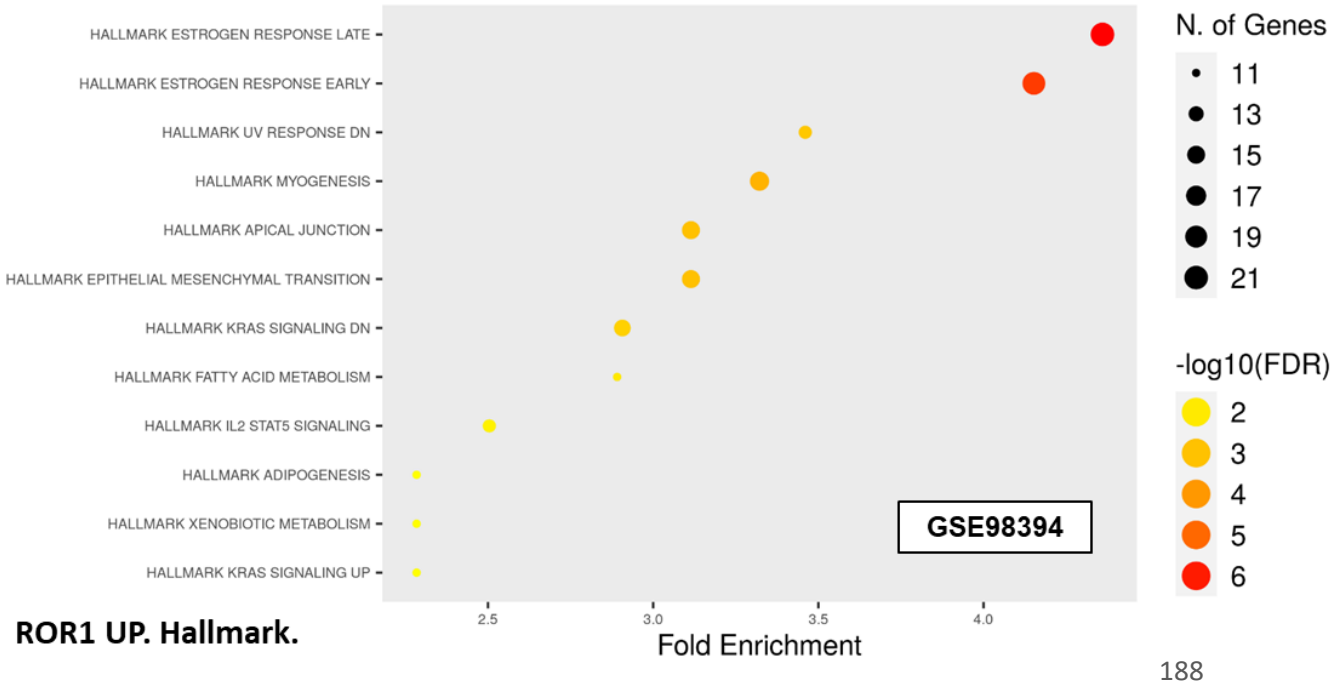
Se representan los gráficos de burbujas obtenidos a partir de los DEGs en el ShinyGo 0.80. DEGs: genes diferencialmente expresados, UP: DEGs de alta expresión, DN: DEGs de baja expresión, PRI: primario.



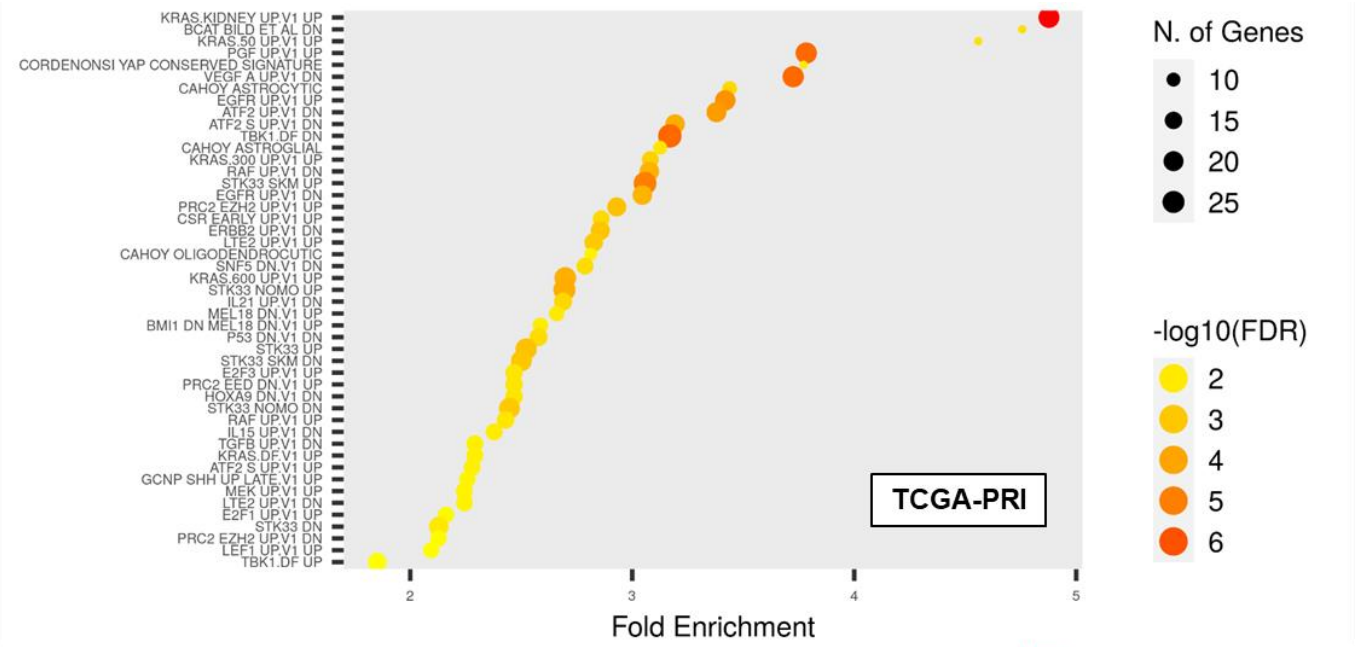
ROR1 UP. Biological Process.

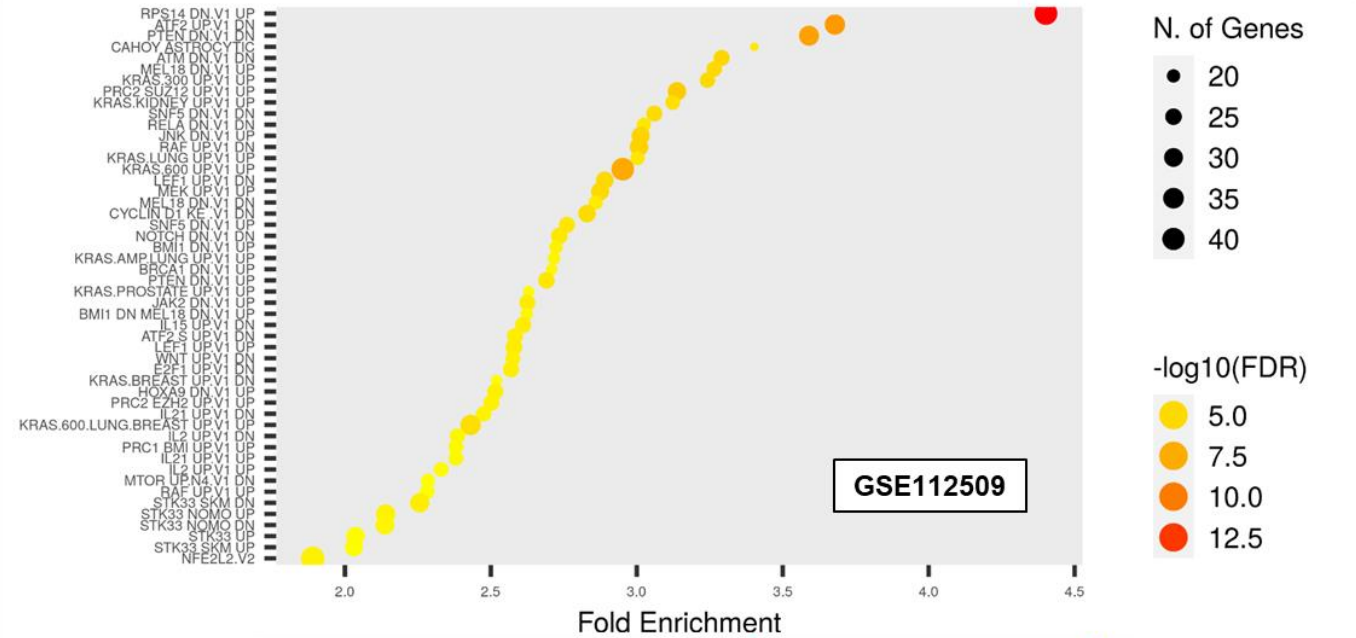


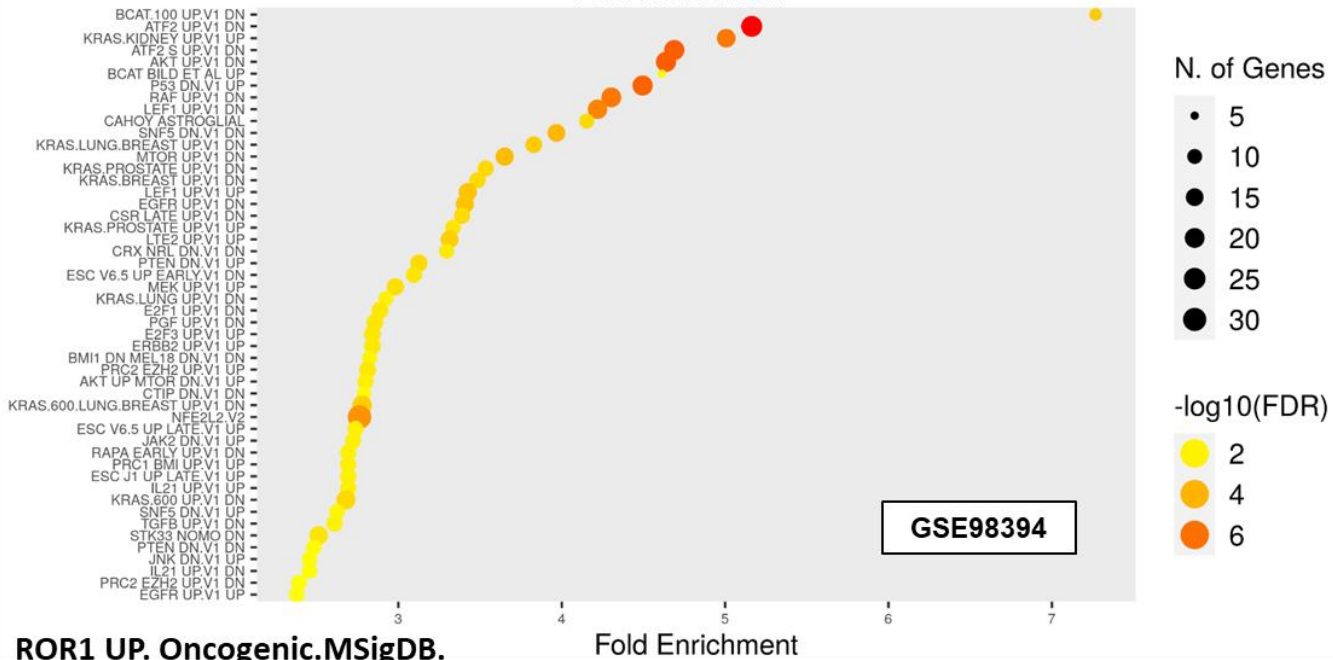




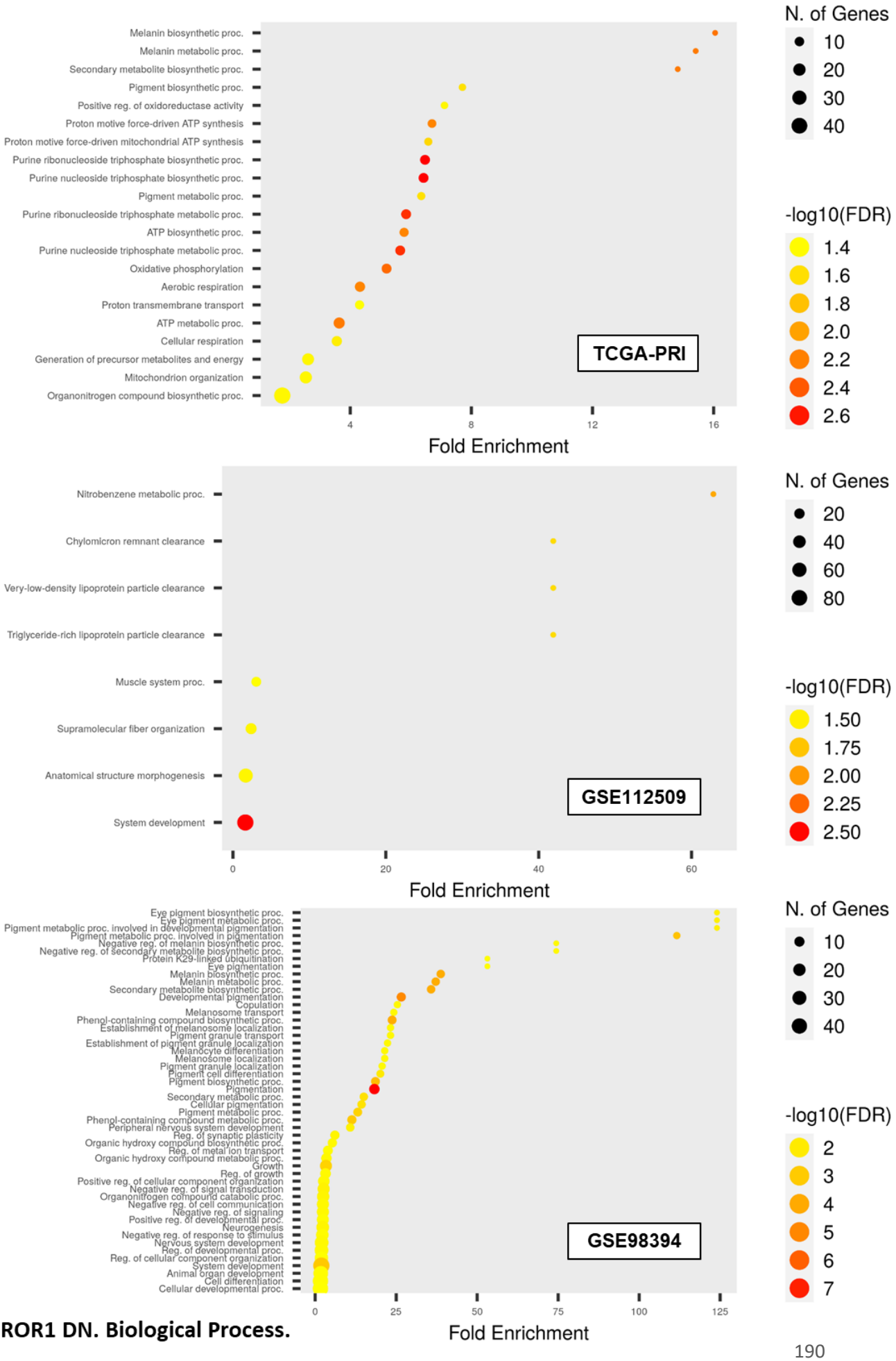
ROR1 UP. Hallmark.



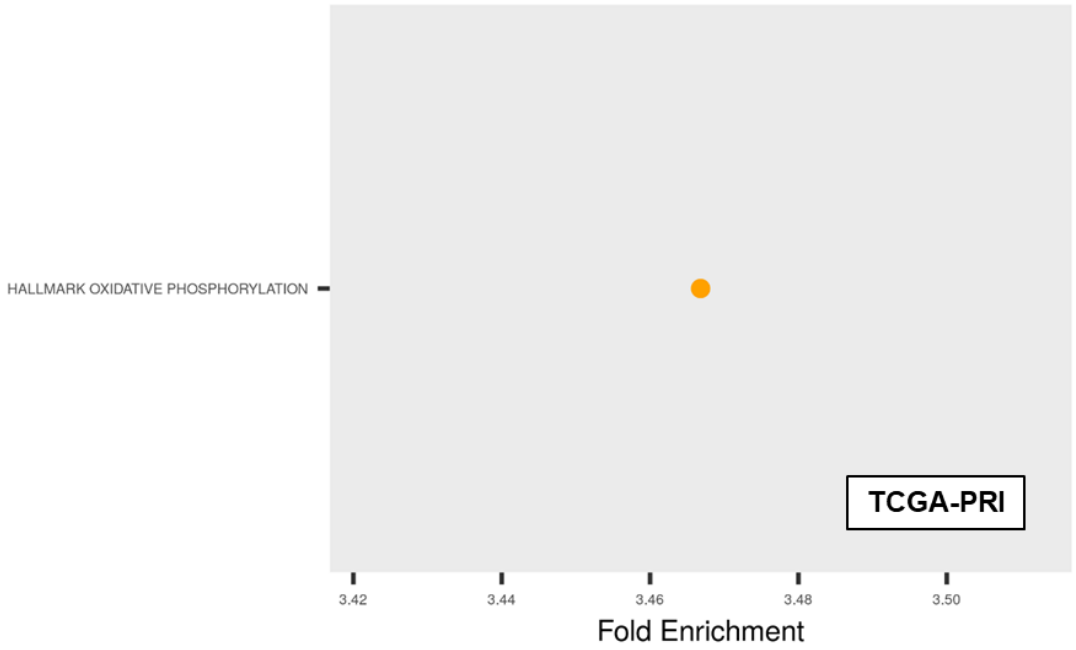


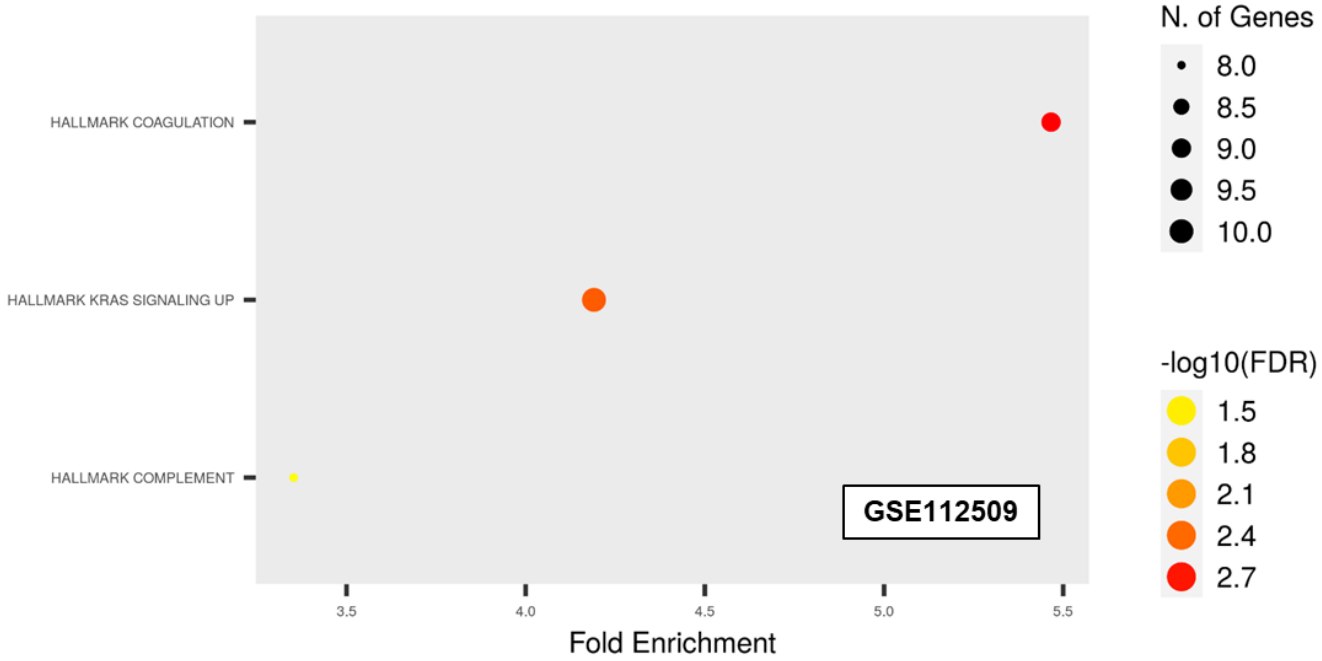


ROR1 UP. Oncogenic.MSigDB.



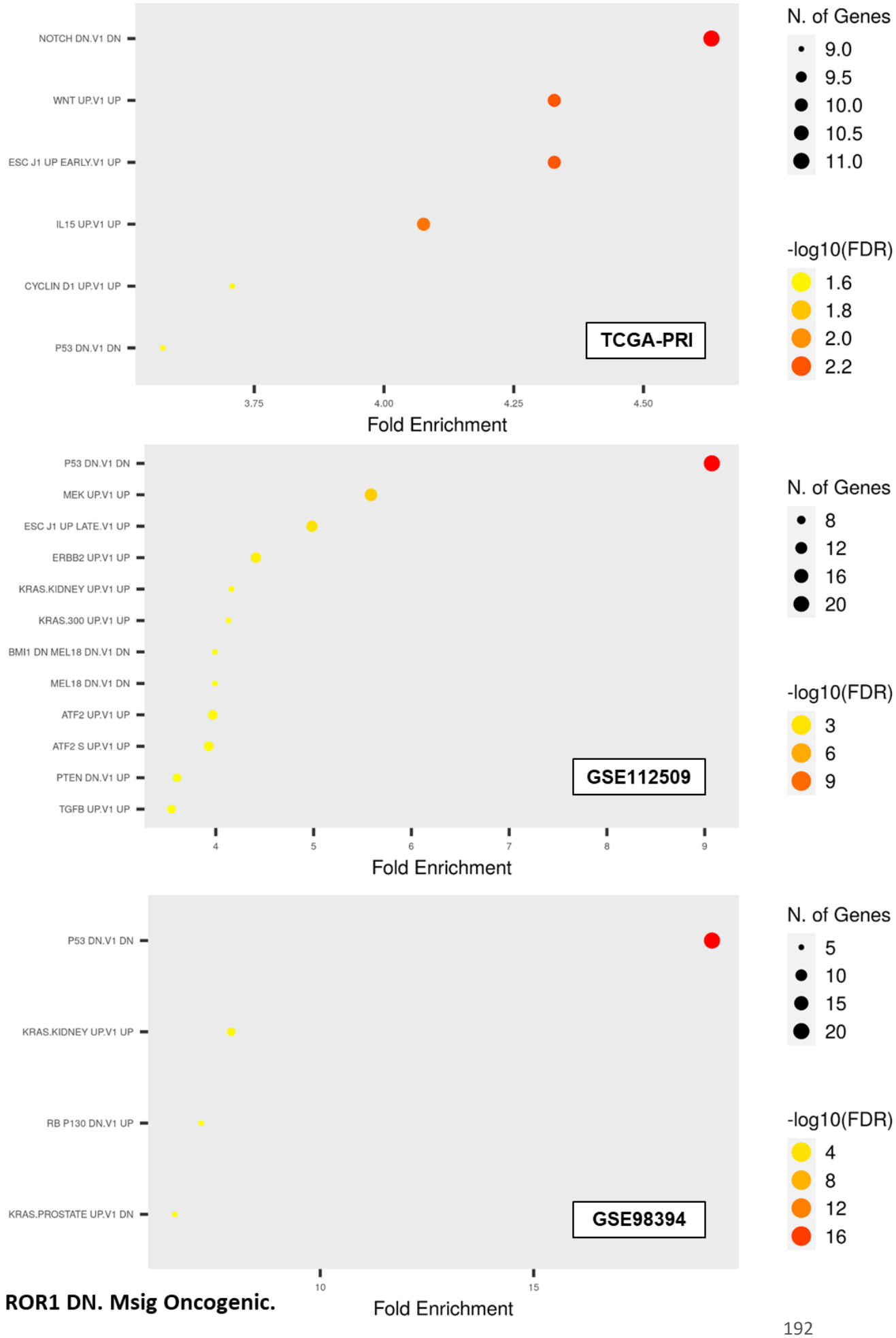
ROR1 DN. Biological Process.



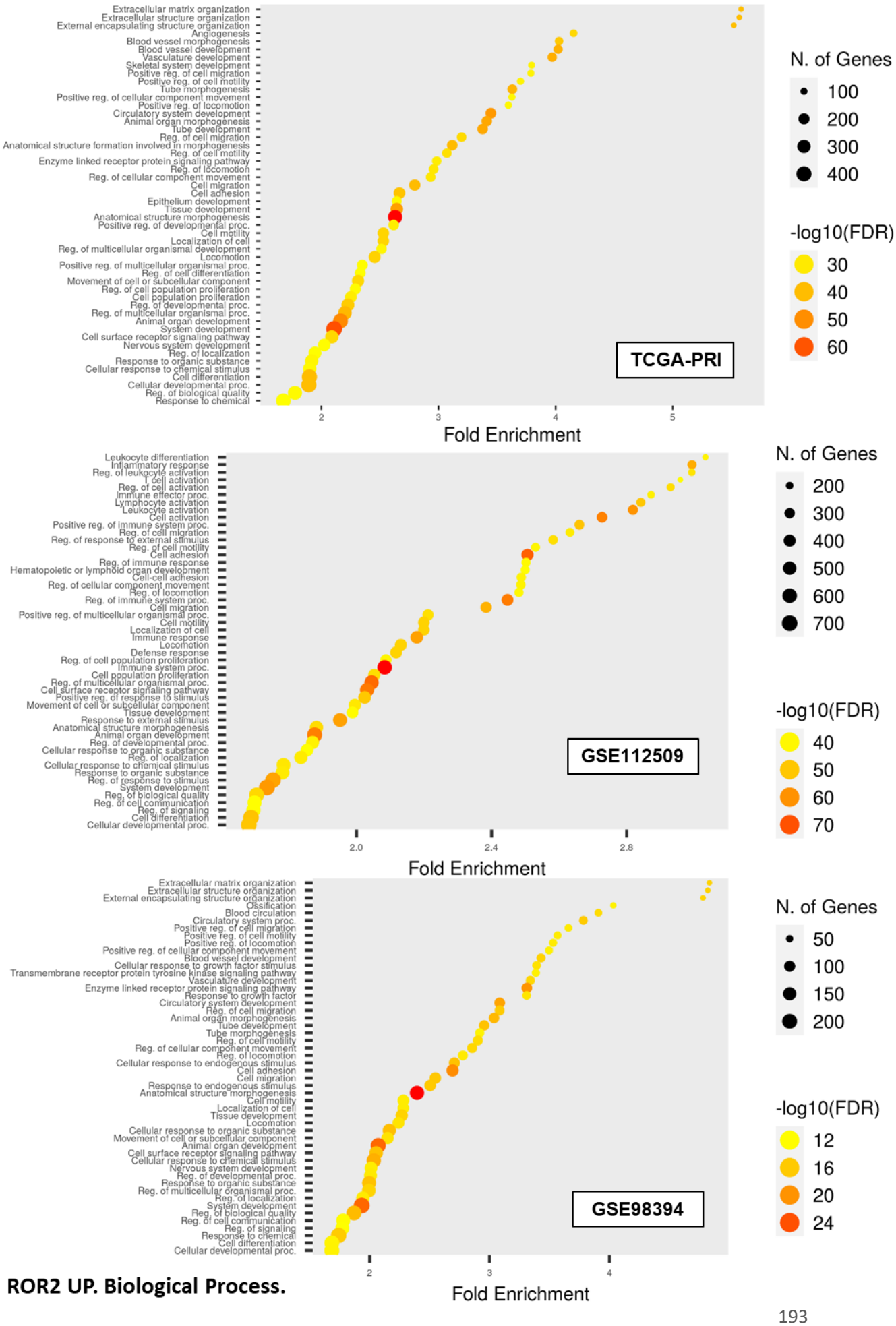


No enrichment found. **GSE98394**

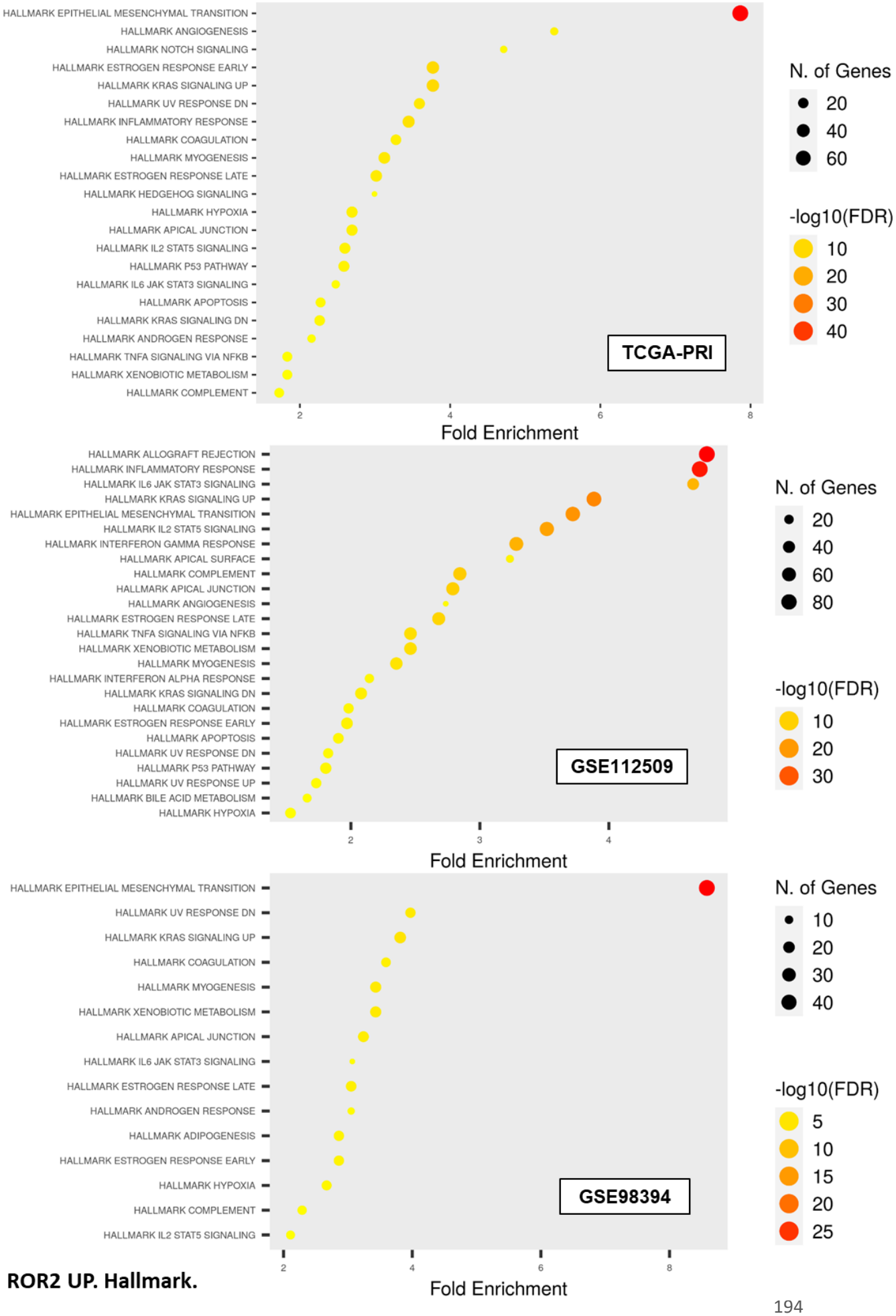
ROR1 DN. Hallmark.



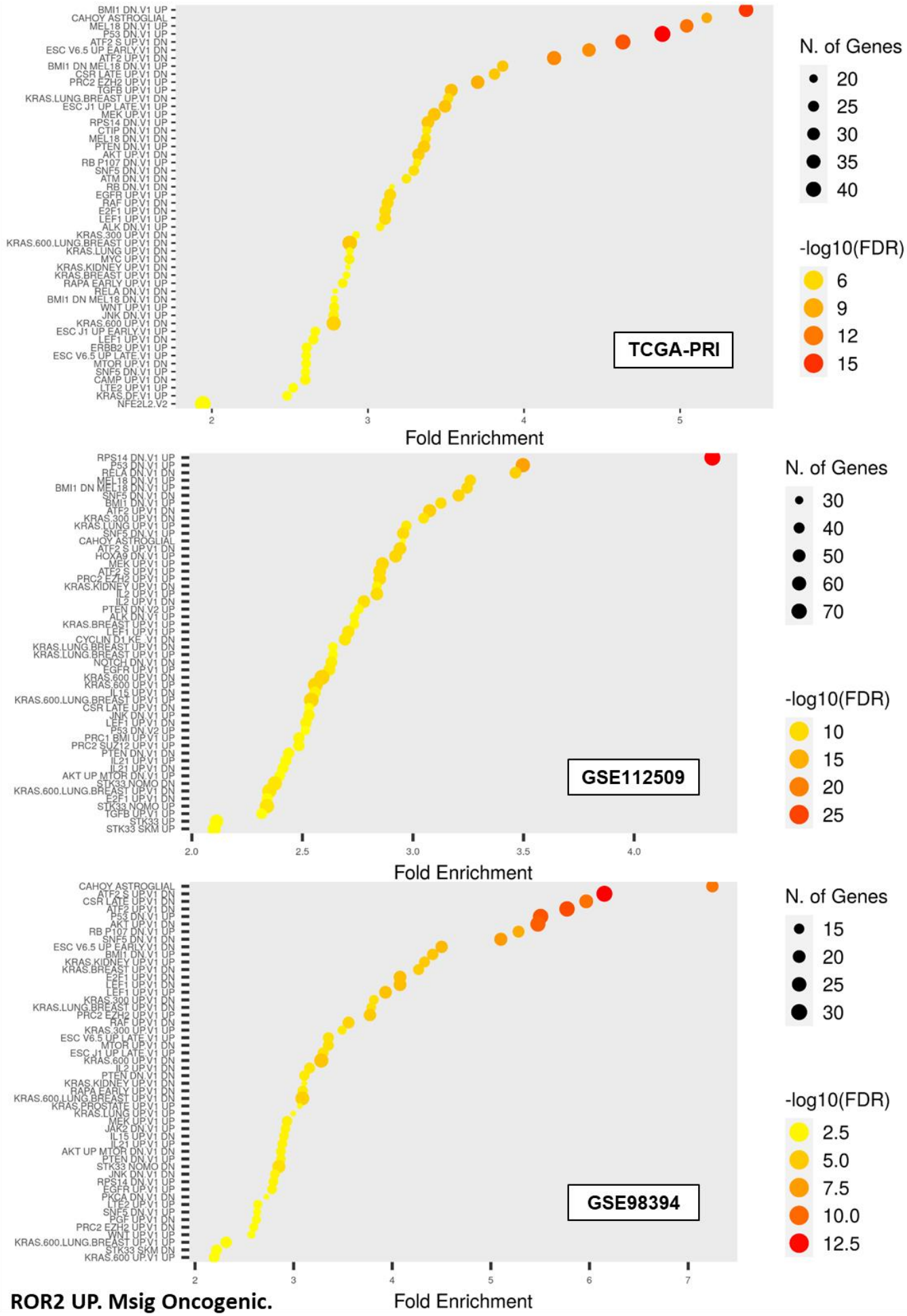
ROR1 DN. Msig Oncogenic.



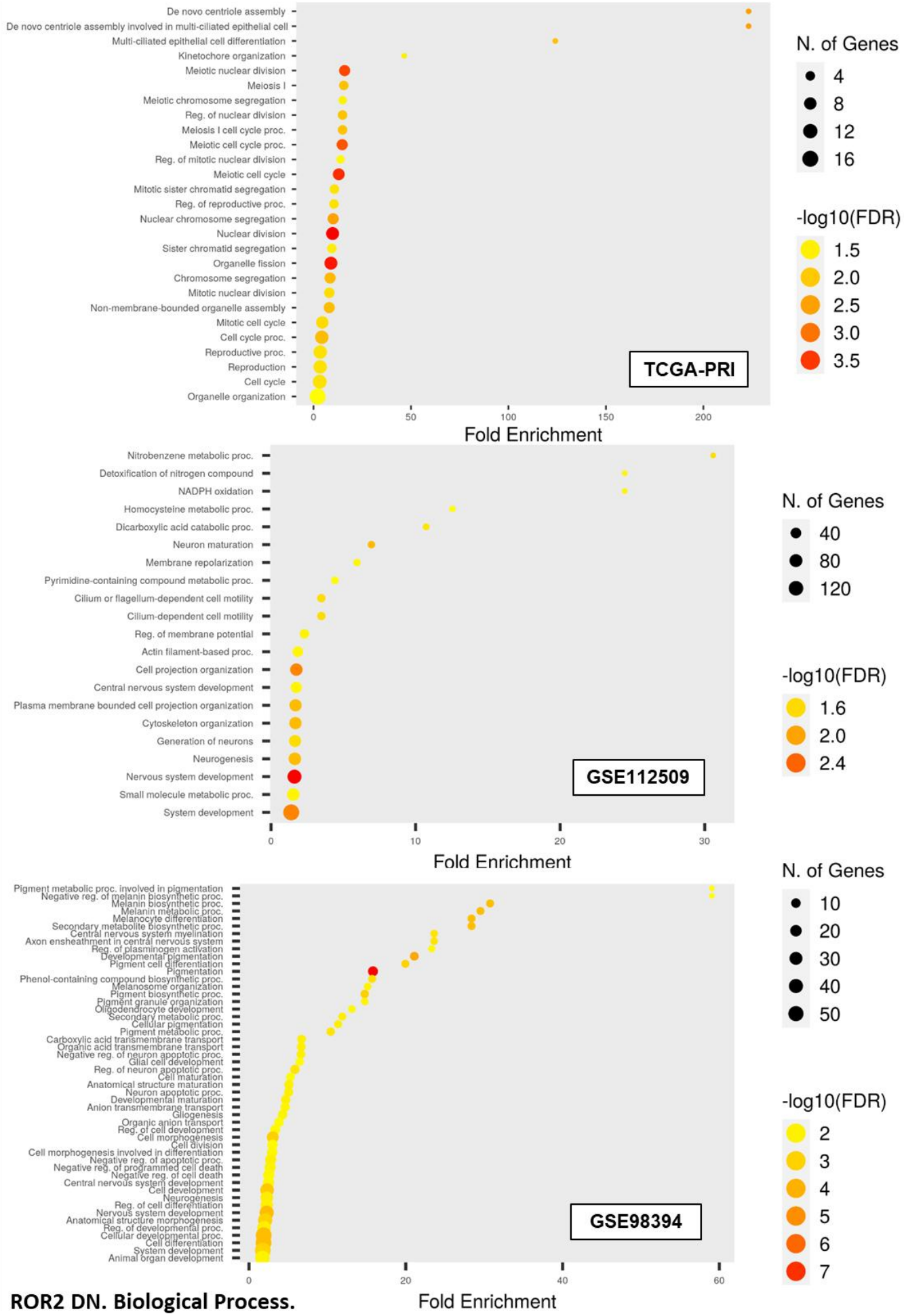
ROR2 UP. Biological Process.



ROR2 UP. Hallmark.



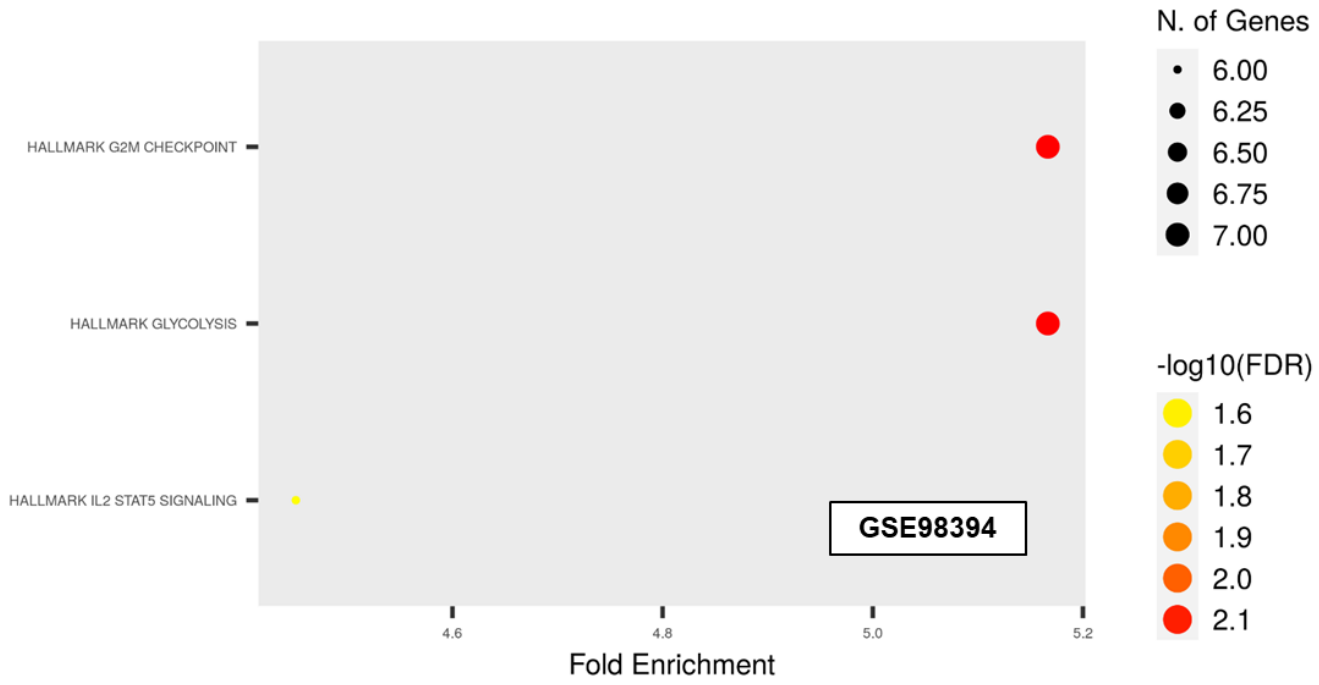
ROR2 UP. Msig Oncogenic.



ROR2 DN. Biological Process.

No enrichment found. **TCGA-PRI**

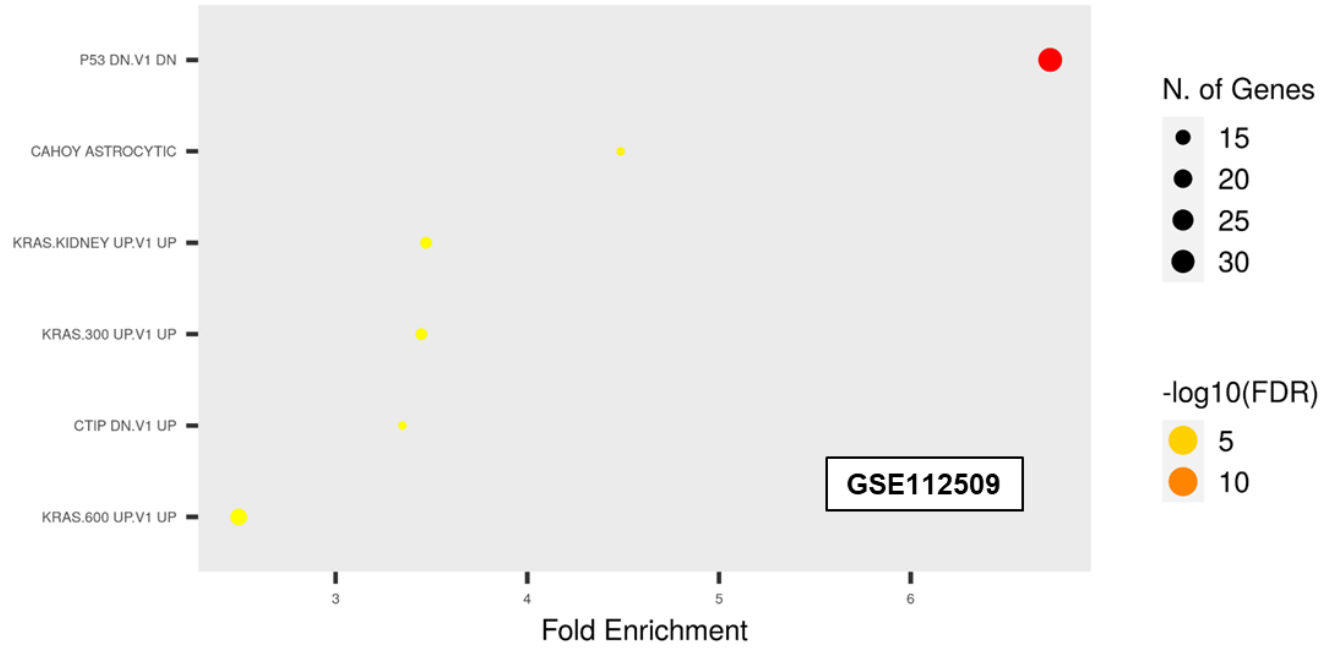
No enrichment found. **GSE112509**

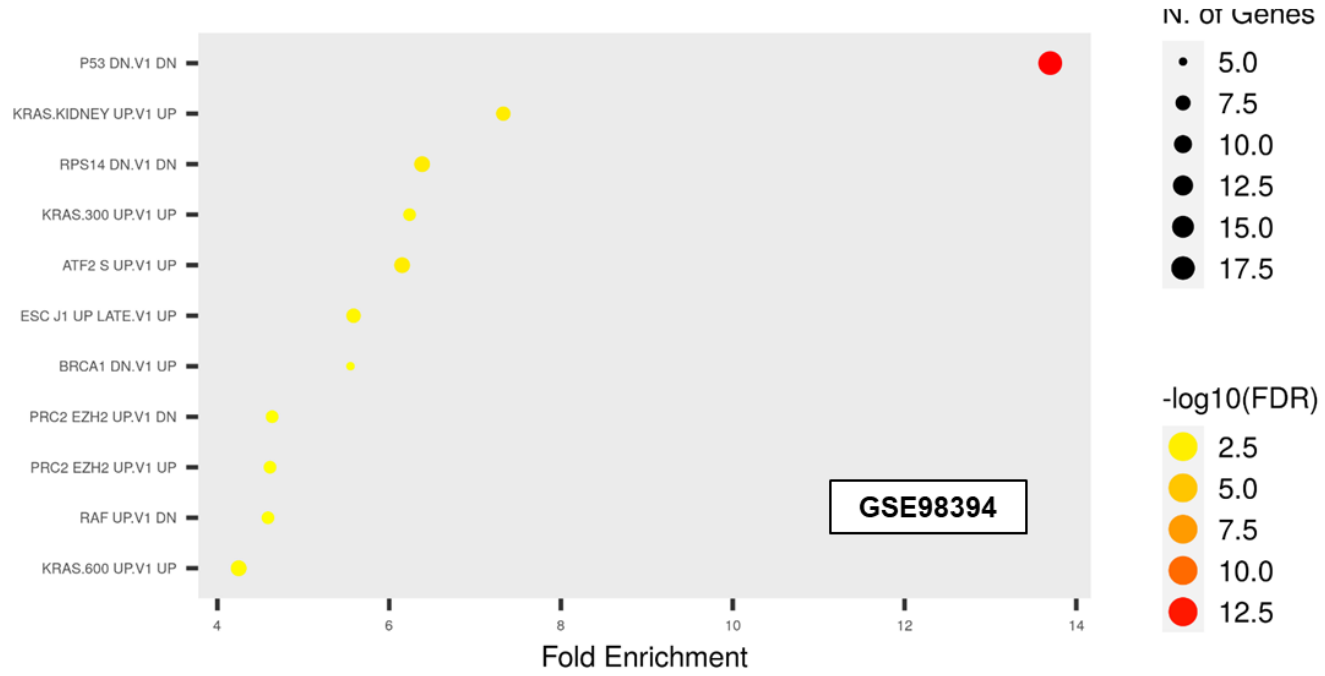


ROR2 DN. Hallmark.

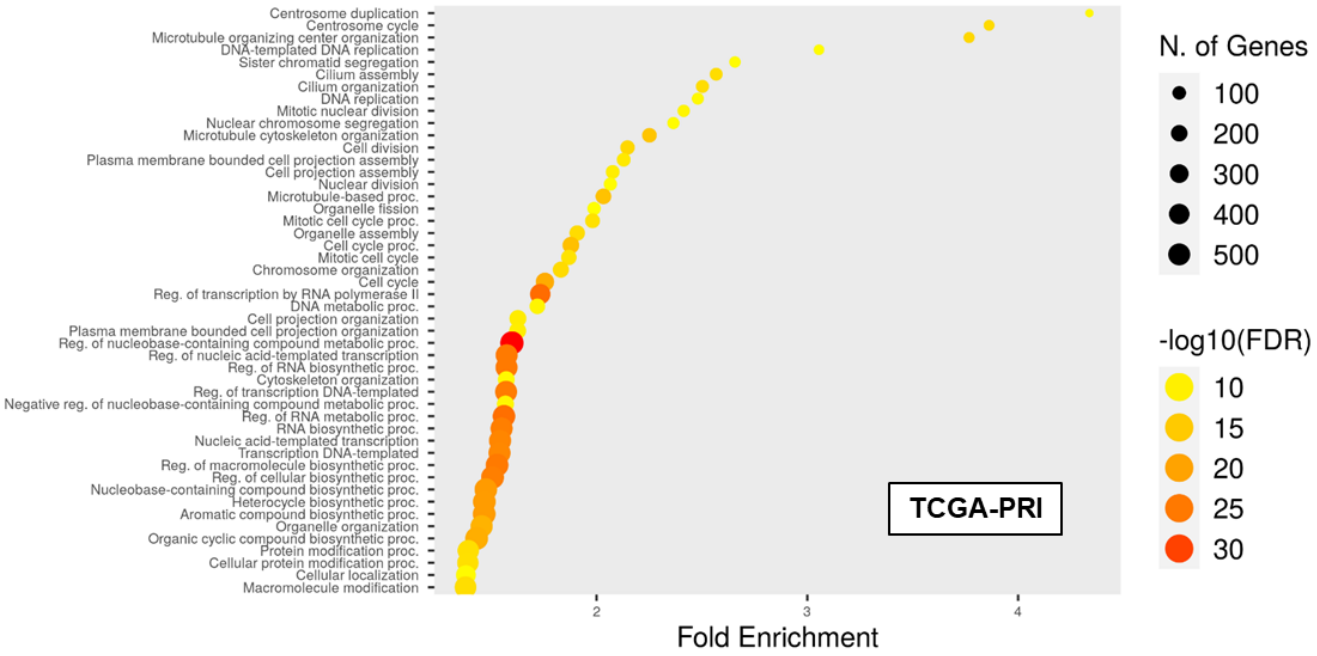
No enrichment found.

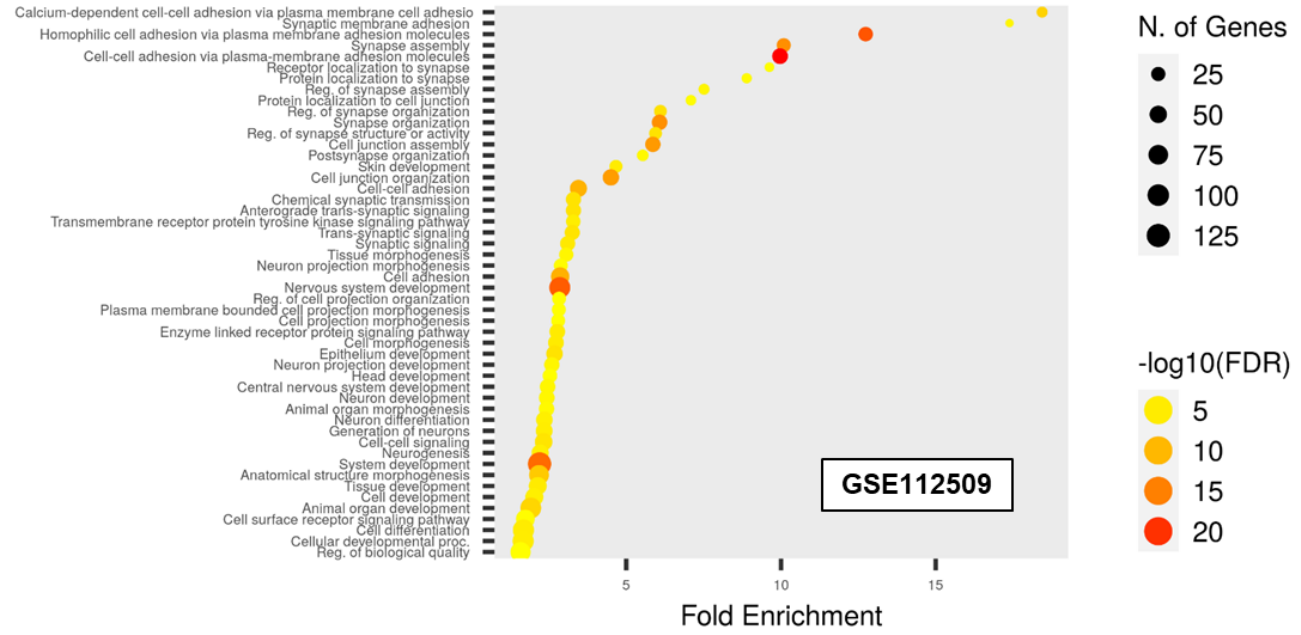
TCGA-PRI





ROR2 DN. Msig Oncogenic.



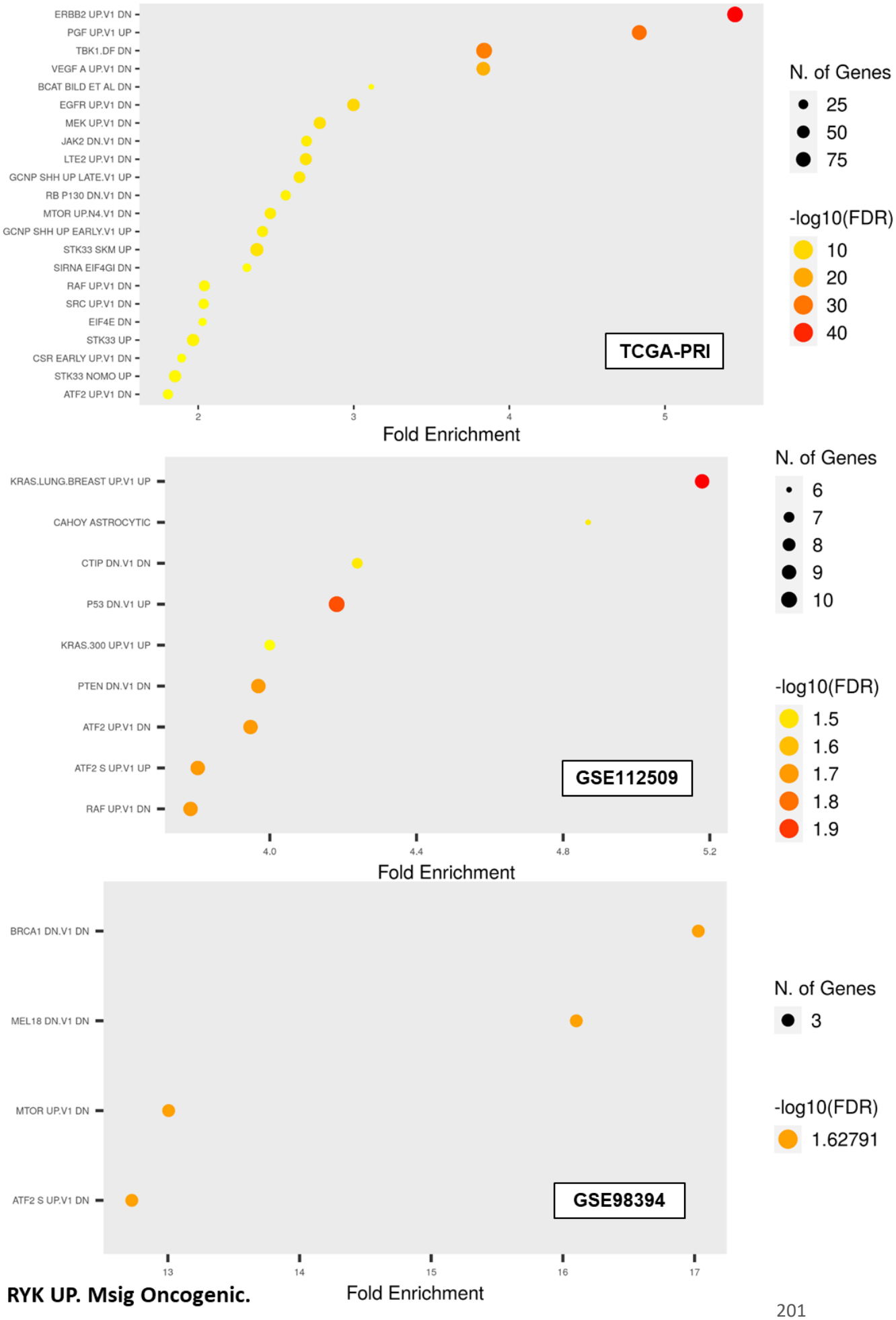




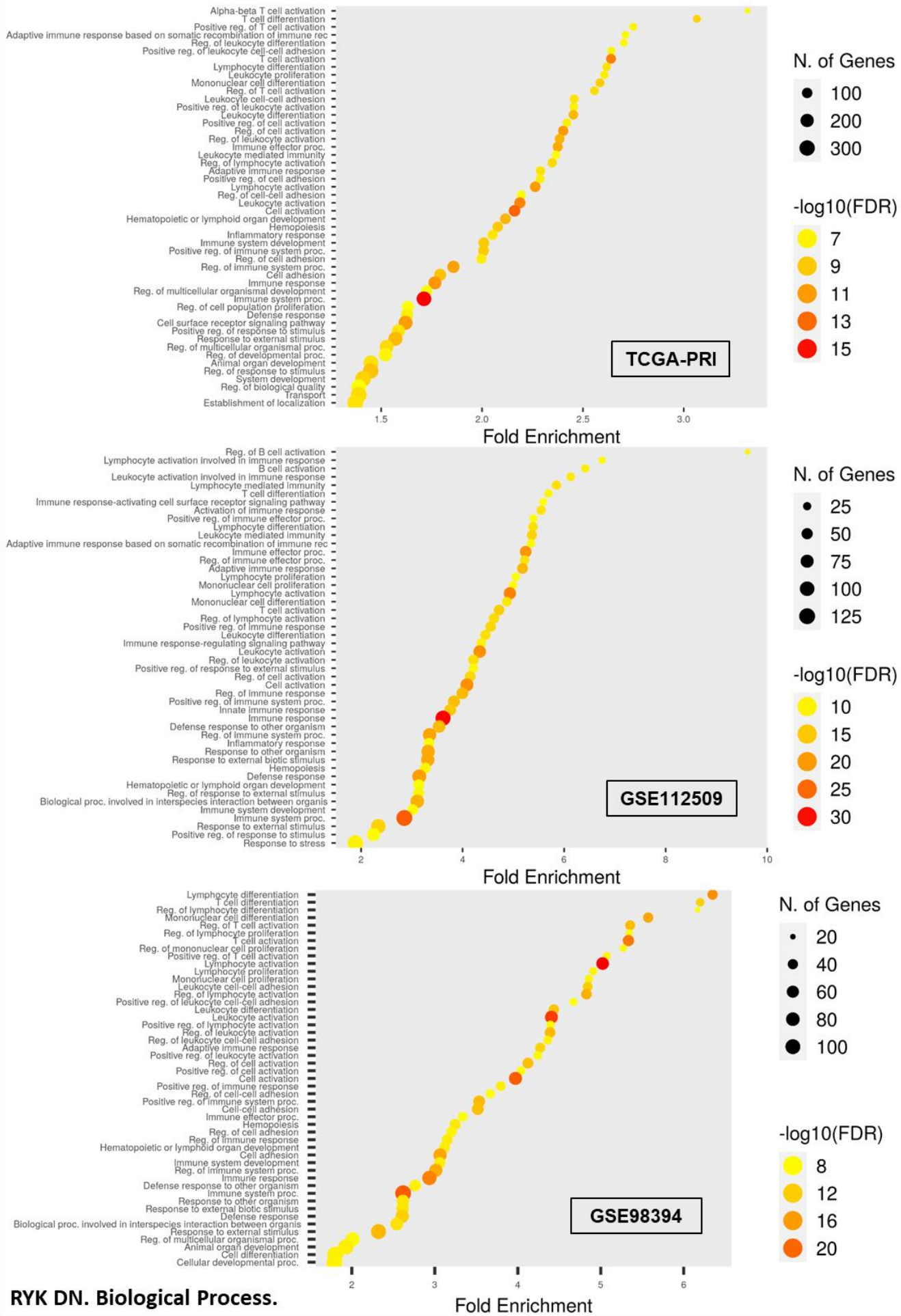
RYK UP. Biological Process.



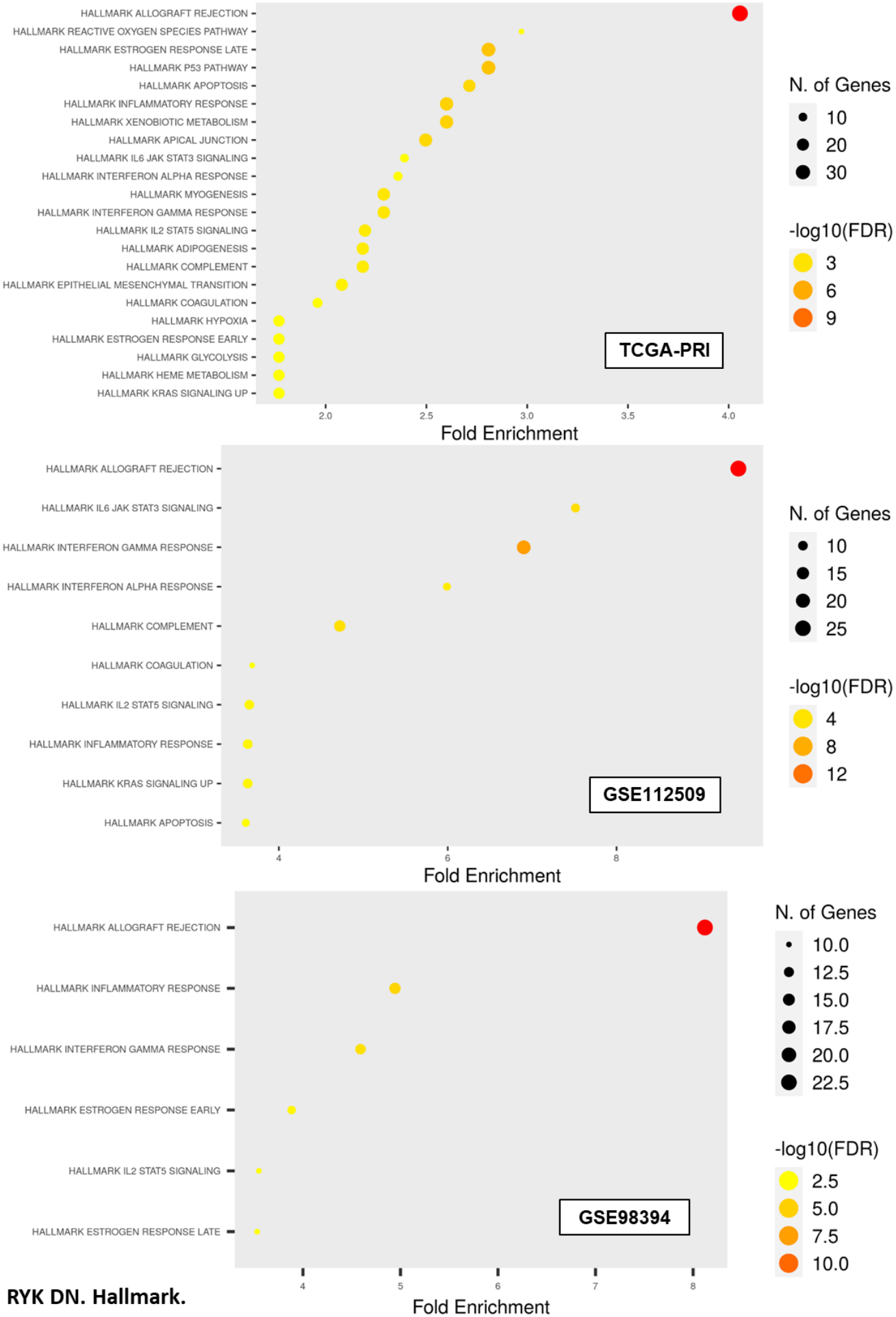
RYK UP. Hallmark.



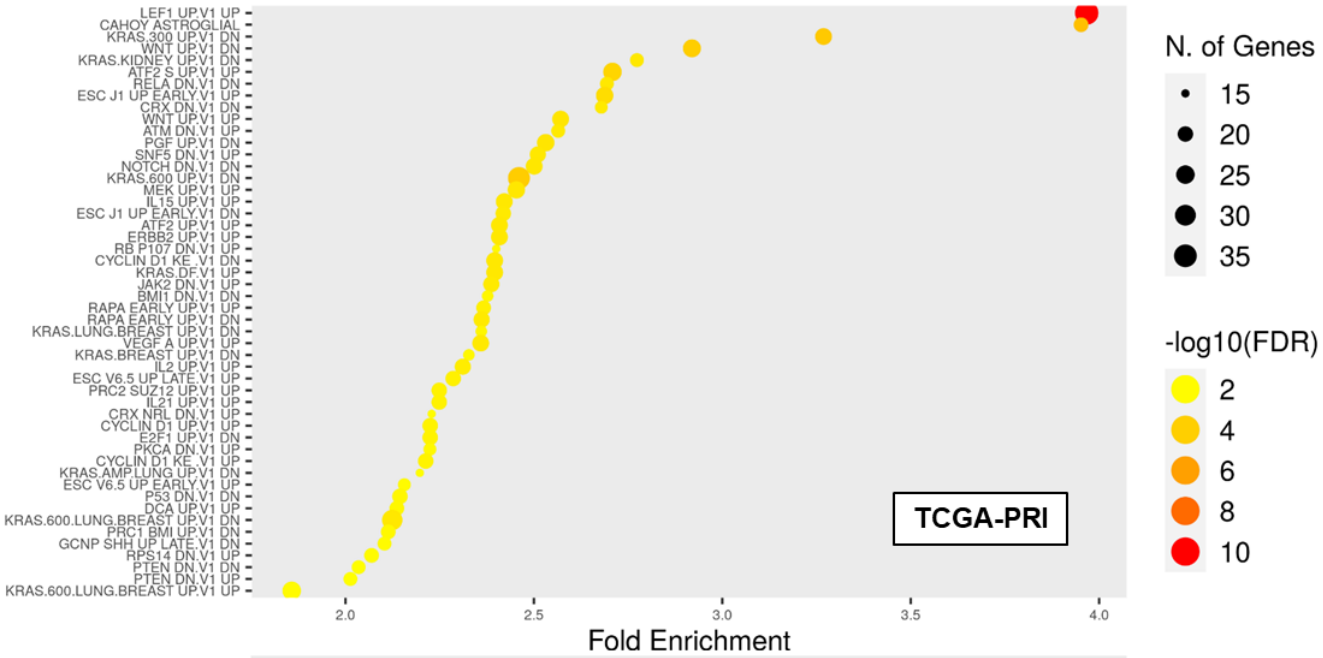
RYK UP. Msig Oncogenic.

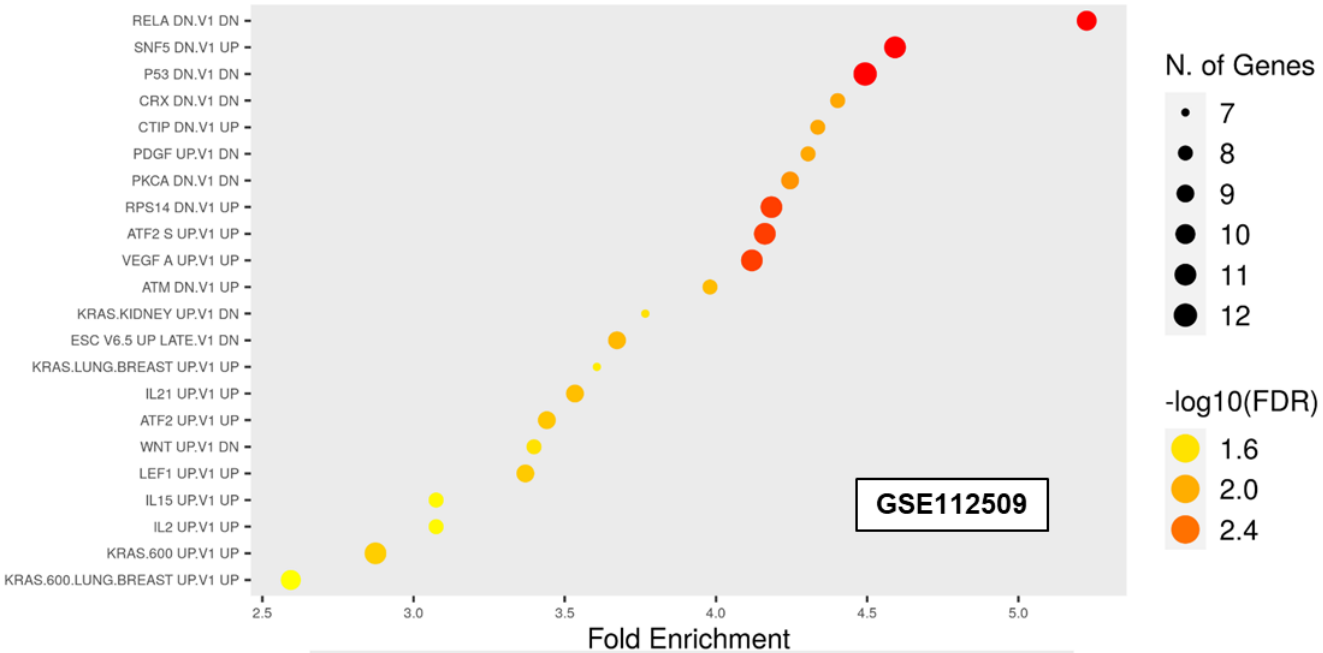


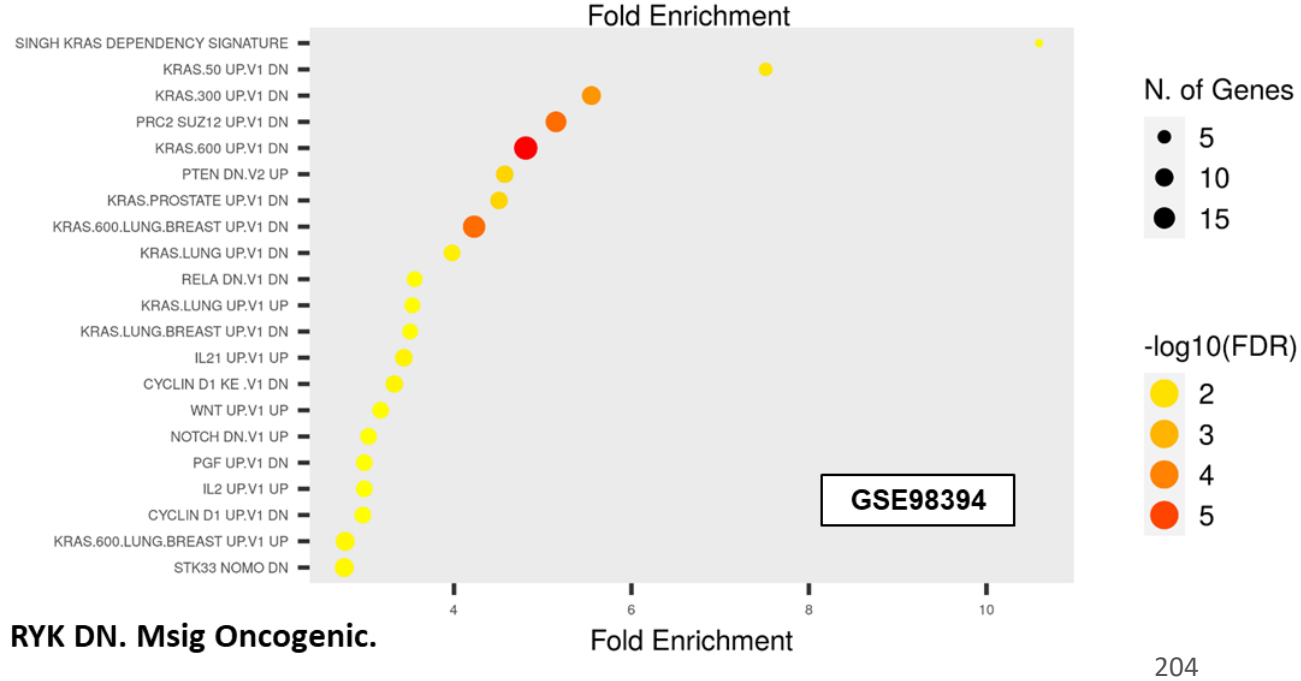
RYK DN. Biological Process.



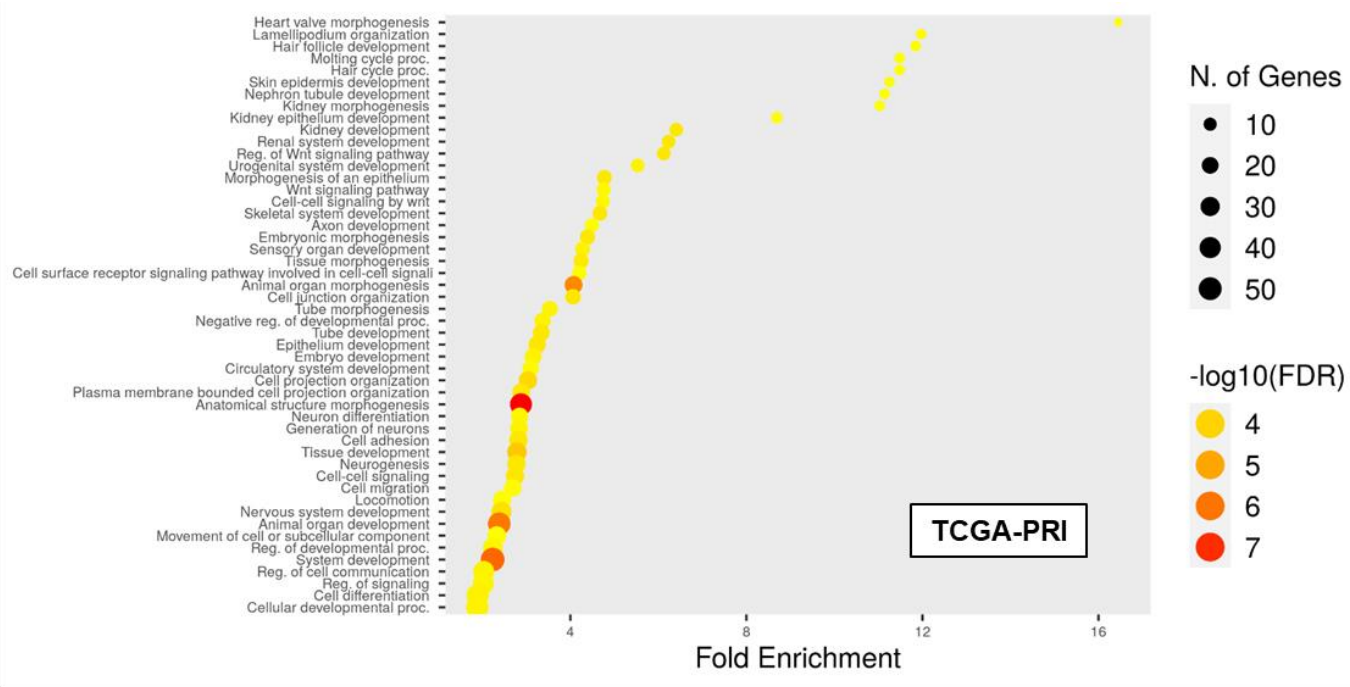
RYK DN. Hallmark.

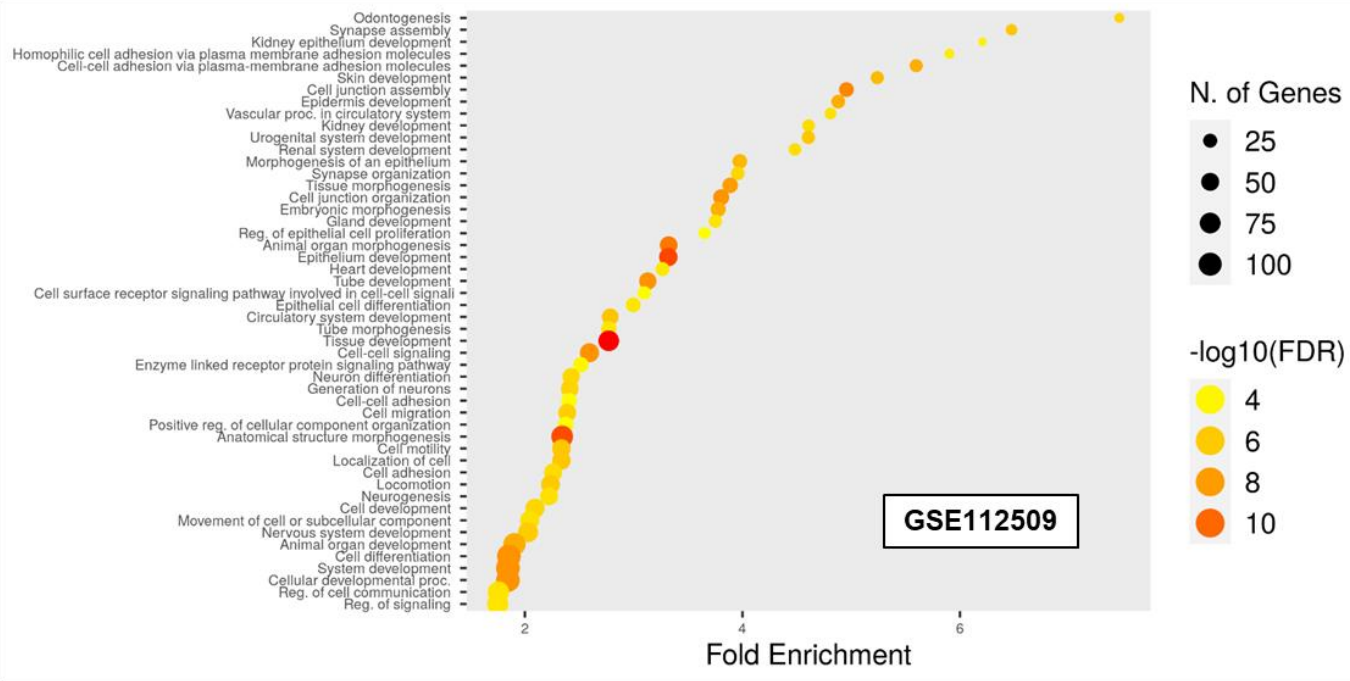






RYK DN. Msig Oncogenic.

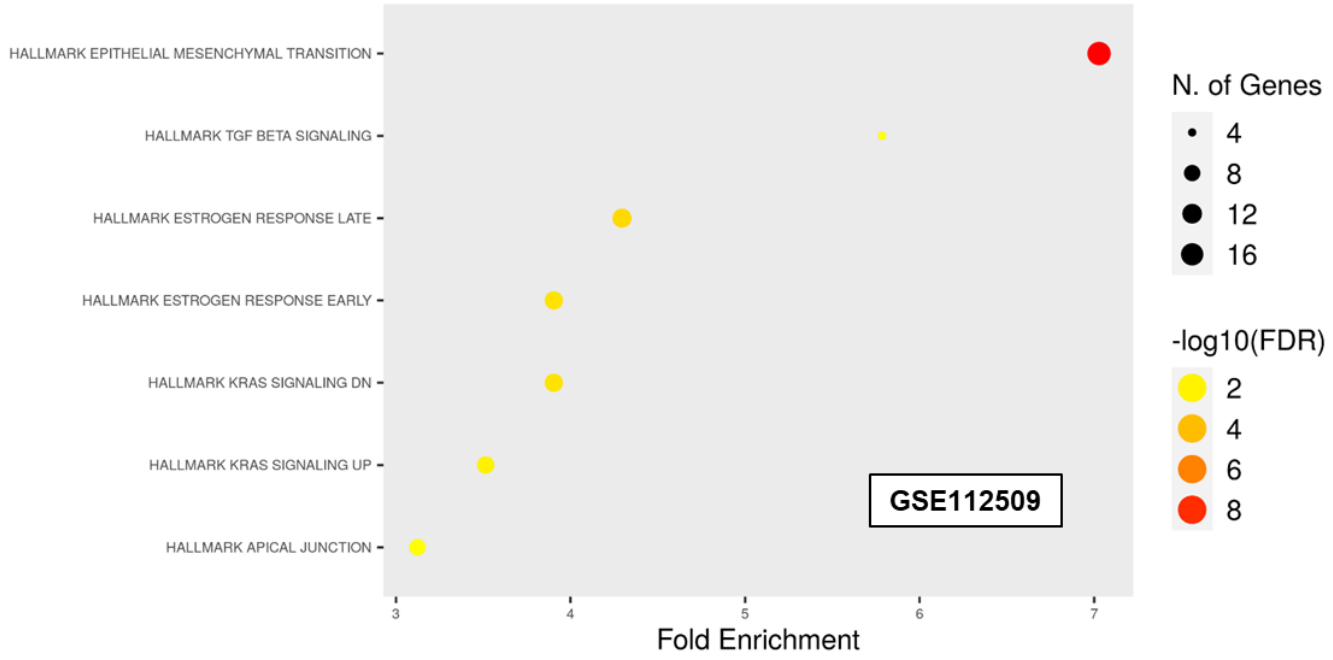




No enrichment found. **GSE98394**

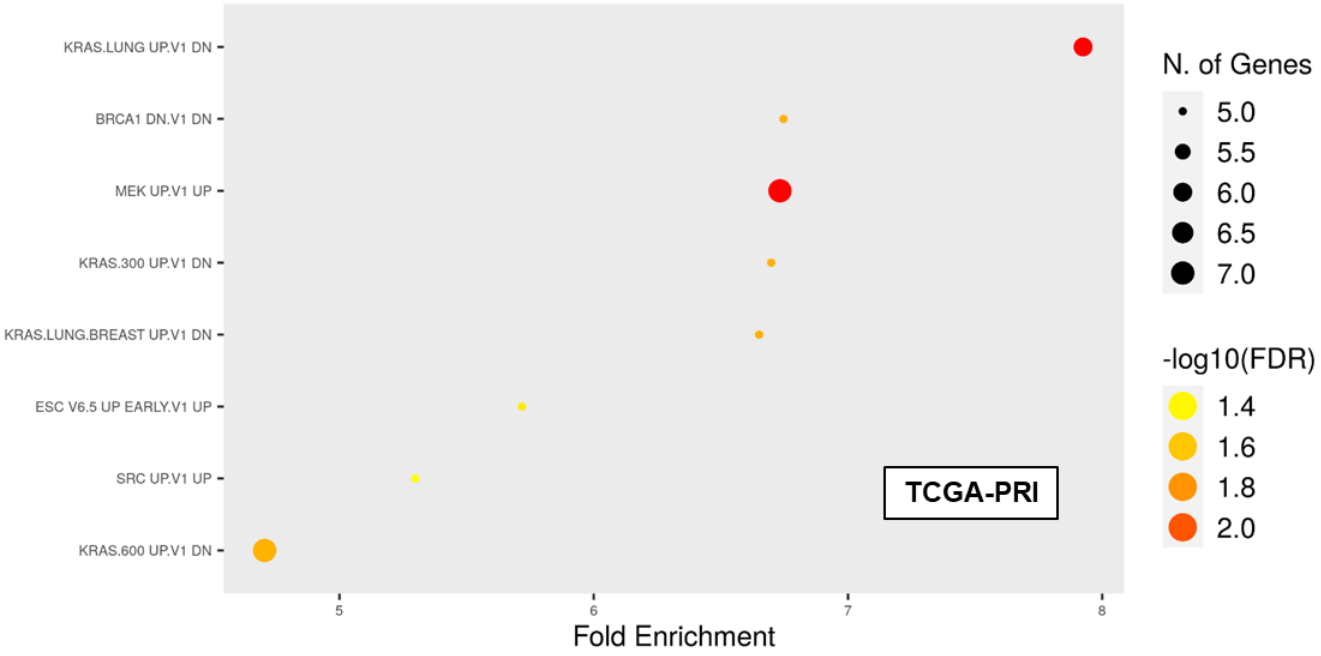
PTK7 UP. Biological Process.

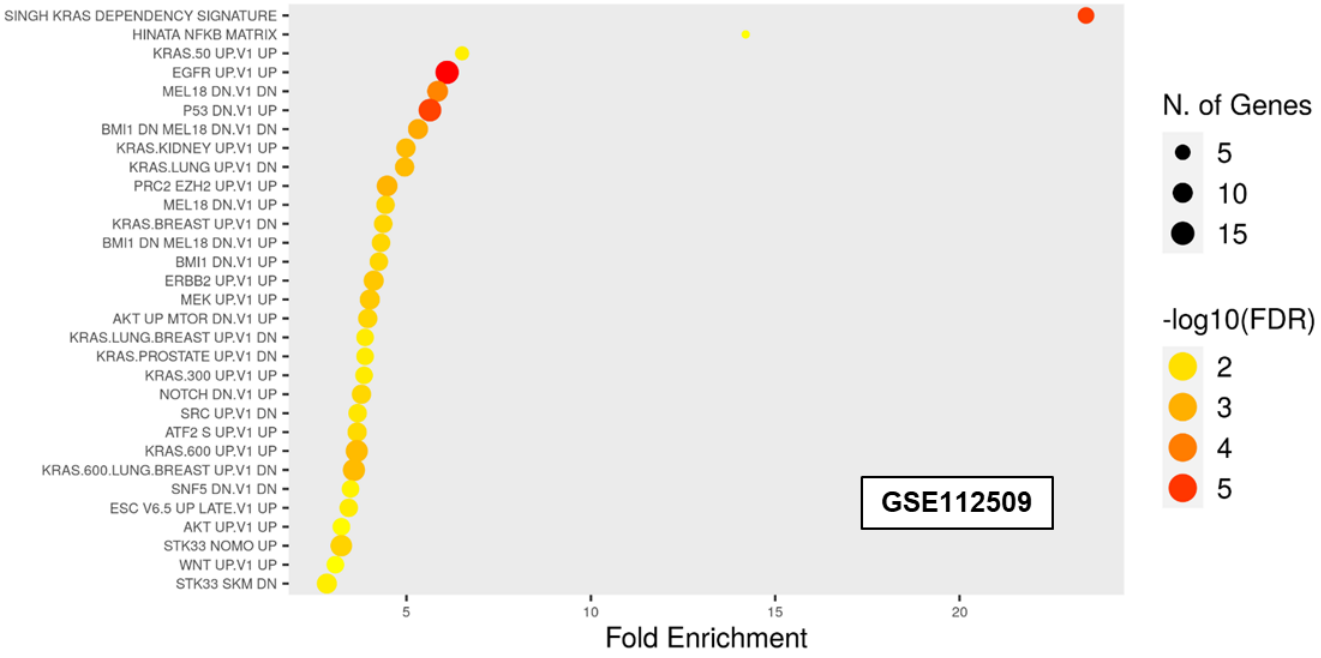




No enrichment found. **GSE98394**

PTK7 UP. Hallmark.

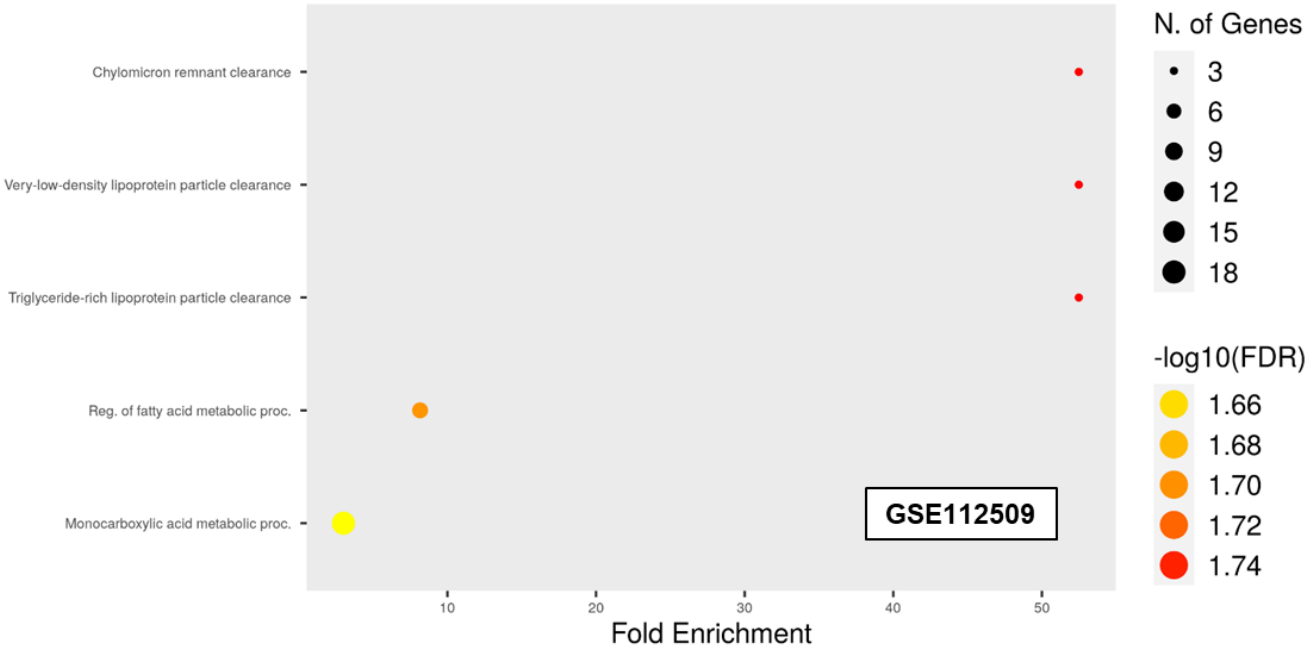






PTK7 UP. Msig Oncogenic.

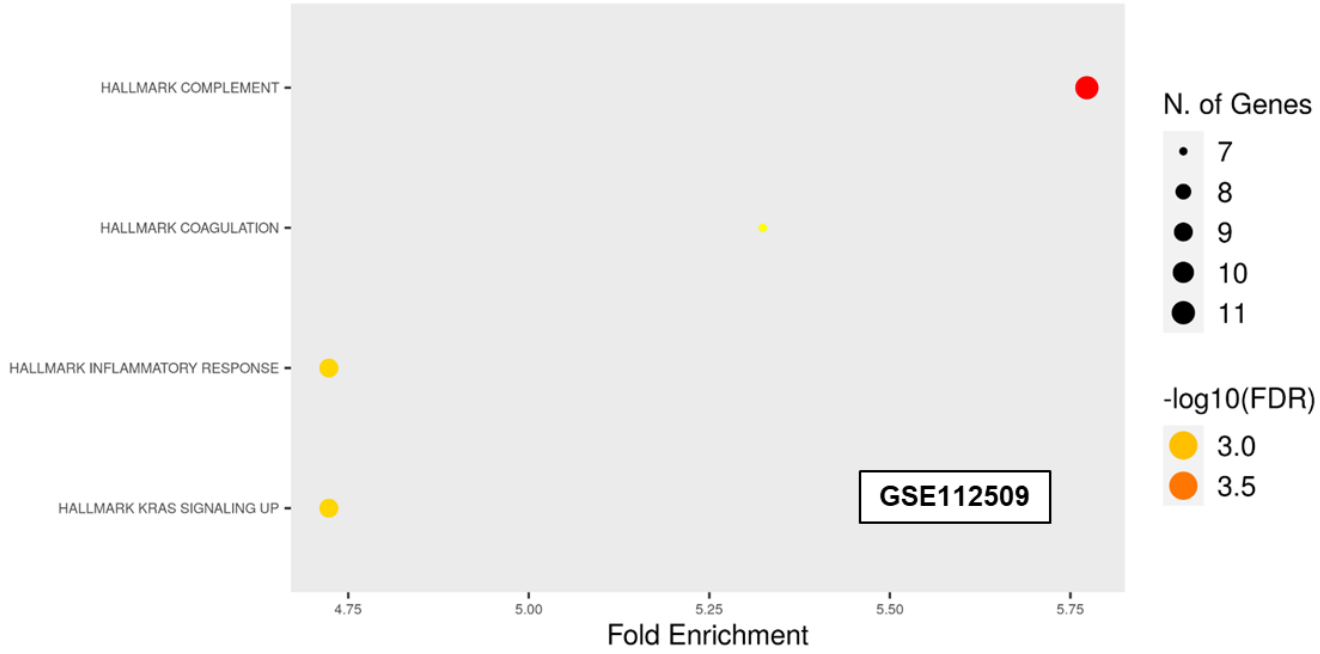
No enrichment found. **TCGA-PRI**



No enrichment found. **GSE98394**

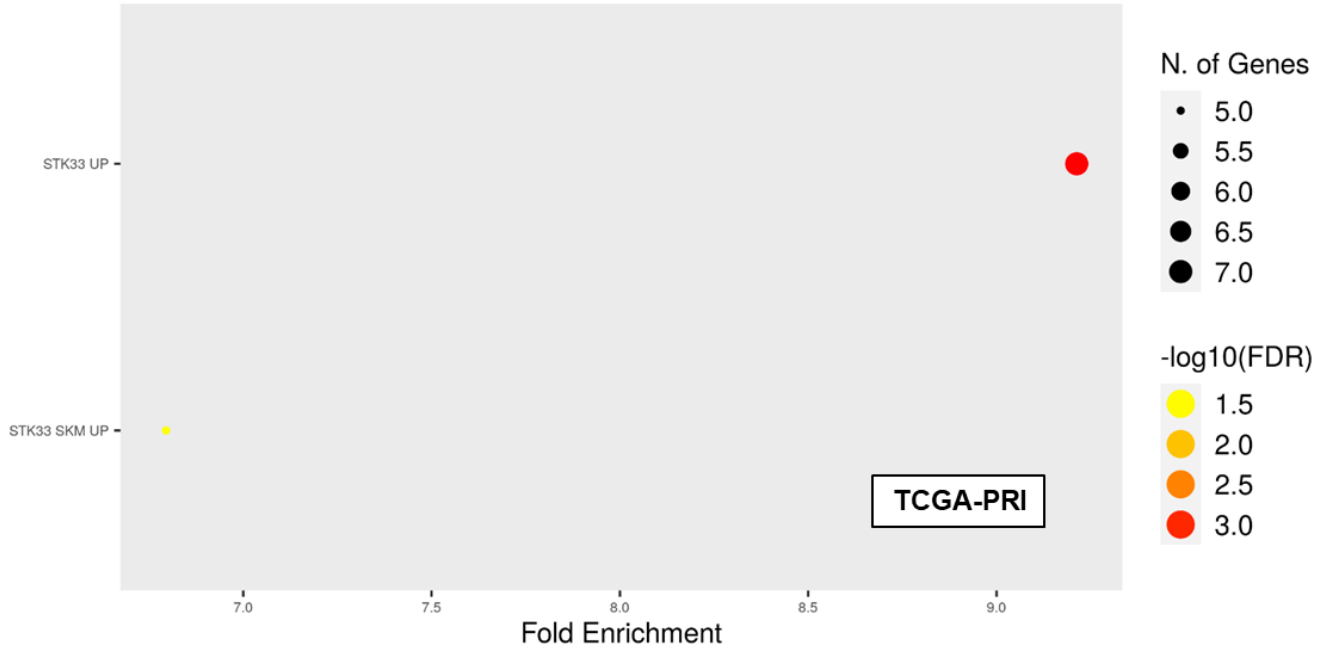
PTK7 DN. Biological Process.

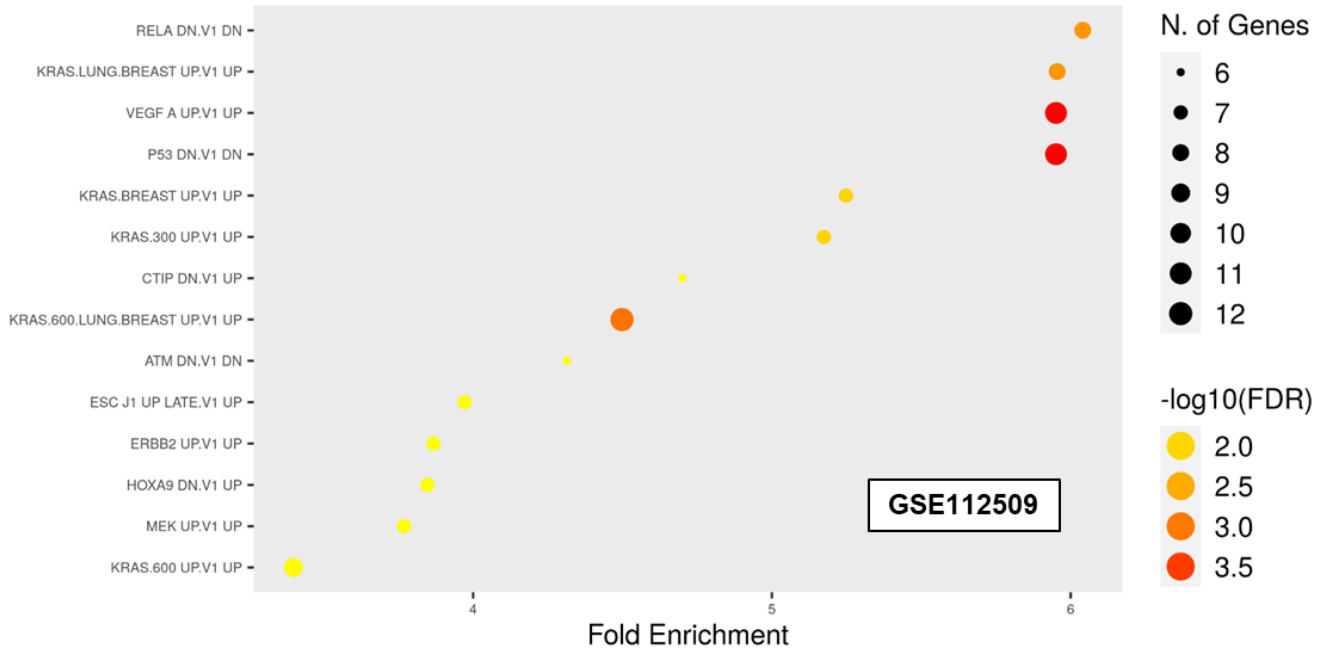
No enrichment found. **TCGA-PRI**



No enrichment found. **GSE98394**

PTK7 DN. Hallmark.



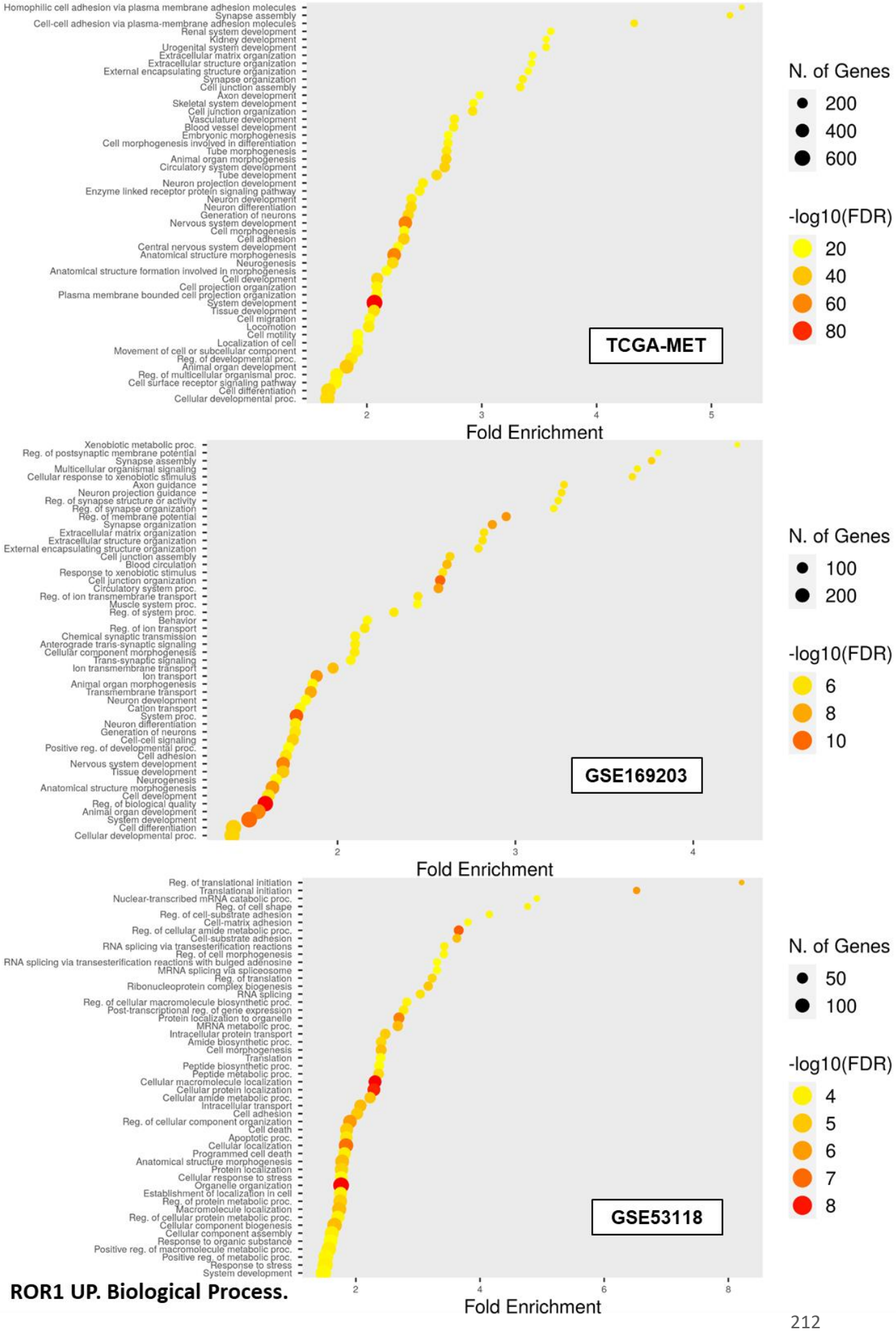




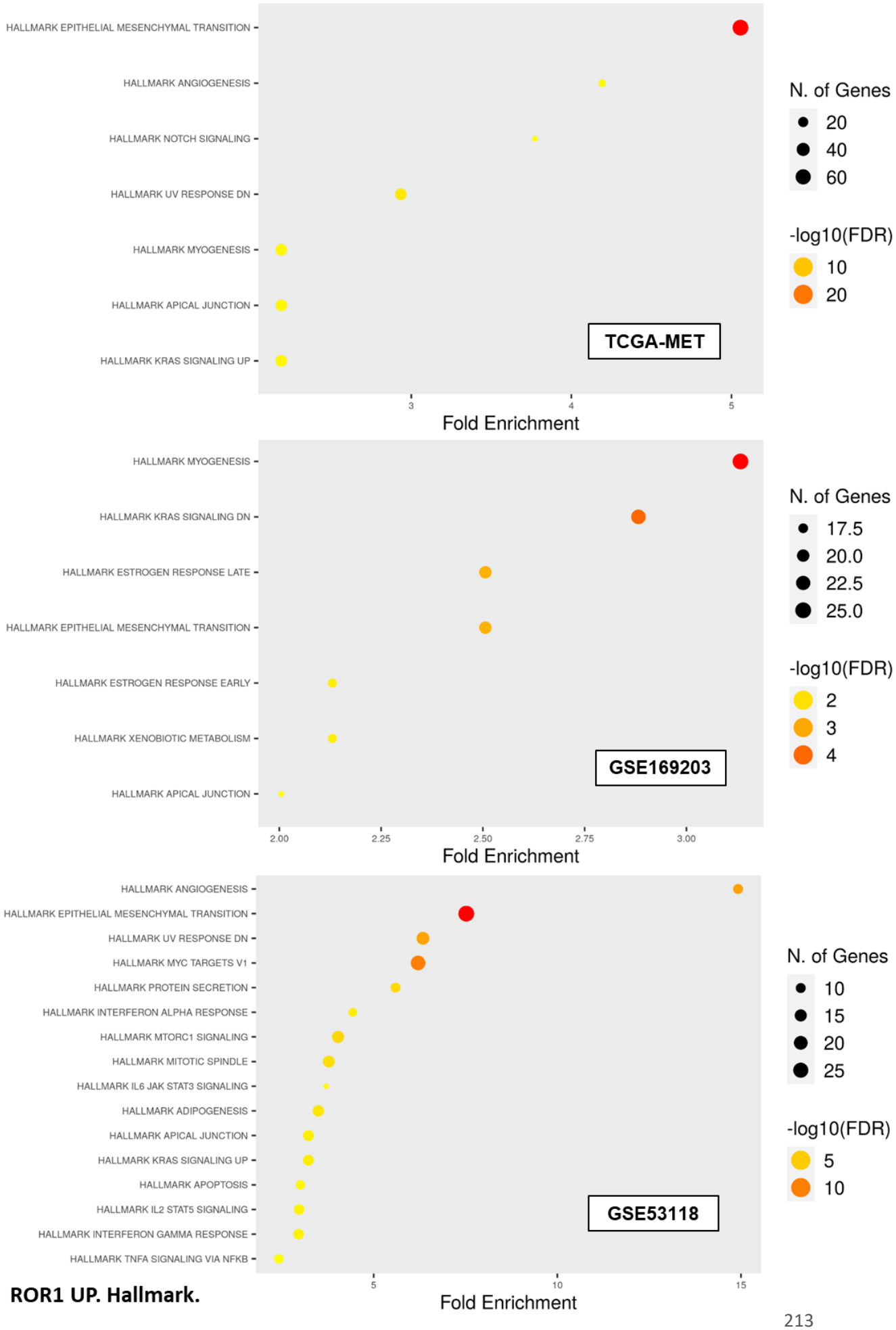
PTK7 DN. Msig Oncogenic.

D.3 Enriquecimientos en las categorías “Biological Process”, “Hallmark” y “Oncogenic MSigDb” para ROR1, ROR2, RYK y PTK7 de datasets de pacientes con melanoma metastásico.

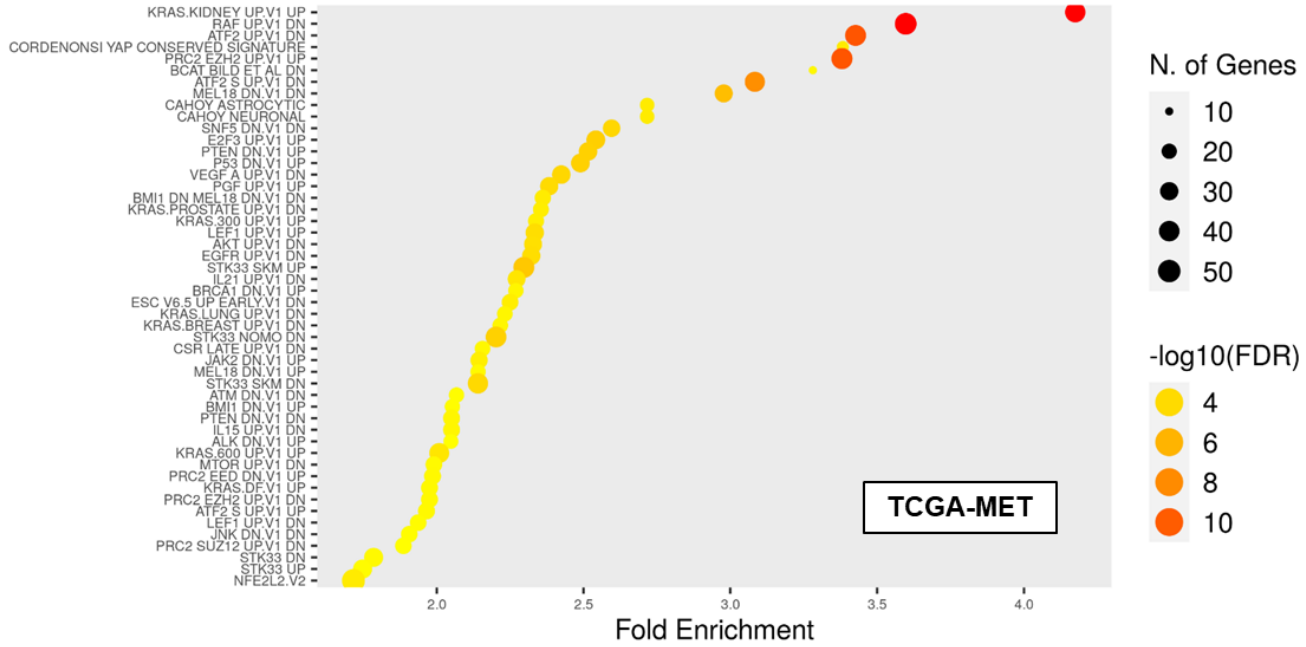
Se representan los gráficos de burbujas obtenidos a partir de los DEGs en el ShinyGo 0.80. DEGs: genes diferencialmente expresados, UP: DEGs de alta expresión, DN: DEGs de baja expresión, MET: metastásico.

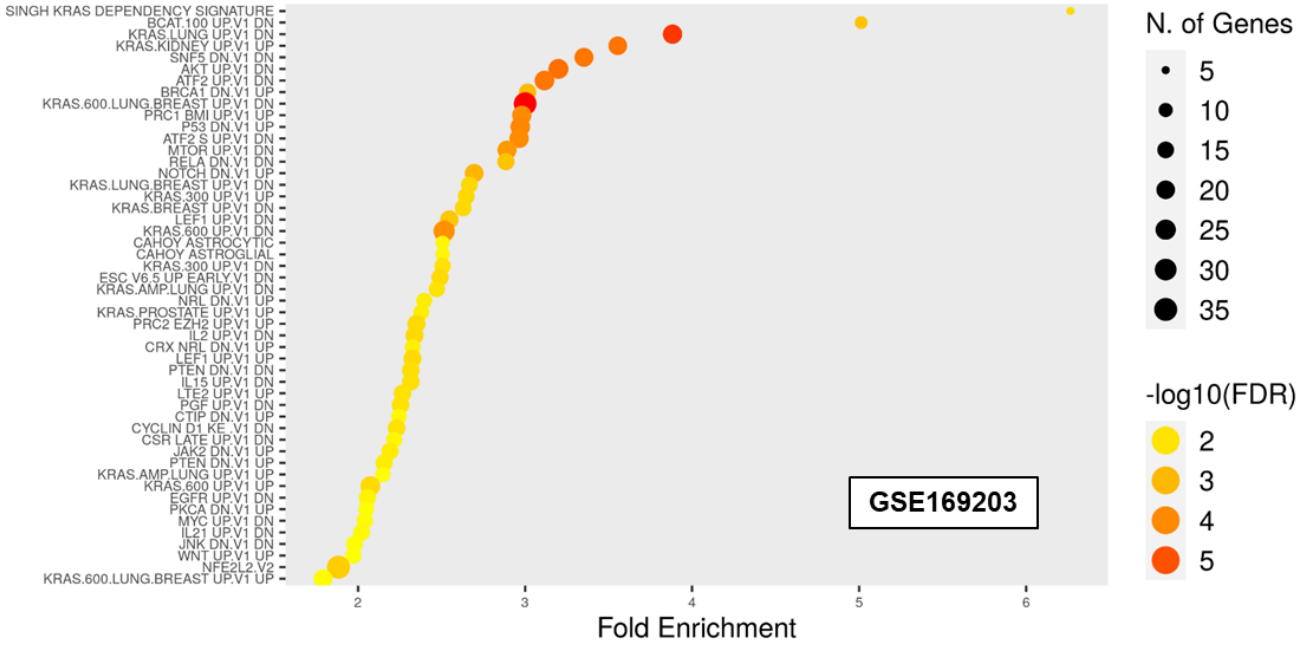


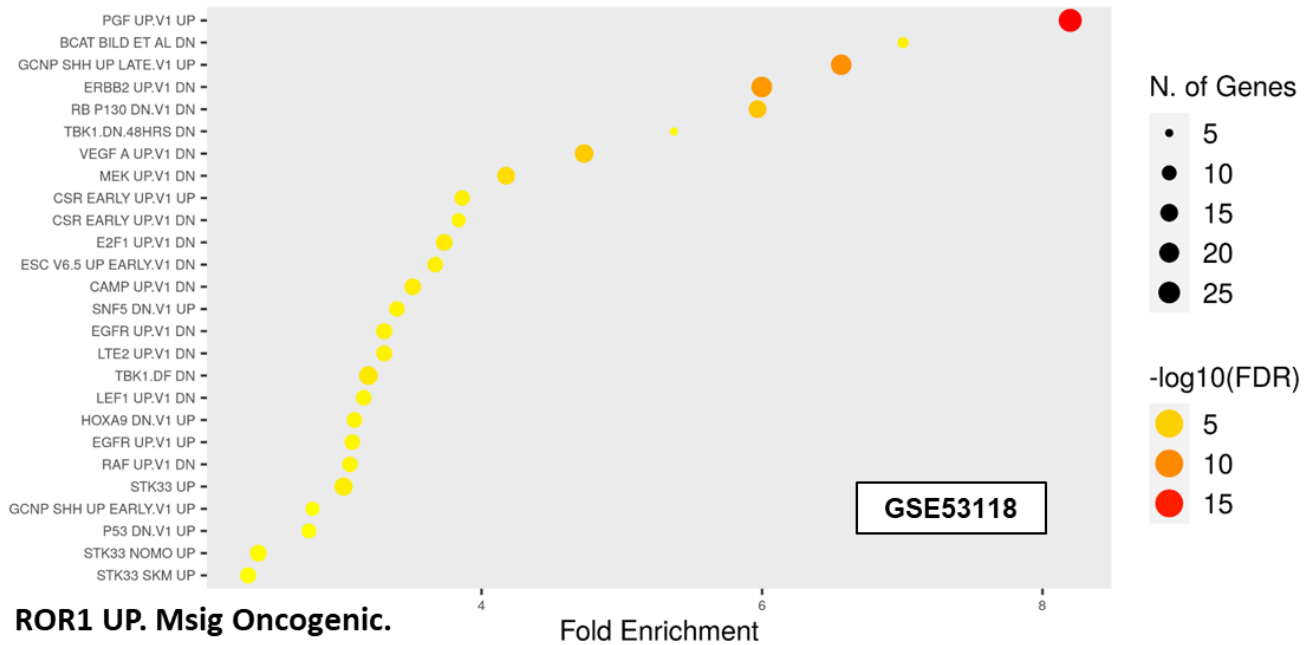
ROR1 UP. Biological Process.



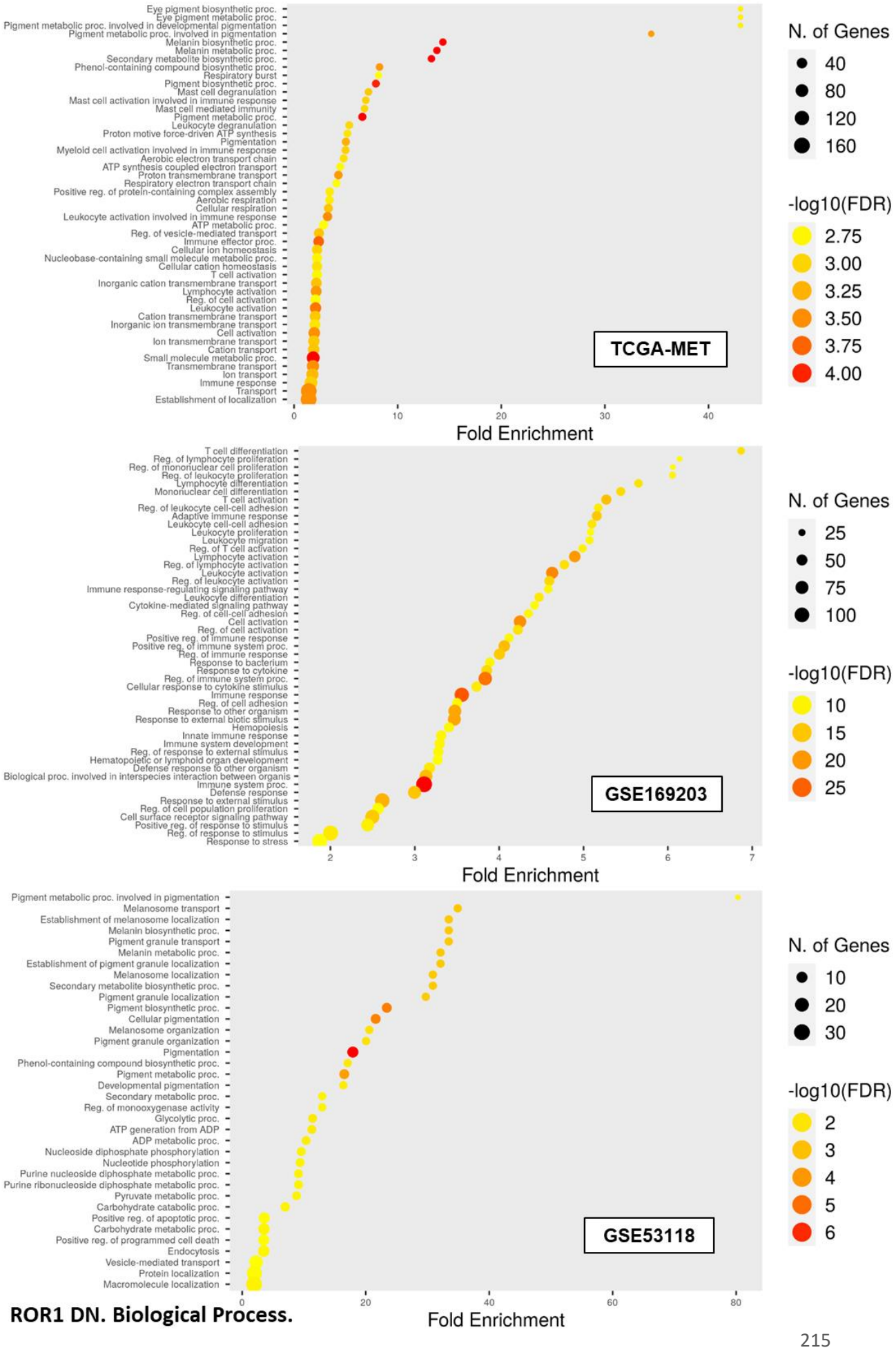
ROR1 UP. Hallmark.



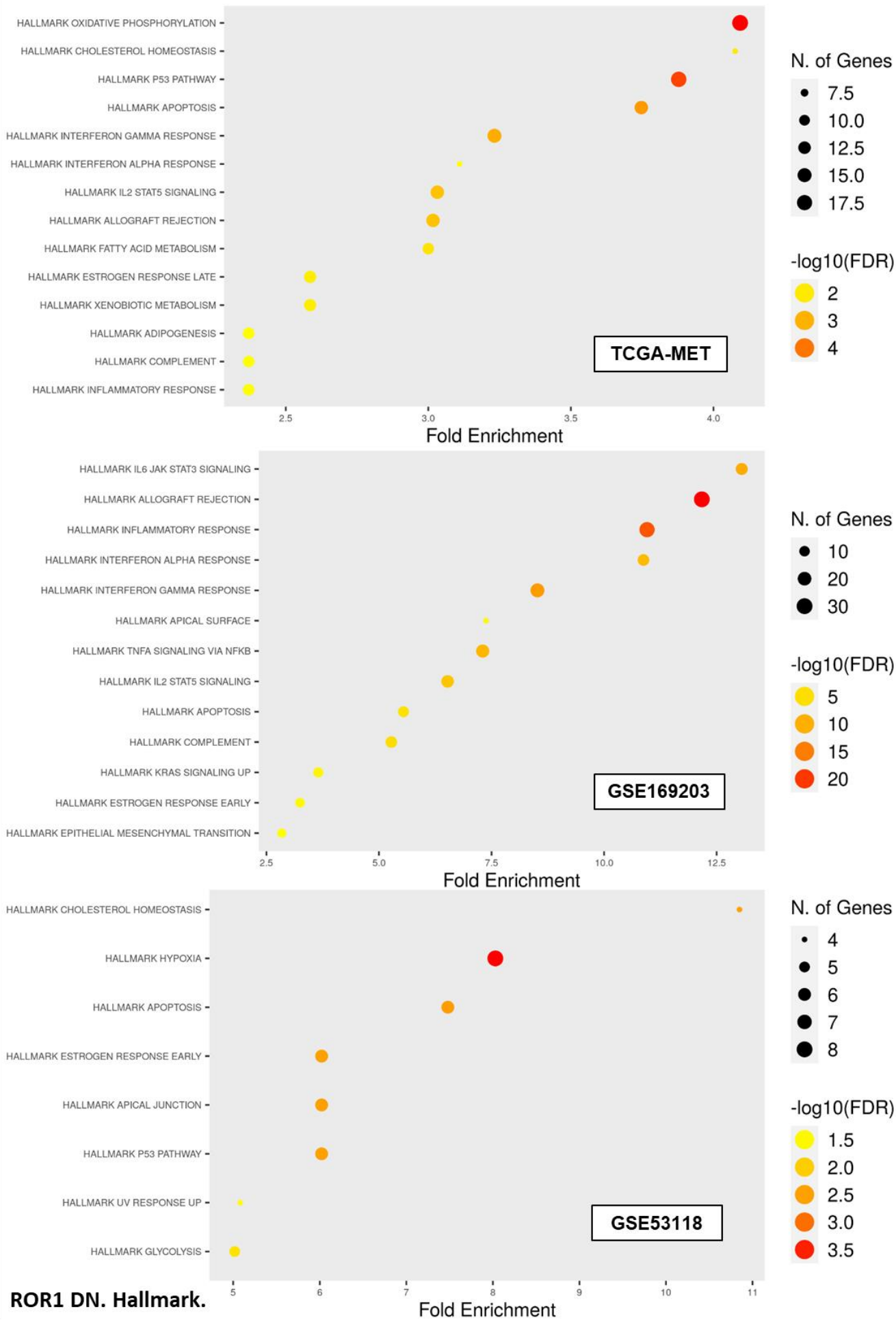




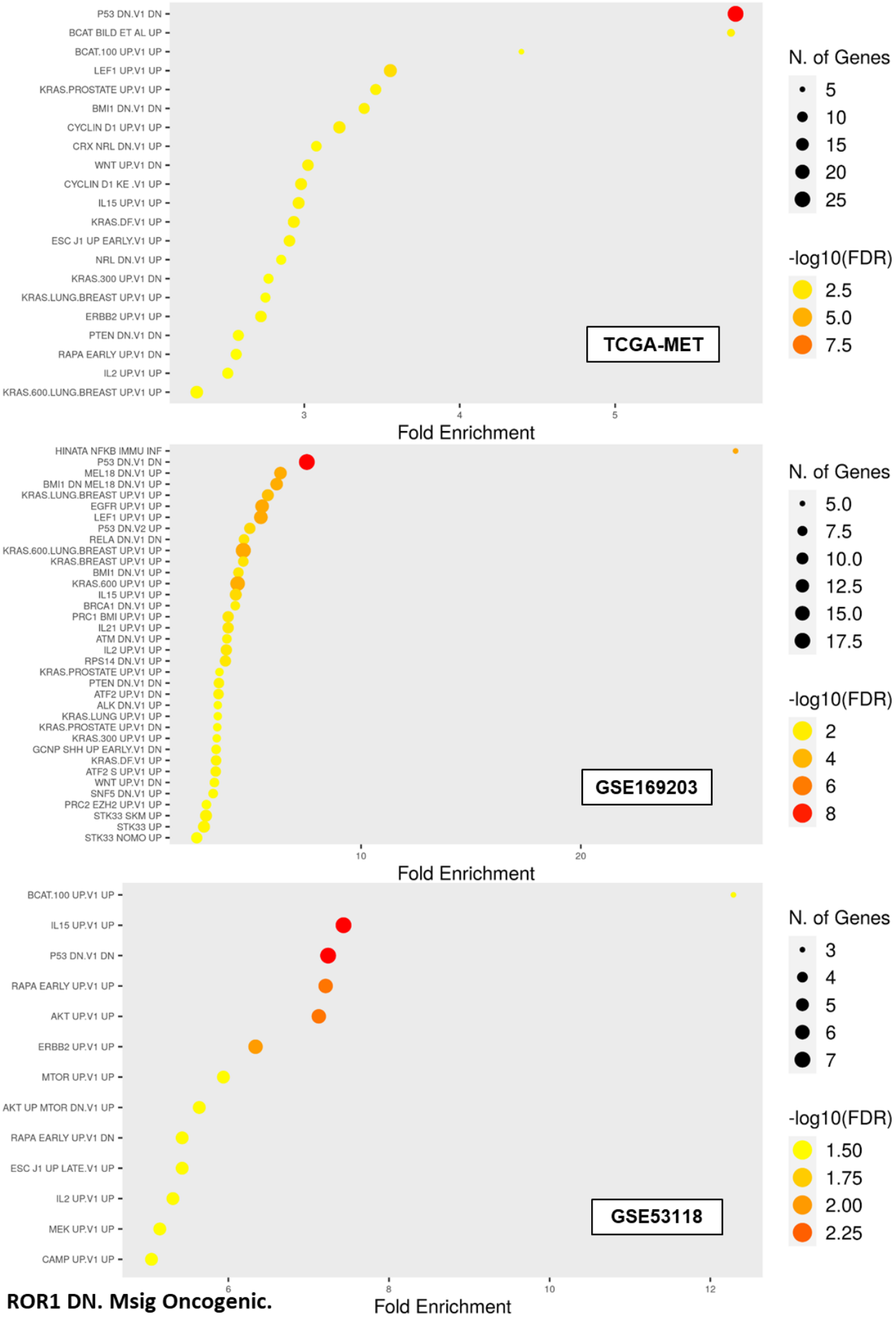
ROR1 UP. Msig Oncogenic.



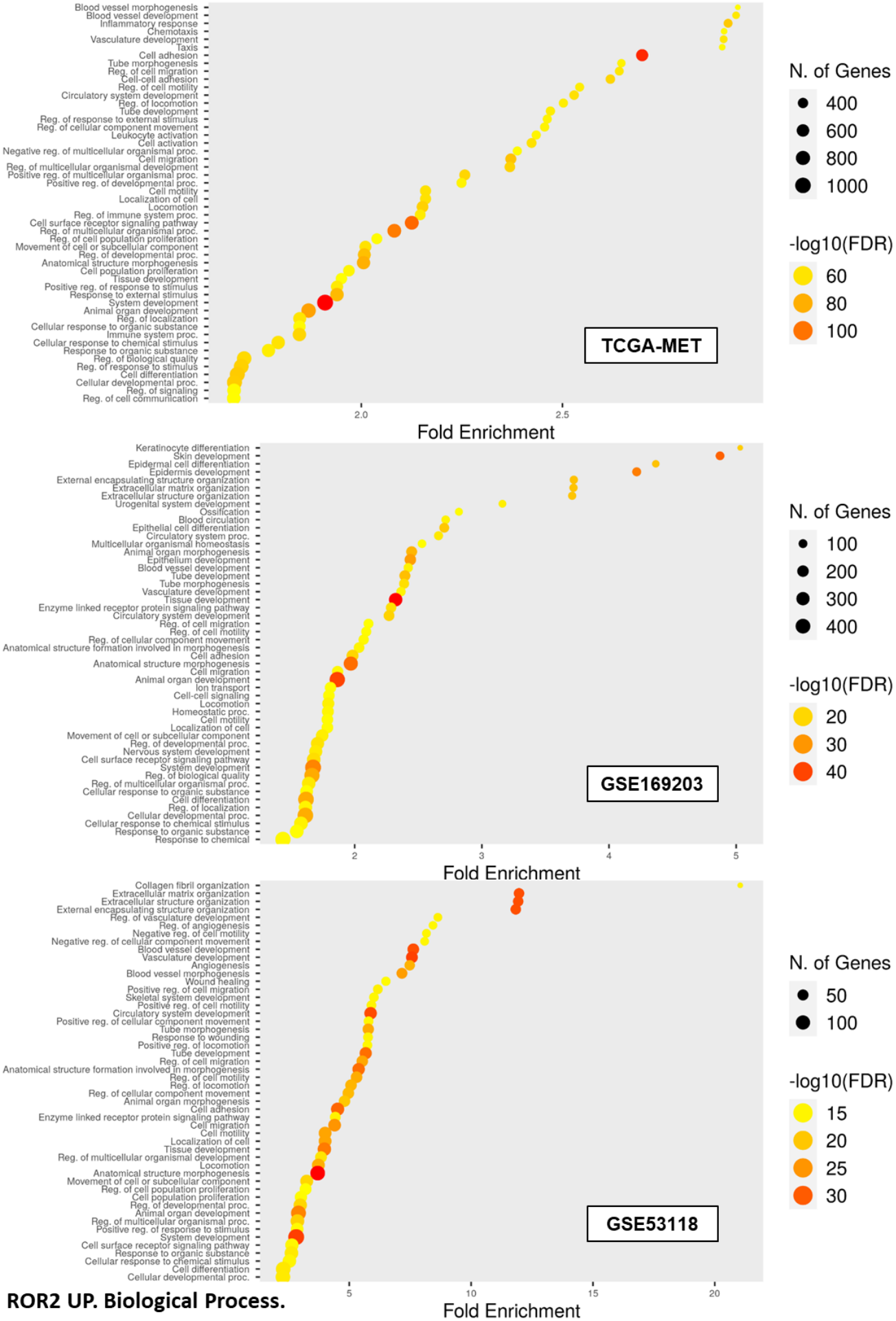
ROR1 DN. Biological Process.



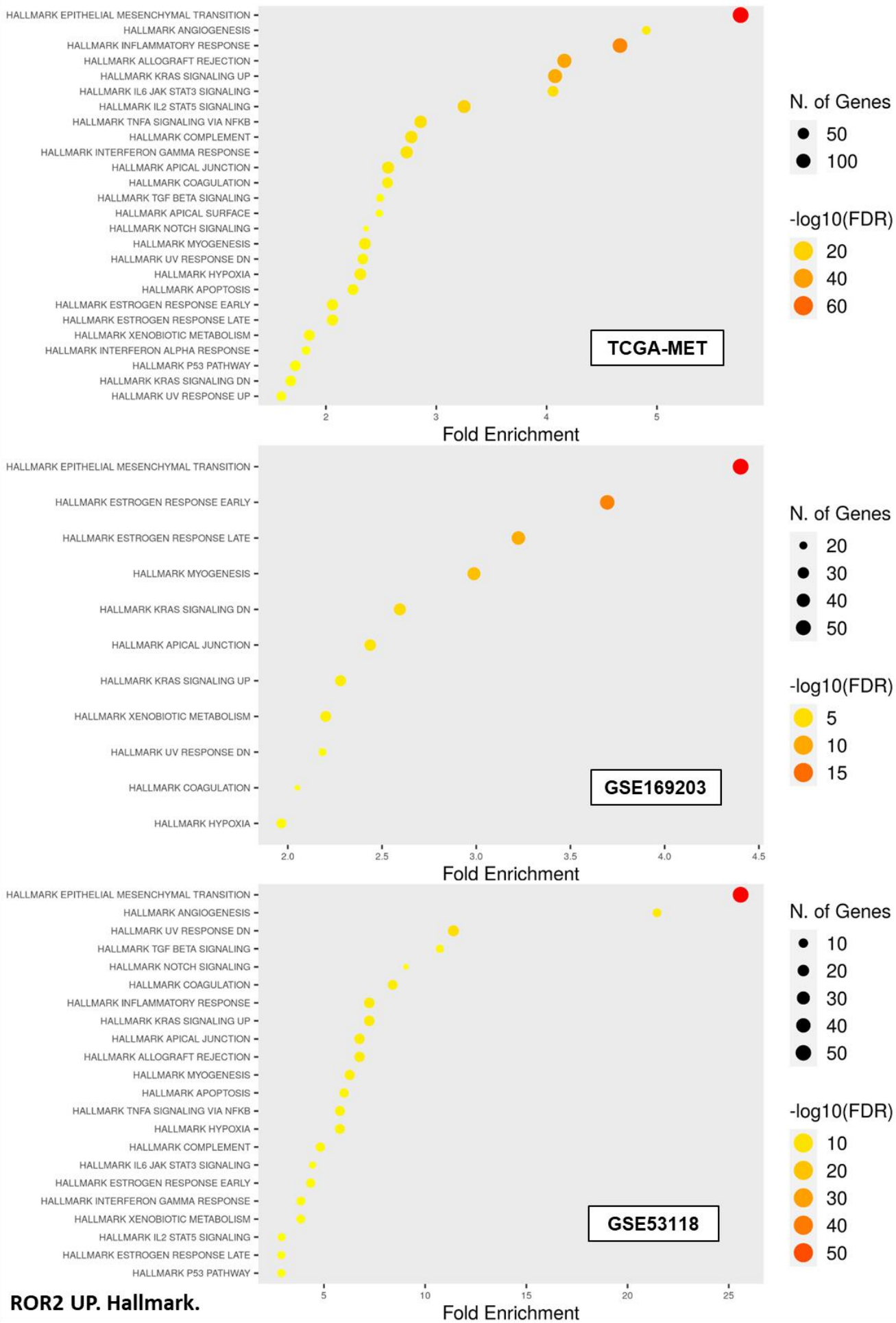
ROR1 DN. Hallmark.



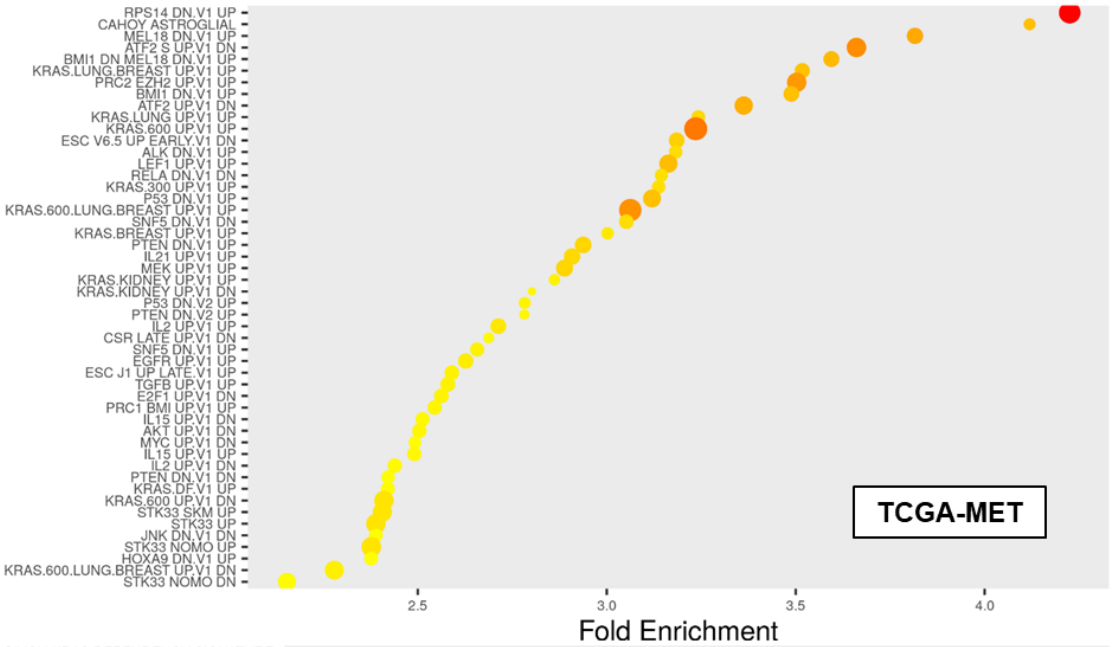
ROR1 DN. Msig Oncogenic.

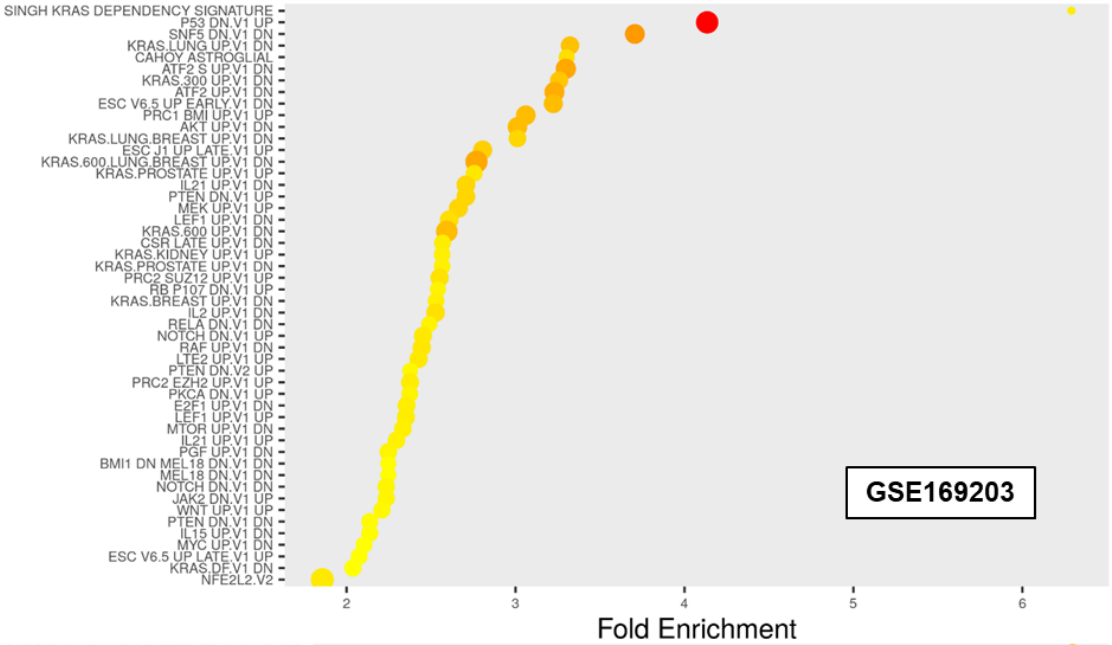


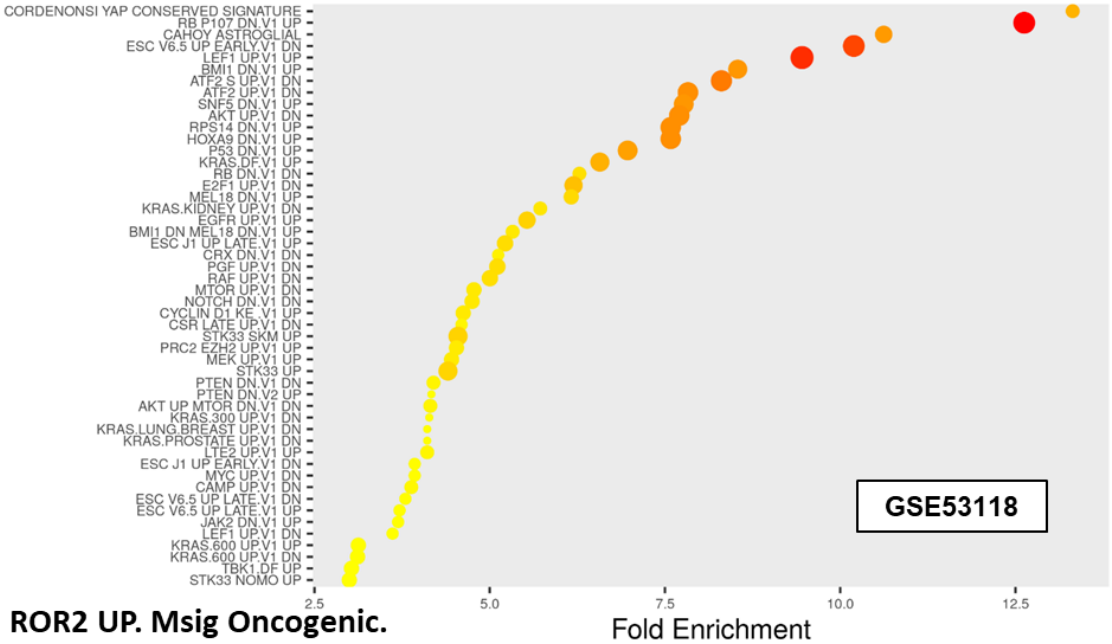
ROR2 UP. Biological Process.



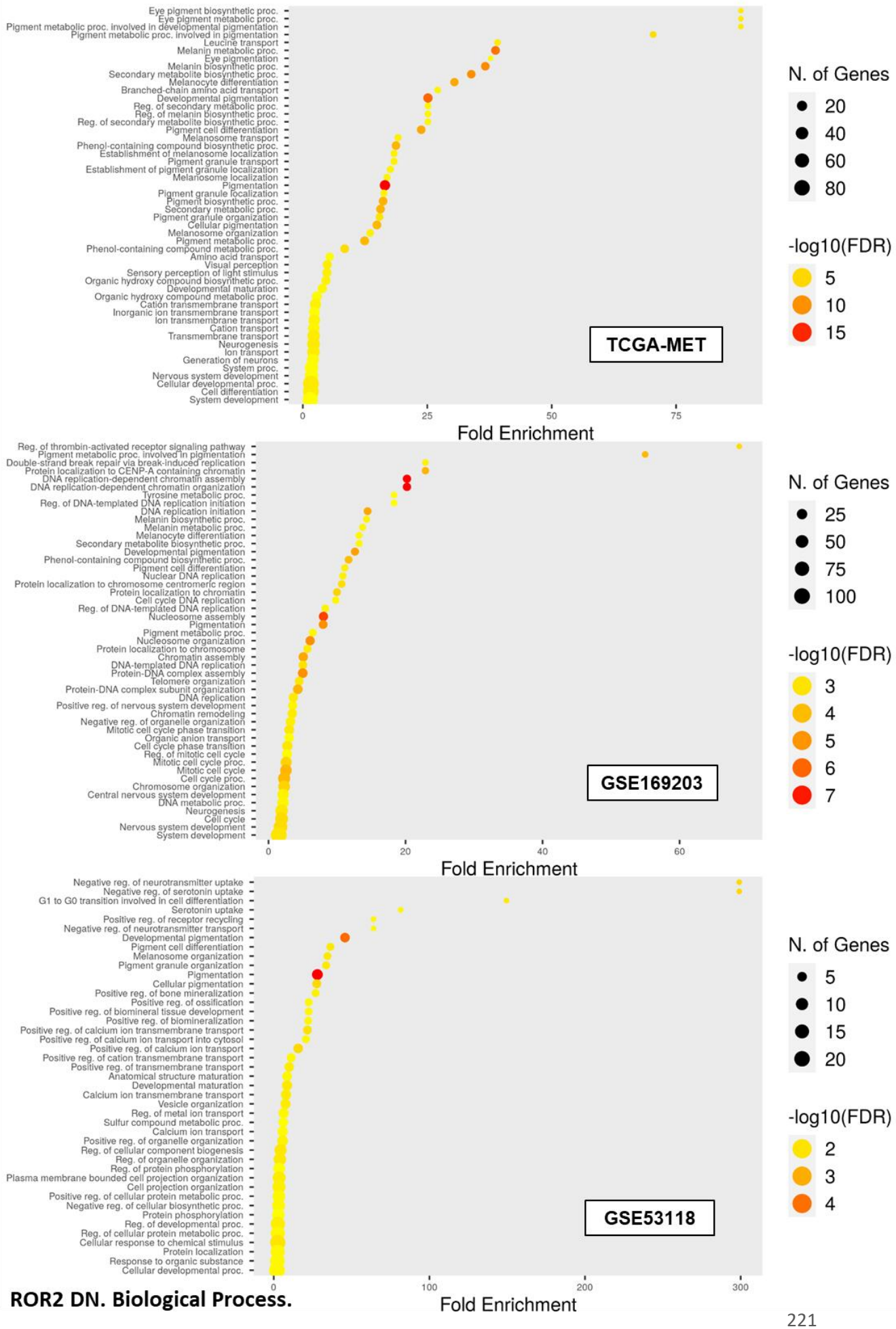
ROR2 UP. Hallmark.



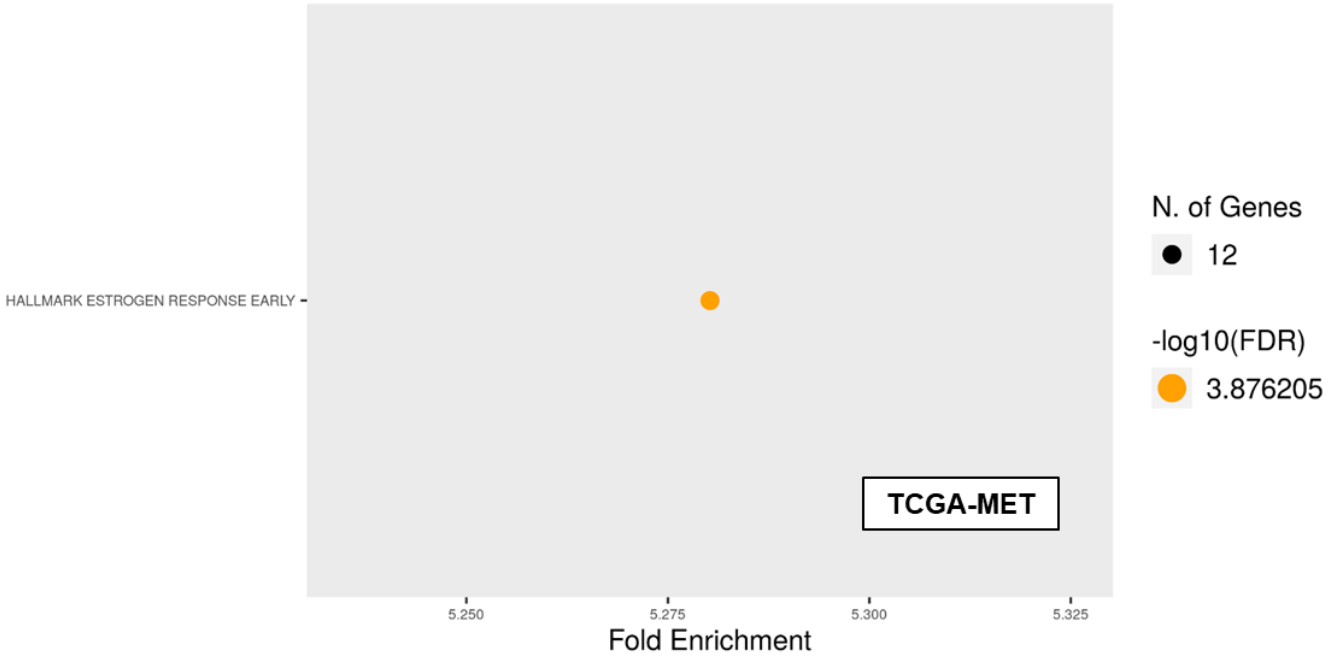


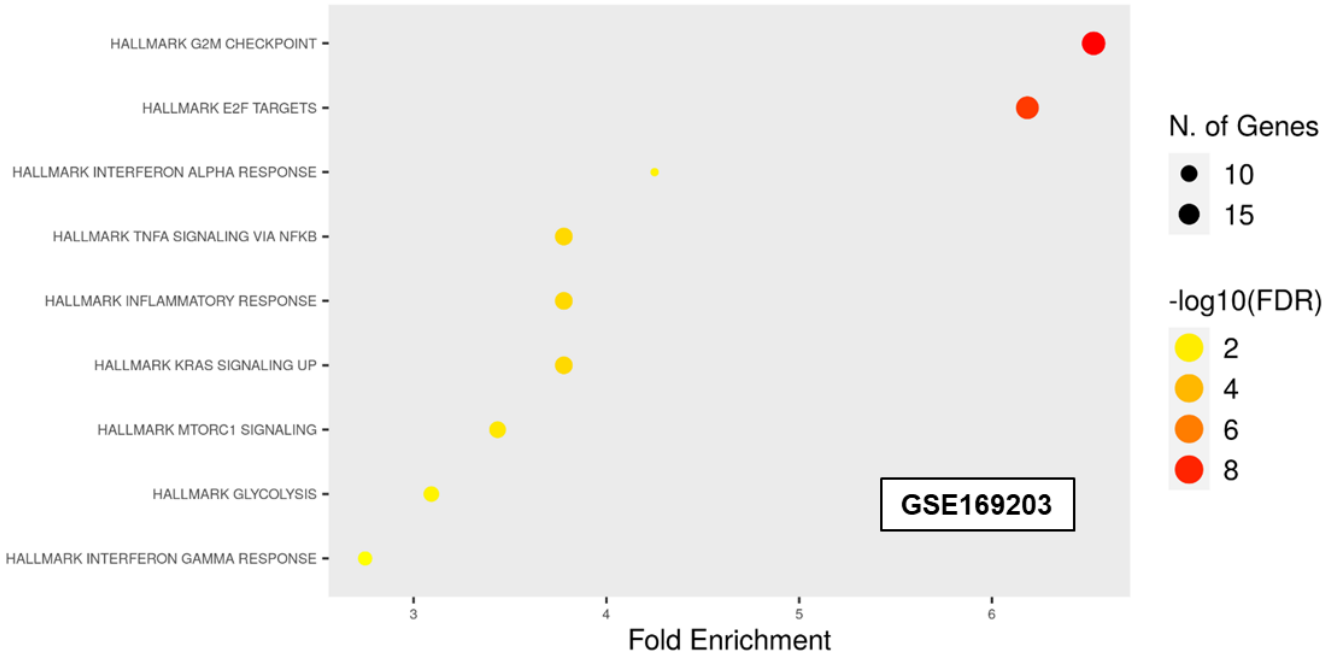


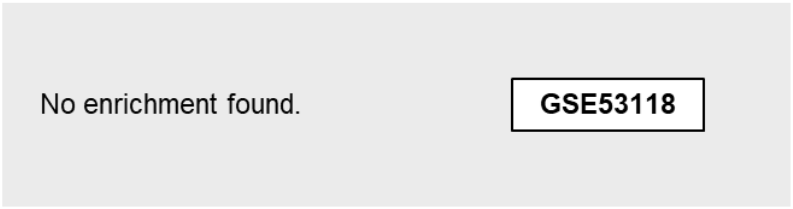
ROR2 UP. Msig Oncogenic.



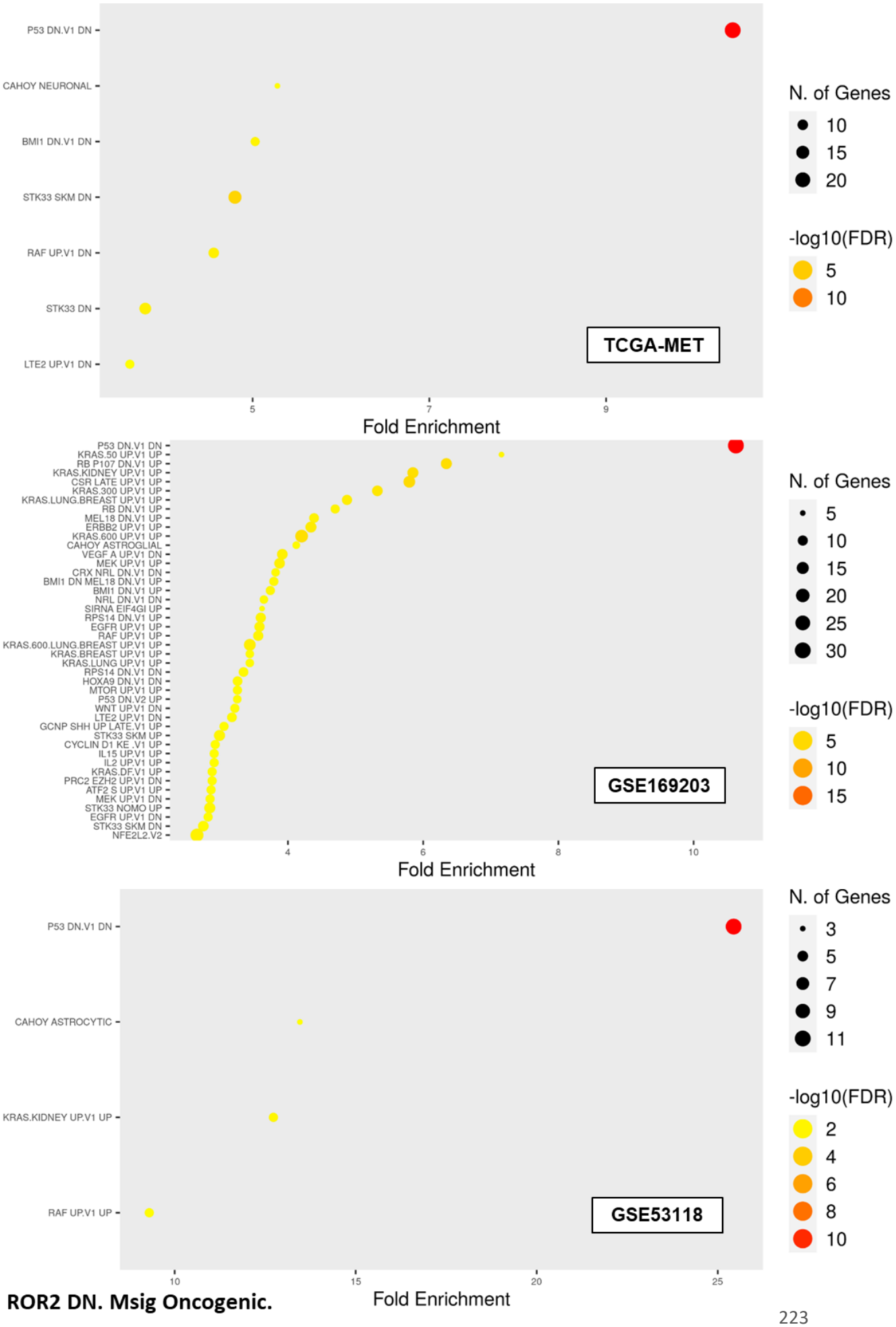
ROR2 DN. Biological Process.



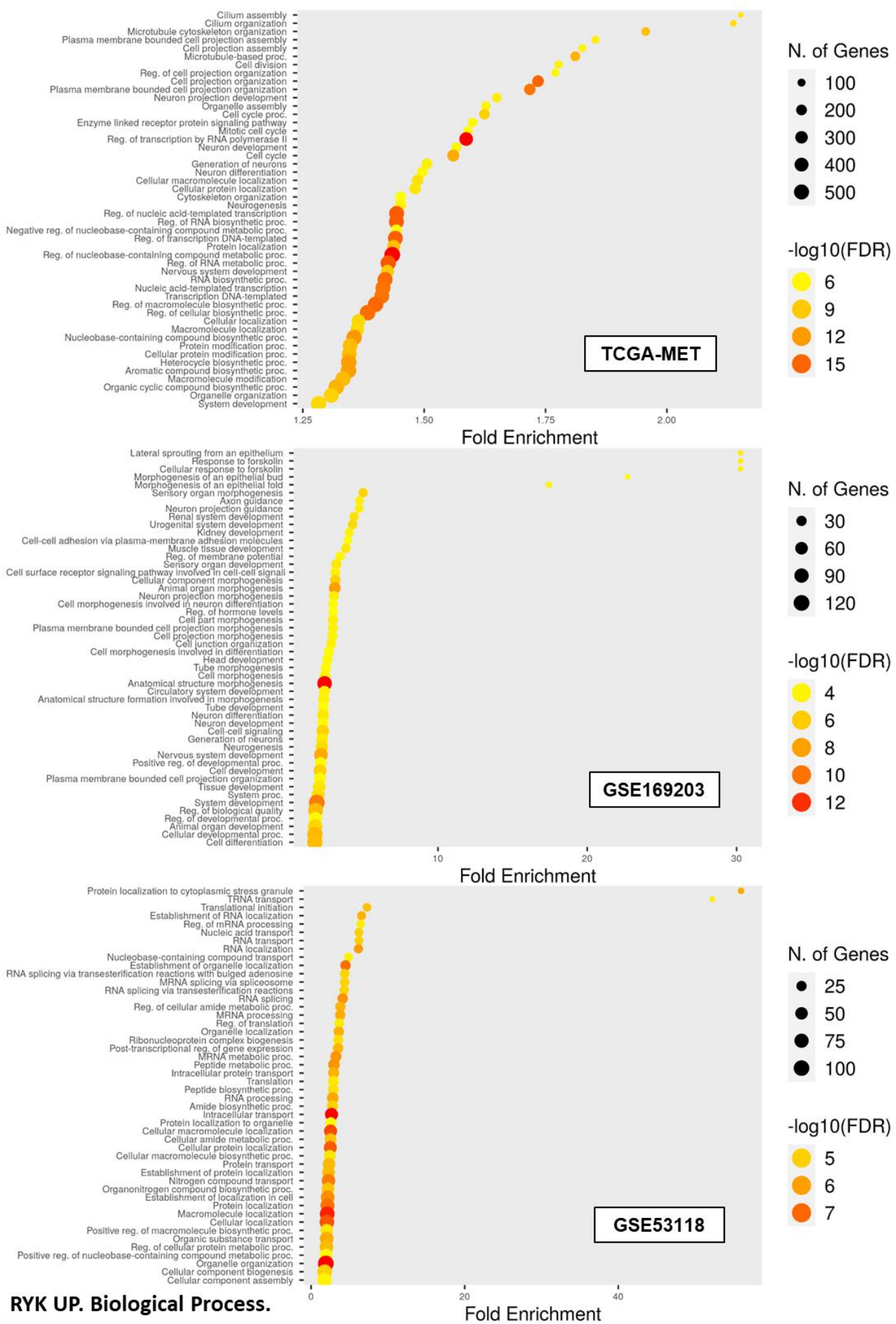




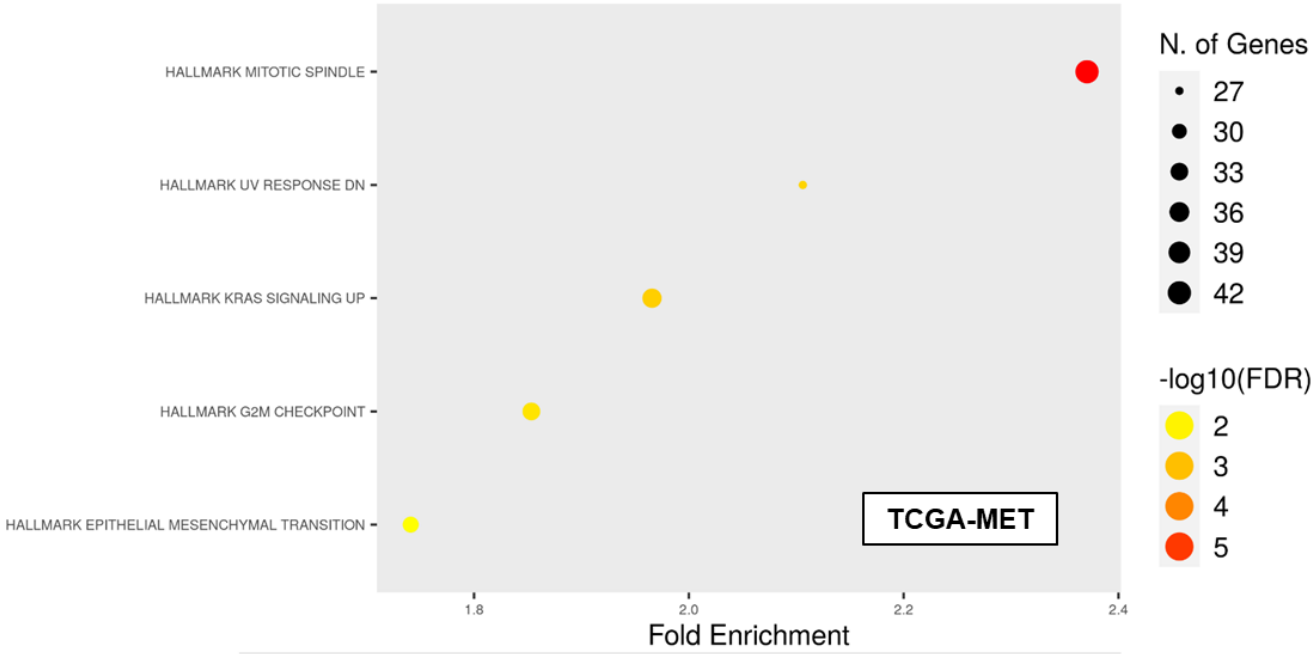
ROR2 DN. Hallmark.

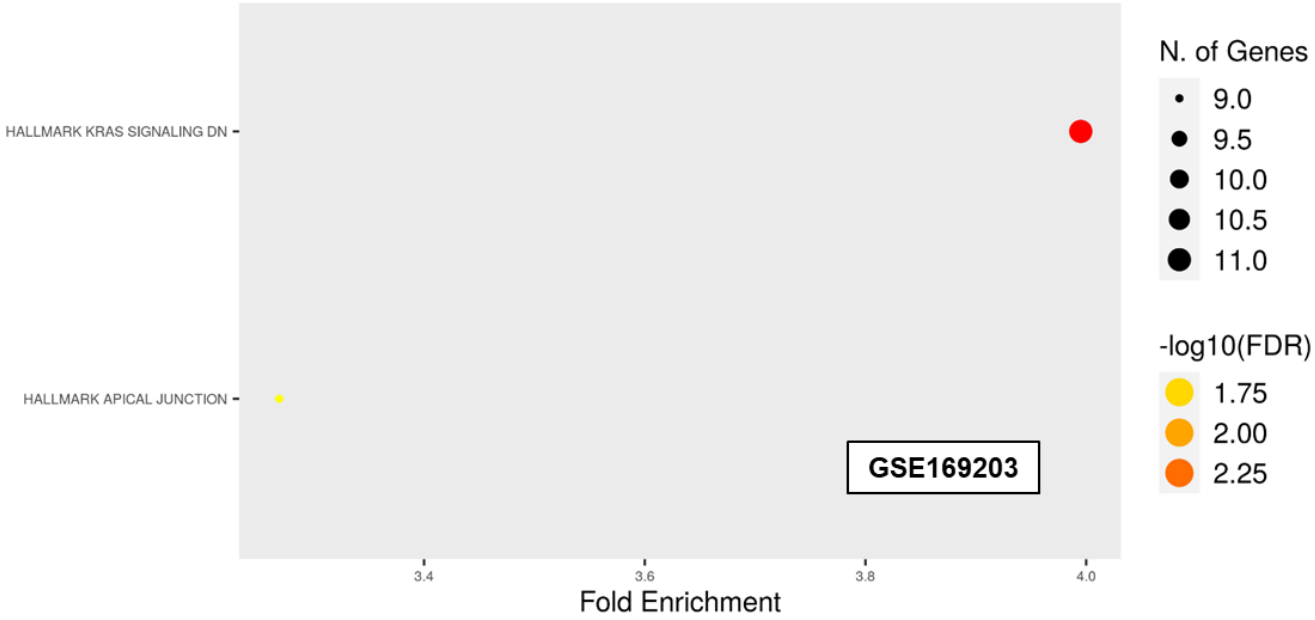


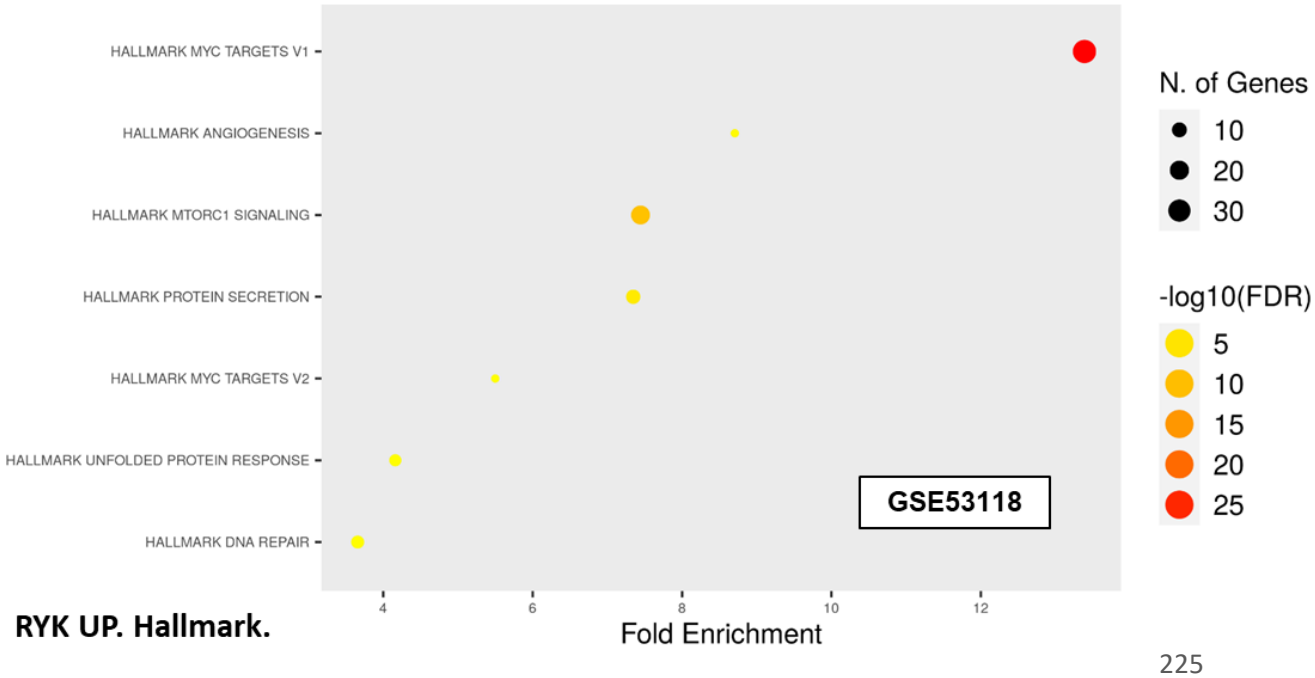
ROR2 DN. Msig Oncogenic.



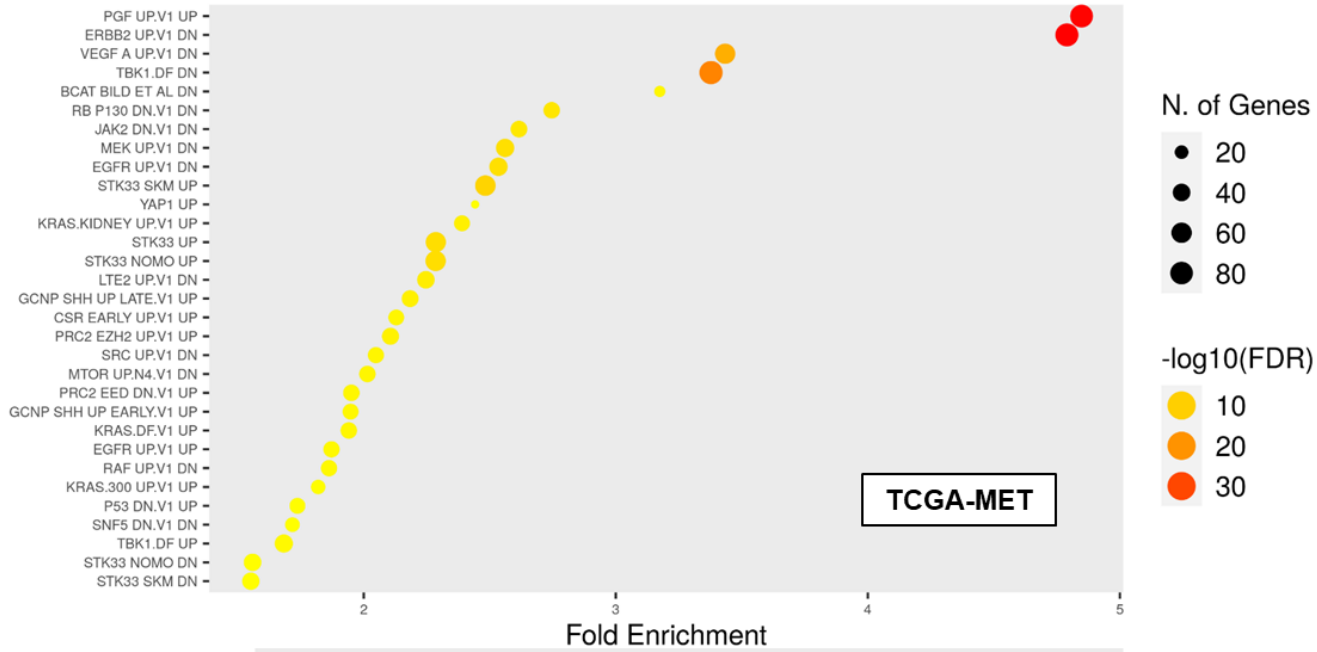
RYK UP. Biological Process.

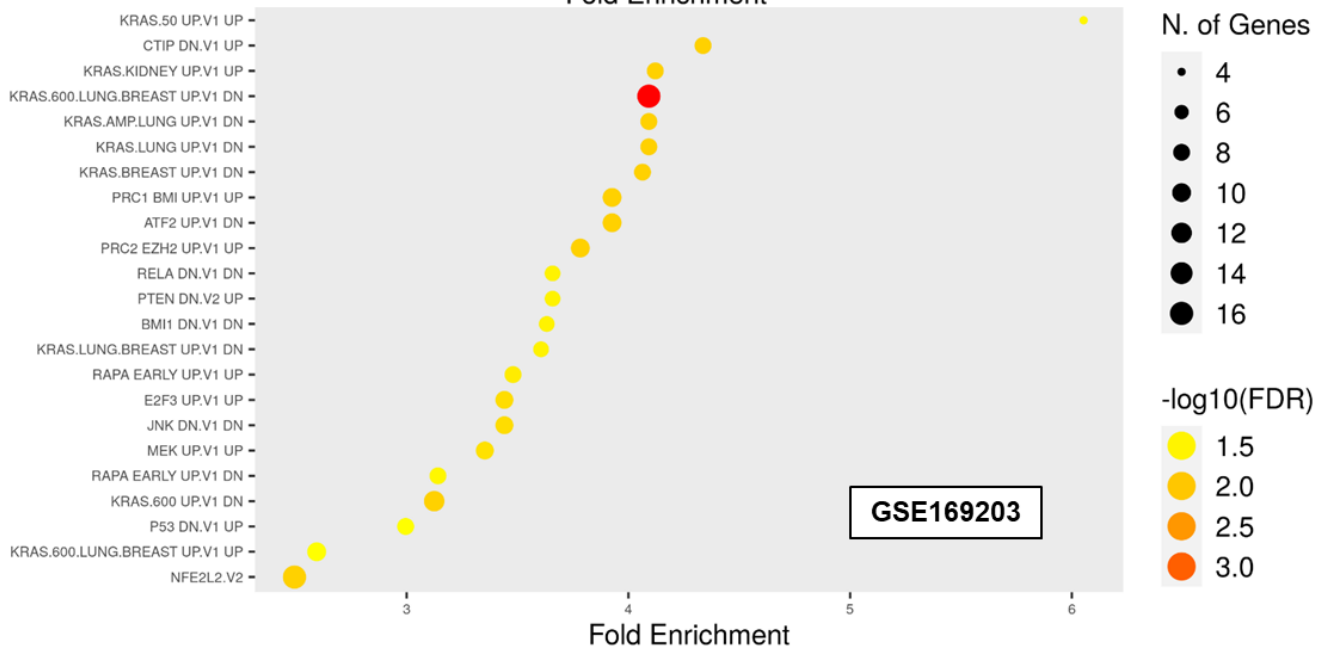


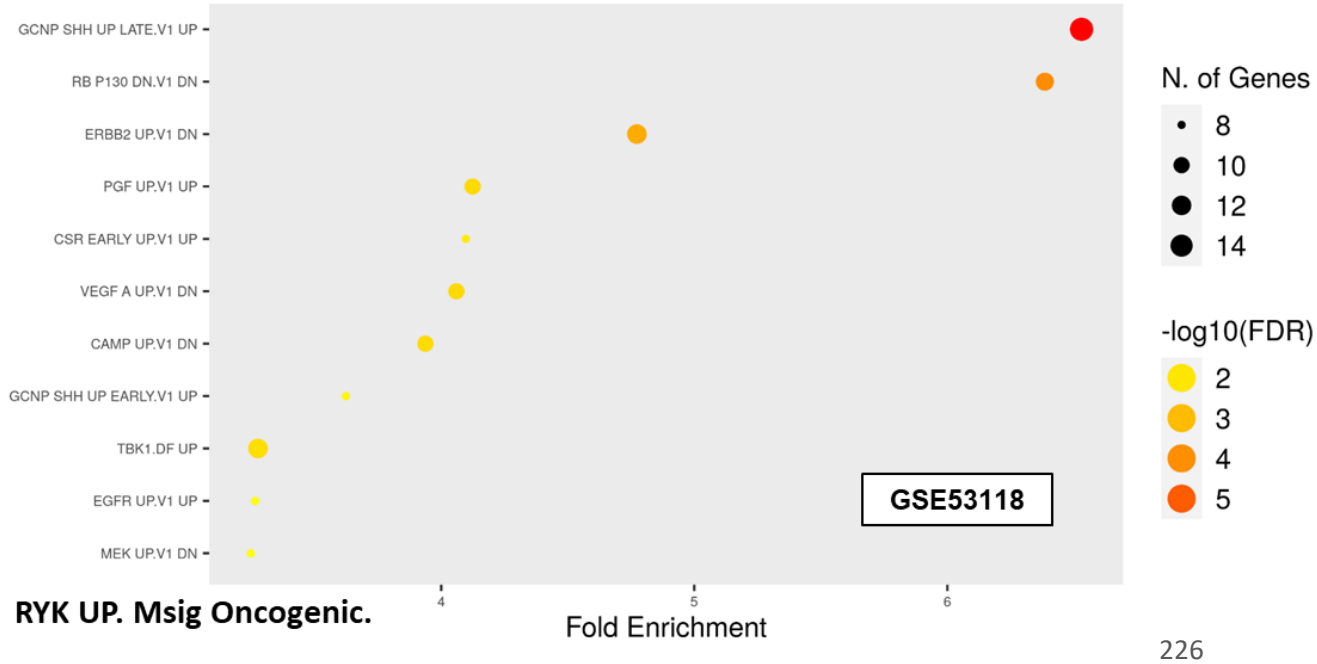




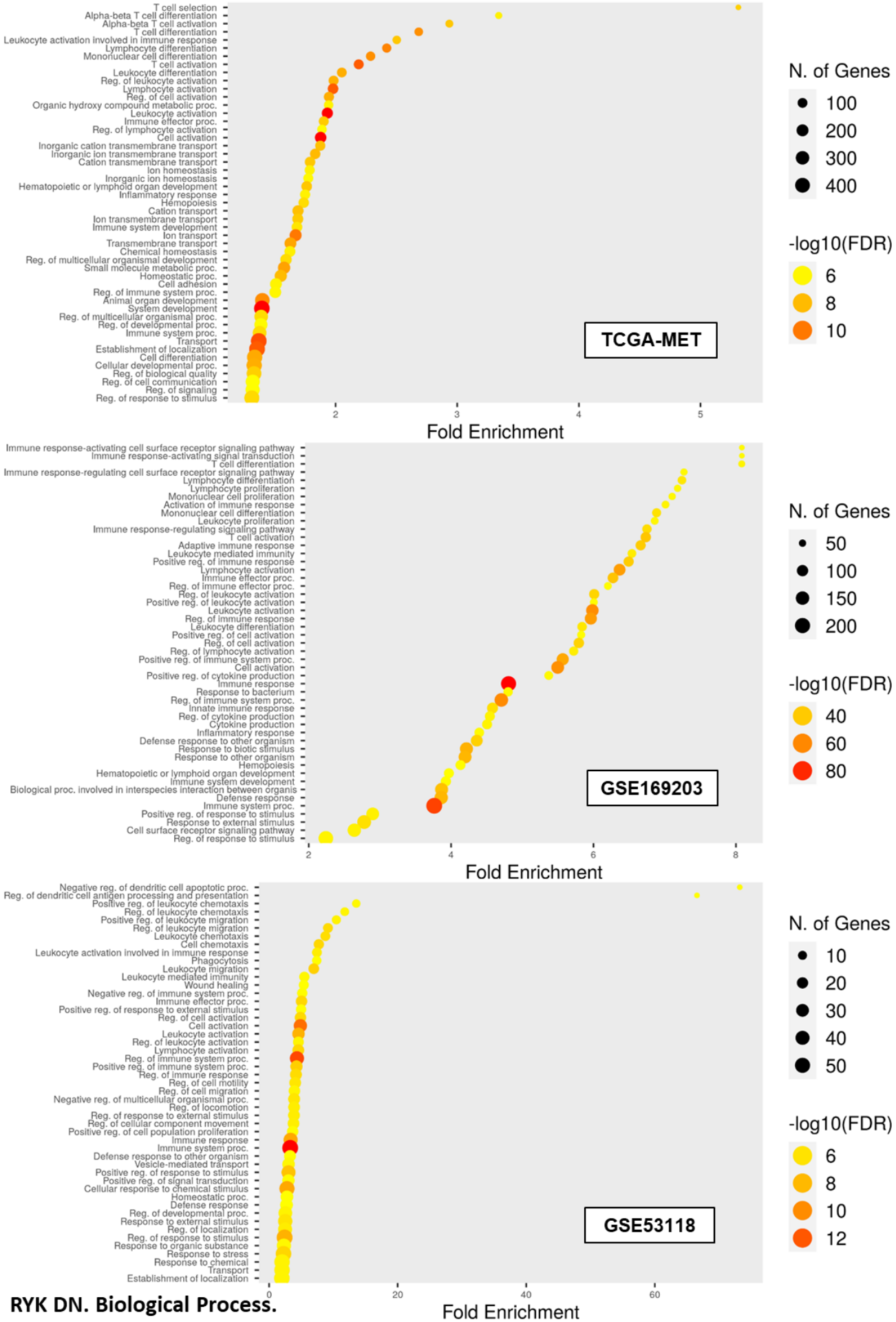
RYK UP. Hallmark.







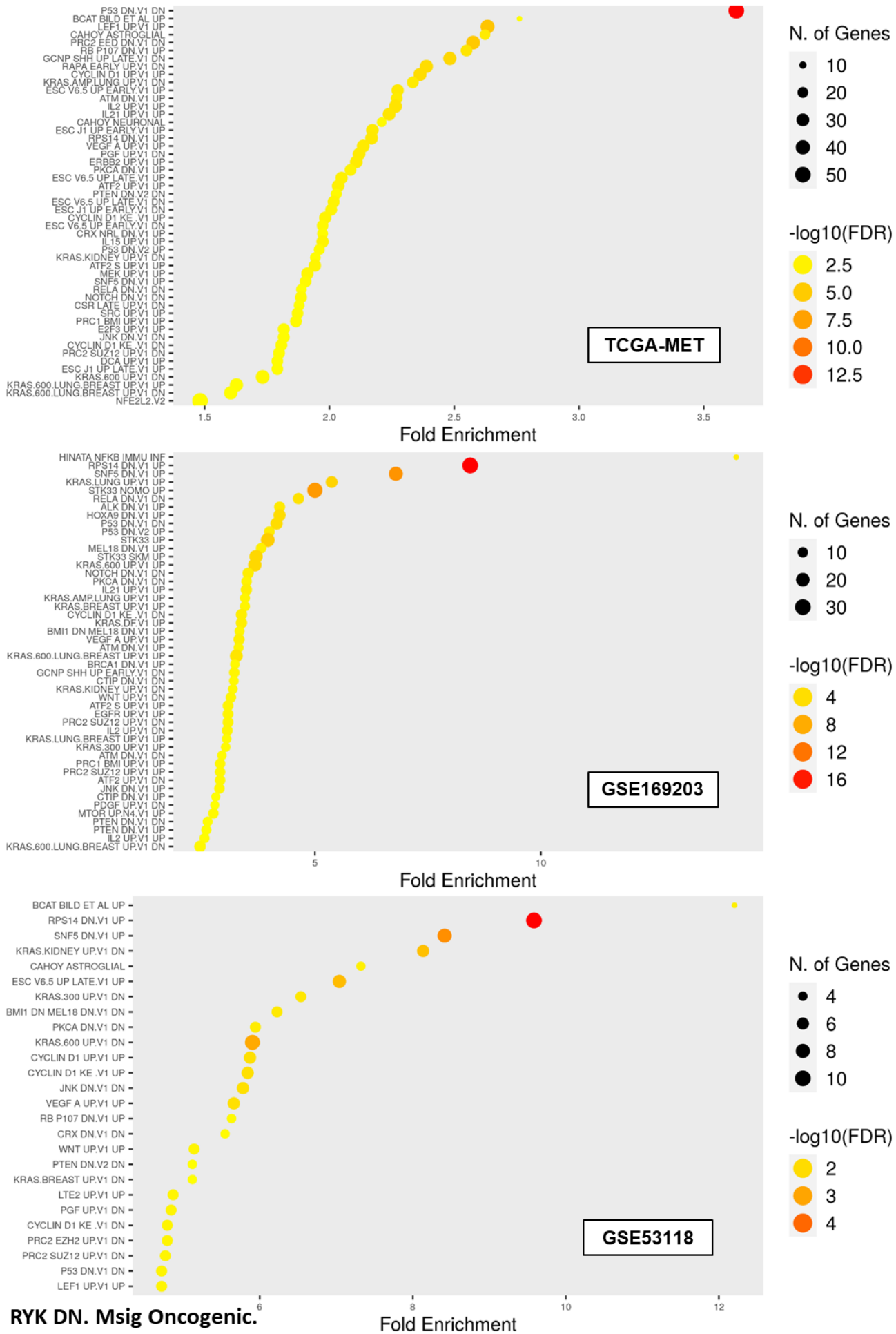
RYK UP. Msig Oncogenic.



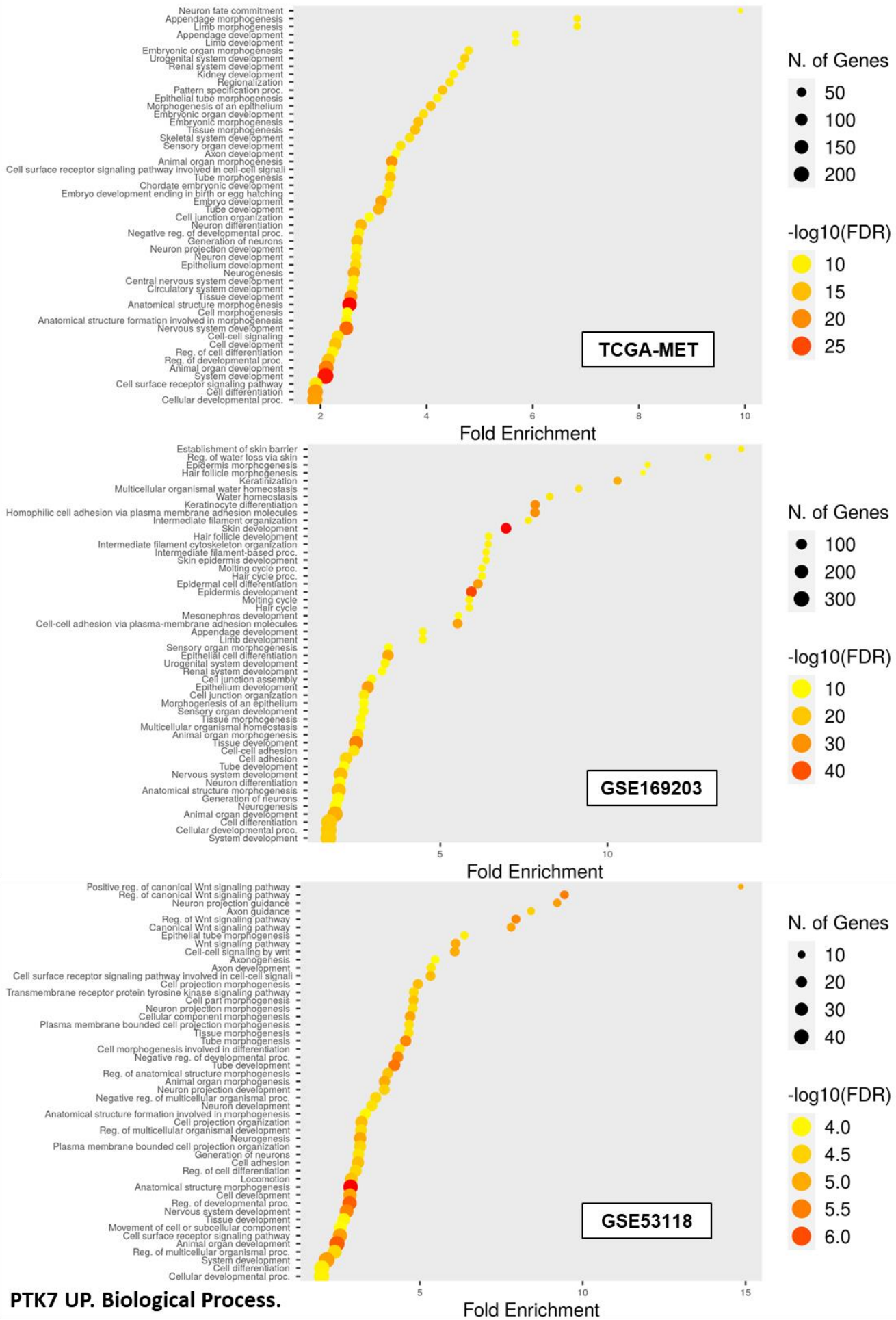
RYK DN. Biological Process.



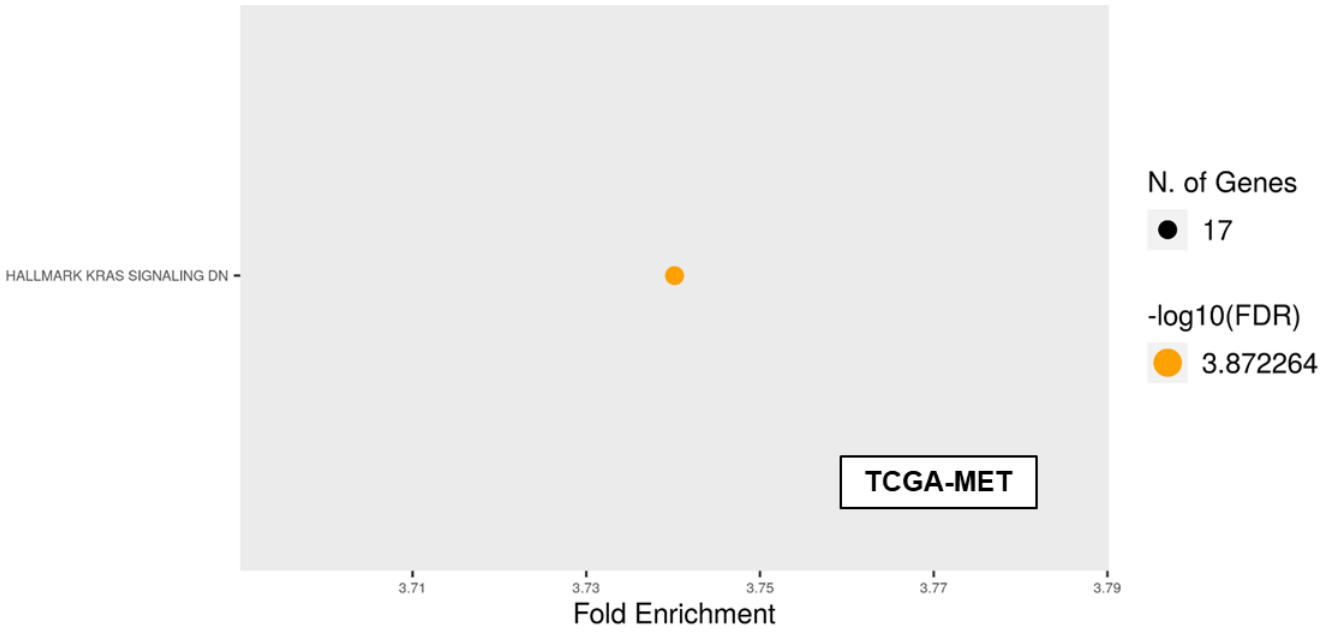
RYK DN. Hallmark.

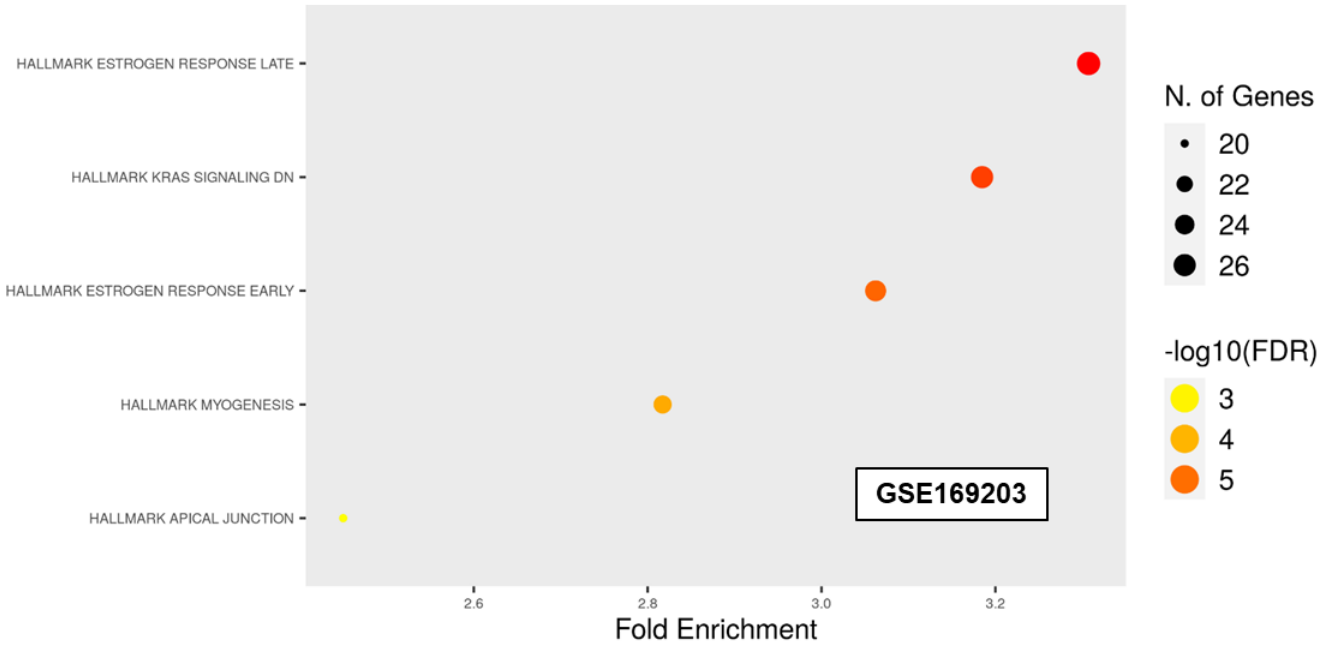


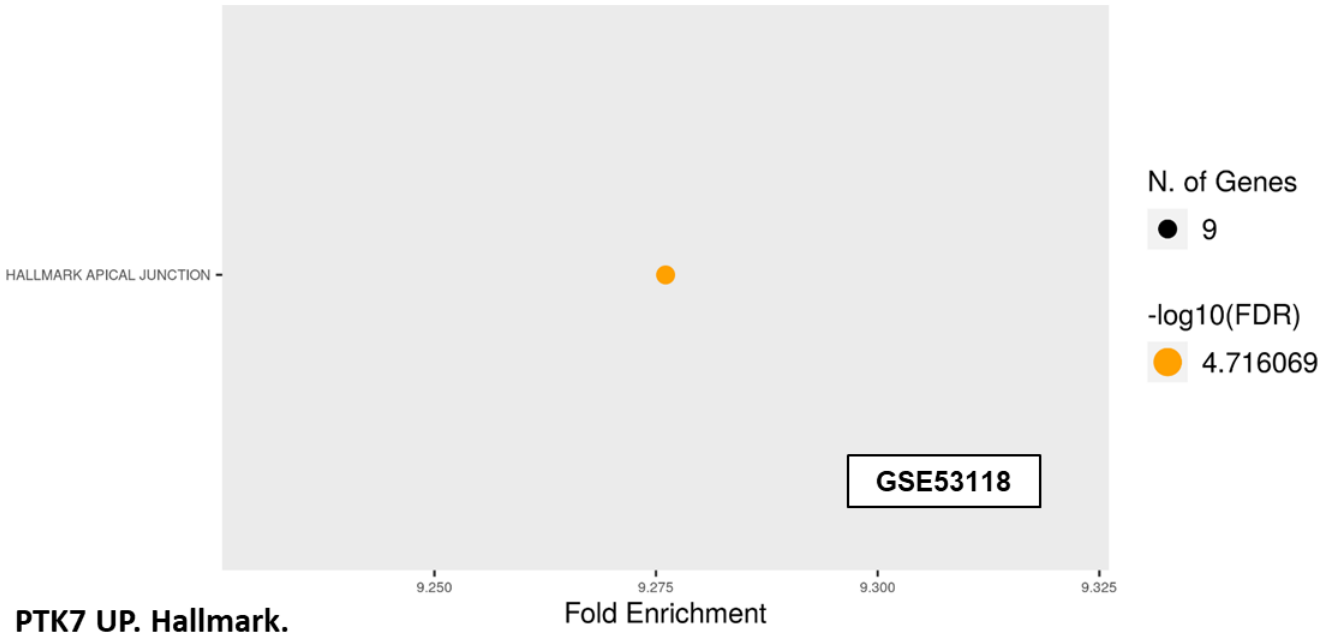
RYK DN. Msig Oncogenic.



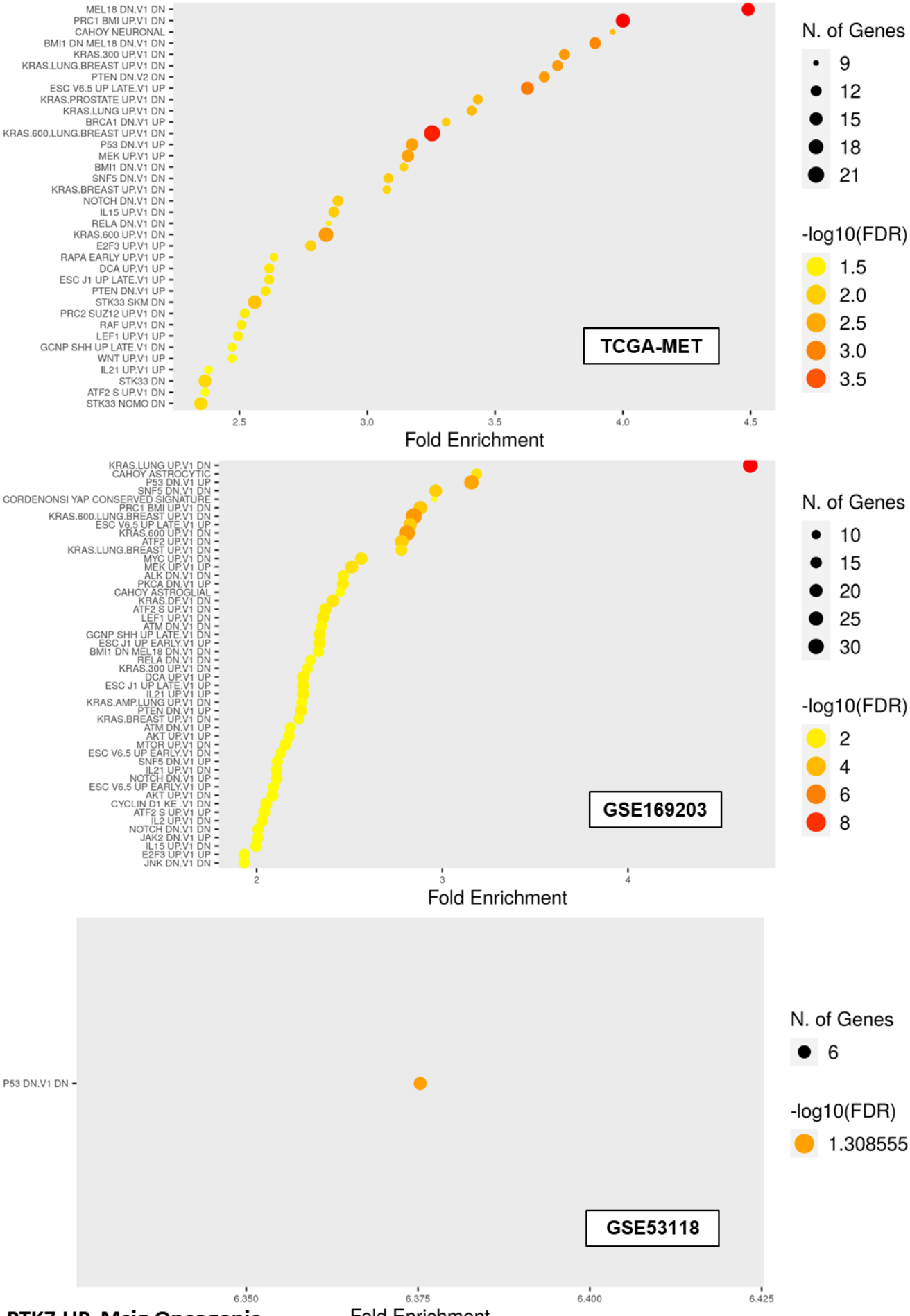
PTK7 UP. Biological Process.



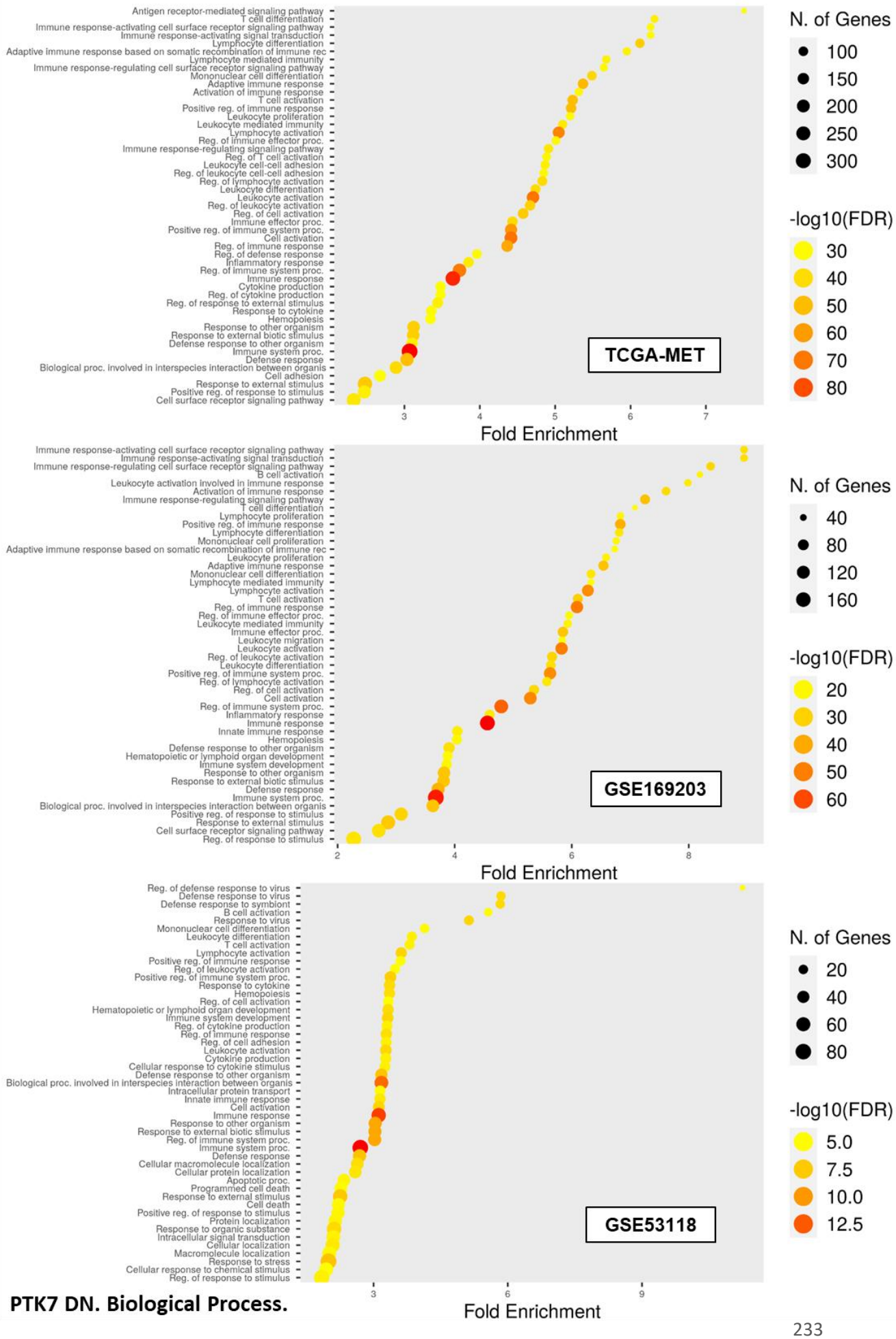




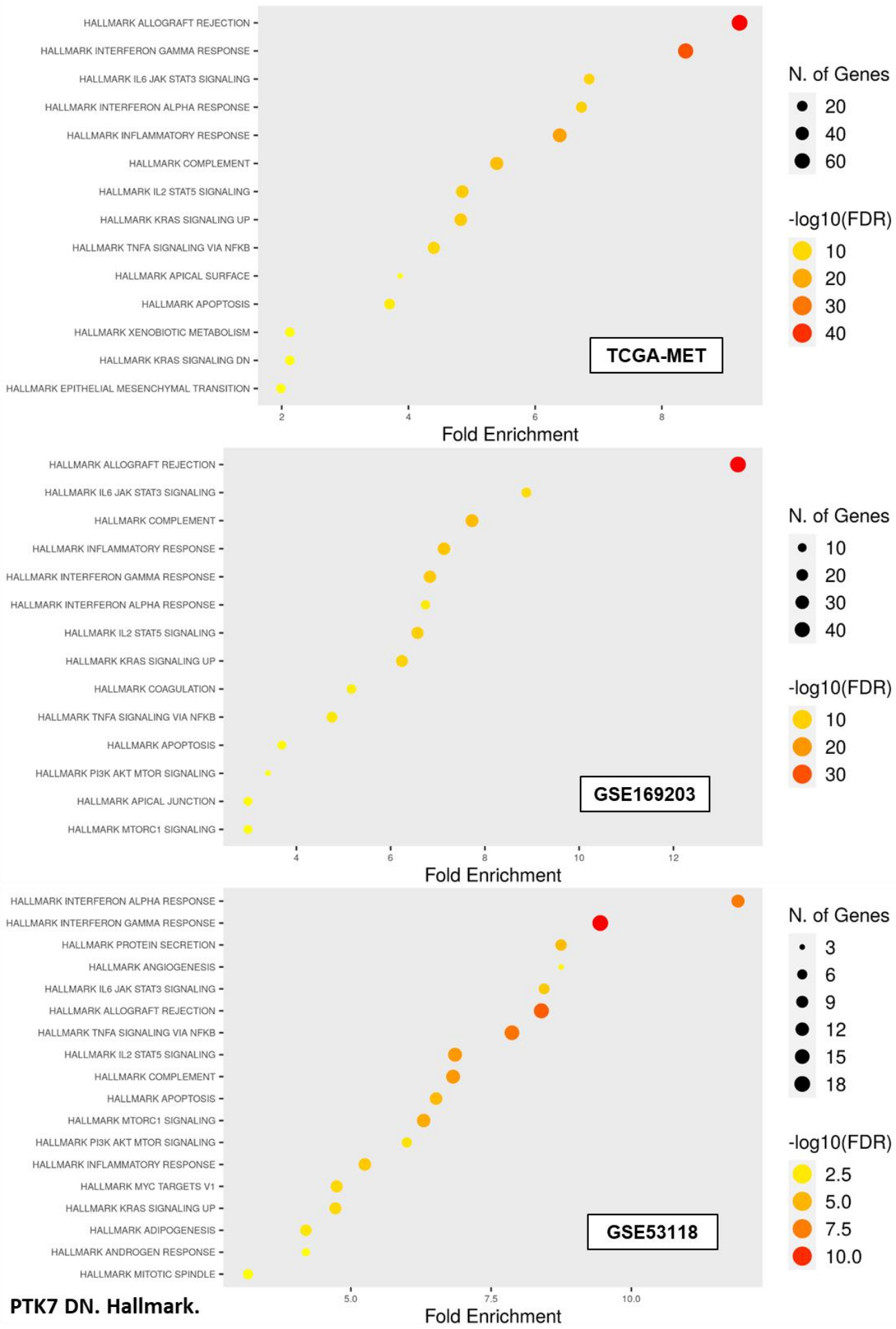
PTK7 UP. Hallmark.



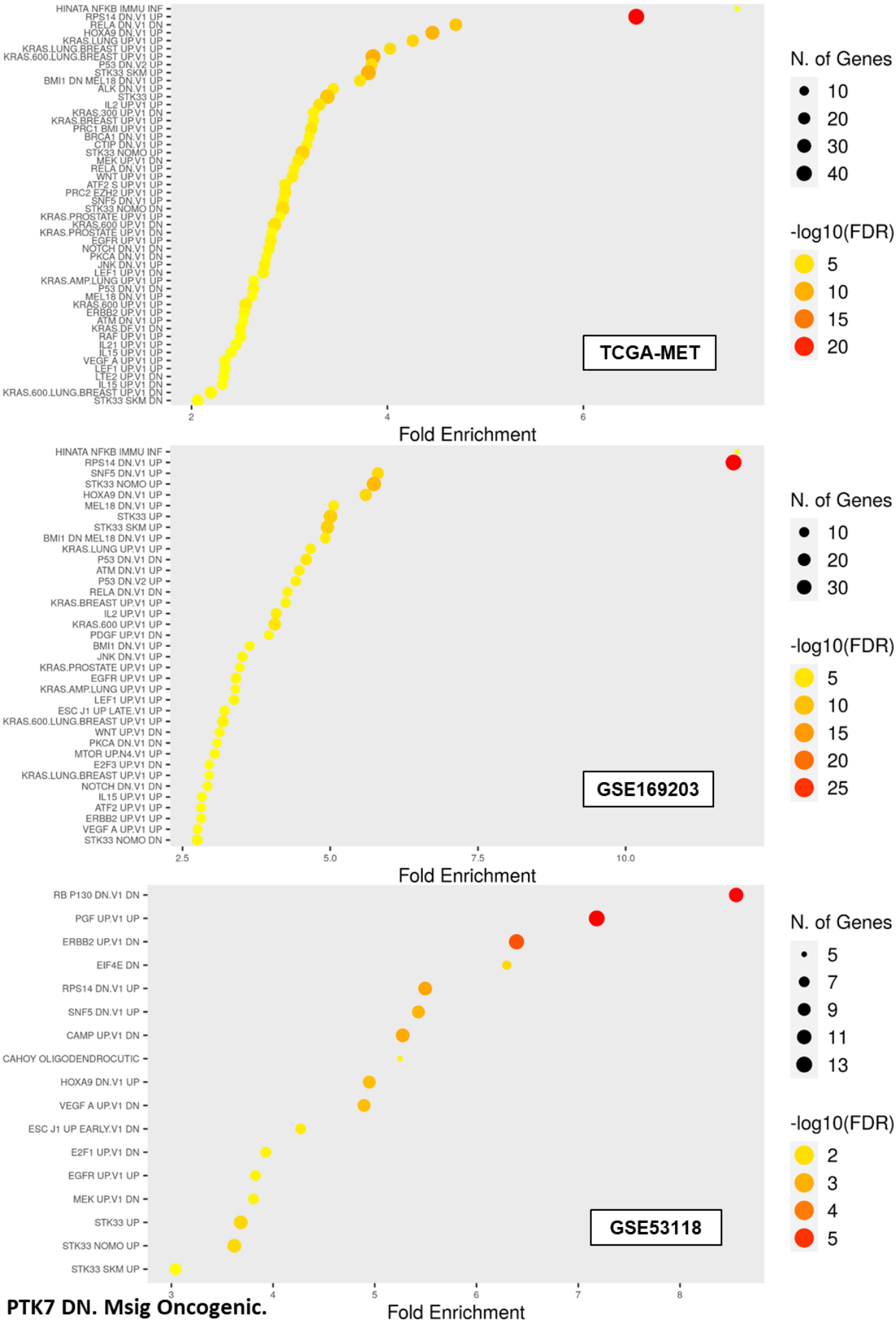
PTK7 UP. Msig Oncogenic.



PTK7 DN. Biological Process.



PTK7 DN. Hallmark.



PTK7 DN. Msig Oncogenic.

D.4 Enriquecimiento de los DEGs UP y DN de ROR2, RYK y PTK7 para la categoría “Biological Process”.

Se muestran las firmas genéticas enriquecidas de los DEGs UP y DN de ROR2, RYK y PTK7 para la categoría “Biological Process”.” en los tres datasets analizados de melanomas PRI o MET obtenidas en ShinyGo 0.80. (*) Firma genética enriquecida en dos de los tres datasets analizados para las muestras PRI o MET. DEGs: genes diferencialmente expresados, UP: DEGs de alta expresión, DN: DEGs de baja expresión, PRI: primario, MET: metastásico.

Receptor	Enriquecimiento-DEGs UP		Enriquecimiento-DEGs DN	
	Primario	Metastásico	Primario	Metastásico
ROR2	Extracellular matrix organization Extracellular structure organization External encapsulating structure organization Circulatory system development Vasculature development Tube development Blood vessel development Biological adhesion Cell adhesion Anatomical structure formation involved in morphogenesis Tube morphogenesis Animal organ morphogenesis Cell migration Blood vessel morphogenesis Angiogenesis Locomotion Cell motility Localization of cell Reg. of cell migration Skeletal system development Reg. of locomotion Reg. of cellular component movement Reg. of multicellular organismal development Pos. reg. of developmental proc. Reg. of cell population proliferation Enzyme linked receptor protein signaling pathway Pos. reg. of cell migration Pos. reg. of multicellular organismal proc. Pos. reg. of cellular component movement Pos. reg. of locomotion Reg. of cell differentiation Neg. reg. of multicellular organismal proc. Response to wounding Cell-cell signaling Pos. reg. of cell differentiation Epithelial cell proliferation Taxis Circulatory system proc. Chemotaxis Pos. reg. of cell communication Blood circulation Pos. reg. of cell population proliferation Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway Urogenital system development Pos. reg. of signaling Renal system development Cell-cell adhesion Pos. reg. of signal transduction Cell junction organization Homeostatic proc. Response to oxygen-containing compound Pos. reg. of cytosolic calcium ion concentration Neg. reg. of response to stimulus Pos. reg. of intracellular signal transduction Pos. reg. of phosphorus metabolic proc. Reg. of system proc. Pos. reg. of phosphorylation Reg. of MAPK cascade Pos. reg. of MAPK cascade Pos. reg. of protein phosphorylation Ion homeostasis Response to lipid Chemical homeostasis Metal ion homeostasis Reg. of phosphorylation Divalent inorganic cation homeostasis Reg. of protein phosphorylation Reg. of transport Reg. of phosphate metabolic proc. Inorganic ion homeostasis	Biological adhesion Cell adhesion Cell migration Locomotion Cell-cell adhesion Reg. of multicellular organismal development Pos. reg. of multicellular organismal proc. Cell motility Localization of cell Extracellular matrix organization Extracellular structure organization External encapsulating structure organization Circulatory system development Vasculature development Blood vessel development Reg. of cell migration Pos. reg. of developmental proc. Tube development Tube morphogenesis Reg. of locomotion Neg. reg. of multicellular organismal proc. Taxis Blood vessel morphogenesis Reg. of cellular component movement Reg. of cell population proliferation Angiogenesis Anatomical structure formation involved in morphogenesis Reg. of cell differentiation Skeletal system development Pos. reg. of locomotion Pos. reg. of cell communication Pos. reg. of cellular component movement Animal organ morphogenesis Pos. reg. of signaling Homeostatic proc. Enzyme linked receptor protein signaling pathway Reg. of anatomical structure morphogenesis Pos. reg. of cell differentiation Response to oxygen-containing compound Neg. reg. of developmental proc. Ossification Urogenital system development Cell-substrate adhesion Response to growth factor Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway Cellular response to growth factor stimulus Connective tissue development Epithelial cell proliferation Response to endogenous stimulus Neg. reg. of cell population proliferation Reg. of cellular response to growth factor stimulus Cartilage development Neg. reg. of locomotion Inflammatory response (*) Cell activation (*) Leukocyte activation (*) Chemotaxis (*) Leukocyte migration (*) Leukocyte differentiation (*) Pos. reg. of immune system proc. (*) Cell chemotaxis (*) Hematopoietic or lymphoid organ development (*) Immune system development (*) Immune effector proc. (*) Response to cytokine (*) Reg. of chemotaxis (*) Cellular response to cytokine stimulus (*) Leukocyte chemotaxis (*) Reg. of vasculature development (*) Reg. of angiogenesis (*) Cytokine production (*) Neg. reg. of immune system proc. (*) Reg. of leukocyte migration (*) Reg. of cytokine production (*) Pos. reg. of chemotaxis (*) Pos. reg. of angiogenesis (*) Pos. reg. of vasculature development (*) Myeloid leukocyte migration (*) Granulocyte migration (*) Reg. of leukocyte chemotaxis (*) Pos. reg. of leukocyte migration (*)	——	Pigmentation Developmental pigmentation Pigment cell differentiation Melanocyte differentiation

RYK	——	Brain development Head development Central nervous system development	Leukocyte activation Cell activation Immune effector proc. Leukocyte mediated immunity Reg. of cell activation T cell activation Leukocyte activation involved in immune response Lymphocyte activation Leukocyte differentiation Pos. reg. of immune system proc. Reg. of lymphocyte activation Reg. of T cell activation Biological adhesion Cell adhesion Mononuclear cell differentiation Leukocyte cell-cell adhesion T cell differentiation Leukocyte migration Response to cytokine Pos. reg. of T cell activation Pos. reg. of leukocyte activation Hematopoietic or lymphoid organ development Pos. reg. of leukocyte cell-cell adhesion Lymphocyte differentiation Reg. of cell adhesion Hemopoiesis Reg. of leukocyte cell-cell adhesion Immune system development Inflammatory response Reg. of cell-cell adhesion Cellular response to cytokine stimulus Leukocyte proliferation Reg. of mononuclear cell proliferation Reg. of immune response Mononuclear cell proliferation Reg. of cell population proliferation Cytokine-mediated signaling pathway Adaptive immune response Cell-cell adhesion Reg. of lymphocyte proliferation Adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors buil Lymphocyte proliferation Neg. reg. of immune system proc. Response to other organism Response to external biotic stimulus Reg. of response to external stimulus Pos. reg. of immune response Reg. of lymphocyte differentiation Reg. of hemopoiesis Reg. of T cell differentiation Lymphocyte mediated immunity B cell activation Reg. of defense response Defense response to other organism Reg. of immune effector proc. Innate immune response Cytokine production Alpha-beta T cell activation Neg. reg. of leukocyte activation Reg. of cytokine production Activation of immune response Interferon-gamma production Positive T cell selection Reg. of B cell activation Reg. of leukocyte mediated immunity Pos. reg. of cytosolic calcium ion concentration Pos. reg. of lymphocyte proliferation Reg. of interferon-gamma production Immune response-activating cell surface receptor signaling pathway Immune response-activating signal transduction	Leukocyte activation Cell activation Leukocyte activation involved in immune response Immune effector proc. Myeloid cell activation involved in immune response Leukocyte mediated immunity Lymphocyte activation Myeloid leukocyte activation Exocytosis Myeloid leukocyte mediated immunity Reg. of leukocyte activation Leukocyte degranulation Leukocyte differentiation Mononuclear cell differentiation Regulated exocytosis Neutrophil activation involved in immune response Neutrophil mediated immunity Secretion Neutrophil degranulation Neutrophil activation Granulocyte activation Export from cell Reg. of lymphocyte activation Secretion by cell Biological adhesion Cell adhesion Homeostatic proc. Cell-cell adhesion Hematopoietic or lymphoid organ development Reg. of multicellular organismal development Pos. reg. of leukocyte activation Reg. of cell population proliferation Pos. reg. of immune system proc. Hemopoiesis Leukocyte migration Immune system development Cell migration Locomotion Cell motility Localization of cell Pos. reg. of lymphocyte activation Adaptive immune response Cellular chemical homeostasis B cell activation Cellular cation homeostasis Reg. of myeloid leukocyte mediated immunity Reg. of immune effector proc. Neg. reg. of multicellular organismal proc. Phagocytosis Metal ion homeostasis Pos. reg. of intracellular signal transduction Cellular metal ion homeostasis Pos. reg. of cell communication Pos. reg. of signal transduction Pos. reg. of signaling

PTK7	Animal organ morphogenesis (*) Embryonic morphogenesis (*) Embryo development (*) Neurogenesis (*) Hair follicle development (*) Molting cycle proc. (*) Hair cycle proc. (*) Kidney development (*) Renal system development (*) Skeletal system development (*) Sensory organ development (*) Cell junction organization (*) Tissue morphogenesis (*) Epithelium development (*) Cell projection organization (*) Cell adhesion (*) Biological adhesion (*) Skin epidermis development (*) Reg. of Wnt signaling pathway (*) Neuron differentiation (*) Kidney epithelium development (*) Kidney morphogenesis (*) Nephron tubule development (*) Renal tubule development (*) Ossification (*) Neg. reg. of developmental proc. (*) Generation of neurons (*) Sensory organ morphogenesis (*) Urogenital system development (*) Cell-cell signaling (*) Plasma membrane bounded cell projection organization (*) Tube development (*) Morphogenesis of an epithelium (*) Axon development (*) Mesenchyme development (*) Cell-cell junction organization (*) Nephron epithelium development (*) Cell junction assembly (*) Locomotion (*) Nephron tubule morphogenesis (*) Nephron epithelium morphogenesis (*) Wnt signaling pathway (*) Cell-cell signaling by wnt (*) Renal tubule morphogenesis (*) Axonogenesis (*) Cell morphogenesis (*) Cell surface receptor signaling pathway involved in cell-cell signaling (*) Cell morphogenesis involved in differentiation (*) Tube morphogenesis (*) Reg. of cell population proliferation (*) Cell migration (*) Circulatory system development (*) Epithelial tube morphogenesis (*) Notochord development (*) Ureteric bud development (*) Mesonephric epithelium development (*) Mesonephric tubule development (*) Extracellular matrix organization (*) Extracellular structure organization (*) Morphogenesis of embryonic epithelium (*) Axon guidance (*) External encapsulating structure organization (*) Neuron projection guidance (*) Anatomical structure formation involved in morphogenesis (*) Mesonephros development (*) Embryonic organ morphogenesis (*) Eye development (*) Neg. reg. of Wnt signaling pathway (*) Visual system development (*) Mesenchymal cell differentiation (*) Sensory system development (*) Ureteric bud morphogenesis (*) Reg. of cellular component biogenesis (*) Neg. reg. of hair follicle development (*) Mesonephric tubule morphogenesis (*) Cell motility (*) Localization of cell (*) Neuron projection development (*) Camera-type eye development (*) Cell morphogenesis involved in neuron differentiation (*) Neg. reg. of signal transduction (*) Neg. reg. of cell communication (*) Gland morphogenesis (*) Neg. reg. of signaling (*) Lung-associated mesenchyme development (*) Axis elongation (*) Vasculature development (*) Neuron development (*) Camera-type eye morphogenesis (*) Renal vesicle formation (*) Tissue homeostasis (*) Embryonic organ development (*) Neg. reg. of multicellular organismal proc. (*) Neural crest cell development (*) Skin development (*) Neuron projection morphogenesis (*) Heart development (*) Metanephros development (*) Mesenchymal cell development (*) Metanephric nephron development (*) Stem cell development (*) Plasma membrane bounded cell projection morphogenesis (*) Cell projection morphogenesis (*) Cellular component morphogenesis (*) Odontogenesis of dentin-containing tooth (*) Reg. of locomotion (*) Epithelial cell proliferation (*) Blood vessel development (*) Neg. reg. of cell differentiation (*) Mesenchymal cell proliferation (*) Cell part morphogenesis (*) Eye morphogenesis (*) Anatomical structure homeostasis (*) Muscle structure development (*) Glial cell differentiation (*) Epithelial cell differentiation (*) Epidermis development (*) Blood vessel morphogenesis (*) Ameboidal-type cell migration (*) Chordate embryonic development (*) Hippo signaling (*) Heart morphogenesis (*) Cell-cell adhesion (*) Neg. reg. of cell population proliferation (*)	Embryo development Neurogenesis Animal organ morphogenesis Neuron differentiation Pattern specification proc. Generation of neurons Embryonic morphogenesis Tube development Tube morphogenesis Urogenital system development Tissue morphogenesis Neuron development Skeletal system development Embryo development ending in birth or egg hatching Chordate embryonic development Sensory organ development Renal system development Morphogenesis of an epithelium Cell morphogenesis Neuron projection development Kidney development Neg. reg. of developmental proc. Epithelial tube morphogenesis Axon development Neuron projection morphogenesis Central nervous system development Epithelium development Axon guidance Neuron projection guidance Plasma membrane bounded cell projection morphogenesis Circulatory system development Anatomical structure formation involved in morphogenesis Cell projection morphogenesis Axonogenesis Cell morphogenesis involved in neuron differentiation Cell part morphogenesis Cell morphogenesis involved in differentiation Reg. of cell differentiation Homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules Locomotion Cellular component morphogenesis Mesenchyme development Ossification Pos. reg. of developmental proc. Cell adhesion Biological adhesion Pos. reg. of cell differentiation Heart development Enzyme linked receptor protein signaling pathway Morphogenesis of embryonic epithelium Heart morphogenesis Cell-cell adhesion Embryonic epithelial tube formation Cell migration Epithelial tube formation Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway Tube formation Morphogenesis of a branching epithelium	——	Lymphocyte activation Leukocyte activation Cell activation Pos. reg. of immune system proc. T cell activation Adaptive immune response Lymphocyte differentiation Reg. of leukocyte activation Reg. of immune response Mononuclear cell differentiation Reg. of lymphocyte activation Pos. reg. of immune response Leukocyte differentiation Response to other organism Response to external biotic stimulus Leukocyte cell-cell adhesion Reg. of T cell activation T cell differentiation Immune effector proc. Reg. of leukocyte cell-cell adhesion Cytokine-mediated signaling pathway Pos. reg. of leukocyte activation Response to cytokine Inflammatory response Cellular response to cytokine stimulus Adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors buil Pos. reg. of leukocyte cell-cell adhesion Cell adhesion Biological adhesion Reg. of cell-cell adhesion Leukocyte proliferation Pos. reg. of T cell activation Pos. reg. of lymphocyte activation Reg. of cell adhesion Defense response to other organism Lymphocyte proliferation Cytokine production Mononuclear cell proliferation Cell-cell adhesion Reg. of cytokine production Reg. of response to external stimulus Hemopoiesis B cell activation Immune system development Hematopoietic or lymphoid organ development Reg. of lymphocyte proliferation Reg. of mononuclear cell proliferation Innate immune response Pos. reg. of cytokine production Reg. of defense response Alpha-beta T cell activation Immune response-regulating signaling pathway Pos. reg. of cell adhesion Activation of immune response Pos. reg. of response to external stimulus Immune response-activating cell surface receptor signaling pathway Immune response-activating signal transduction Leukocyte activation involved in immune response Pos. reg. of multicellular organismal proc. Lymphocyte activation involved in immune response Reg. of response to stress Reg. of B cell activation Response to bacterium Pos. reg. of defense response B cell proliferation Pos. reg. of gene expression Reg. of response to biotic stimulus Pos. reg. of signal transduction Pos. reg. of cell communication Pos. reg. of signaling Reg. of innate immune response Reg. of B cell proliferation Pos. reg. of response to biotic stimulus

D. 5 Enriquecimiento de los DEGs UP y DN de ROR2, RYK y PTK7 para la categoría “Oncogenic MSigDb”.

Se muestran las firmas genéticas enriquecidas de los DEGs UP y DN de ROR2, RYK y PTK7 para la categoría “Oncogenic MSigDb” en los tres datasets analizados de melanomas PRI o MET obtenidas en ShinyGo 0.80. PRI: primarios, MET: metastásicos.

Receptor	Enriquecimiento-DEGs UP		Enriquecimiento-DEGs DN	
	Primario	Metastásico	Primario	Metastásico
ROR2	P53 DN.V1 UP BMI1 DN.V1 UP ATF2 S UP.V1 DN MEL18 DN.V1 UP ESC V6.5 UP EARLY.V1 DN ATF2 UP.V1 DN CAHOY ASTROGLIAL PRC2 EZH2 UP.V1 UP CSR LATE UP.V1 DN ESC J1 UP LATE.V1 UP MEK UP.V1 UP KRAS.600 UP.V1 DN AKT UP.V1 DN PTEN DN.V1 UP RPS14 DN.V1 UP KRAS.600.LUNG.BREAST UP.V1 DN LEF1 UP.V1 UP EGFR UP.V1 UP RAF UP.V1 DN KRAS.LUNG.BREAST UP.V1 DN E2F1 UP.V1 DN SNF5 DN.V1 DN ATM DN.V1 DN KRAS.300 UP.V1 DN JNK DN.V1 UP WNT UP.V1 UP RB P107 DN.V1 UP MTOR UP.V1 DN ESC J1 UP EARLY.V1 UP LEF1 UP.V1 DN ERBB2 UP.V1 UP ESC V6.5 UP LATE.V1 UP SNF5 DN.V1 UP NFE2L2.V2 KRAS.BREAST UP.V1 DN BRCA1 DN.V1 UP KRAS.KIDNEY UP.V1 DN BMI1 DN MEL18 DN.V1 DN PRC1 BMI UP.V1 UP LTE2 UP.V1 UP CYCLIN D1 KE .V1 DN KRAS.LUNG UP.V1 UP KRAS.KIDNEY UP.V1 UP JAK2 DN.V1 UP CORDENONSI YAP CONSERVED SIGNATURE AKT UP MTOR DN.V1 DN PRC2 SUZ12 UP.V1 UP PGF UP.V1 DN RAF UP.V1 UP STK33 NOMO DN IL15 UP.V1 DN PTEN DN.V1 DN KRAS.600 UP.V1 UP IL21 UP.V1 UP STK33 SKM DN STK33 DN KRAS.PROSTATE UP.V1 DN JNK DN.V1 DN IL2 UP.V1 DN KRAS.PROSTATE UP.V1 UP KRAS.600.LUNG.BREAST UP.V1 UP KRAS.AMP.LUNG UP.V1 UP CRX NRL DN.V1 DN CTIP DN.V1 UP	KRAS.600 UP.V1 UP ATF2 S UP.V1 DN KRAS.600.LUNG.BREAST UP.V1 UP PRC2 EZH2 UP.V1 UP MEL18 DN.V1 UP BMI1 DN MEL18 DN.V1 UP ATF2 UP.V1 DN LEF1 UP.V1 UP P53 DN.V1 UP BMI1 DN.V1 UP CAHOY ASTROGLIAL ESC V6.5 UP EARLY.V1 DN MEK UP.V1 UP PTEN DN.V1 UP KRAS.600 UP.V1 DN KRAS.300 UP.V1 UP ESC J1 UP LATE.V1 UP EGFR UP.V1 UP TGFB UP.V1 UP E2F1 UP.V1 DN CSR LATE UP.V1 DN AKT UP.V1 DN PTEN DN.V2 UP KRAS.KIDNEY UP.V1 DN PTEN DN.V1 DN MYC UP.V1 DN JNK DN.V1 DN JAK2 DN.V1 UP KRAS.300 UP.V1 DN KRAS.PROSTATE UP.V1 DN BMI1 DN MEL18 DN.V1 DN ESC V6.5 UP LATE.V1 UP NOTCH DN.V1 DN BRCA1 DN.V1 UP CRX DN.V1 DN AKT UP MTOR DN.V1 DN MTOR UP.V1 DN VEGF A UP.V1 UP RAF UP.V1 DN ATM DN.V1 DN LEF1 UP.V1 DN CORDENONSI YAP CONSERVED SIGNATURE KRAS.LUNG.BREAST UP.V1 DN KRAS.PROSTATE UP.V1 UP RAPA EARLY UP.V1 UP PGF UP.V1 DN LTE2 UP.V1 UP ESC J1 UP EARLY.V1 UP RB P107 DN.V1 UP	———	P53 DN.V1 DN
RYK	———	———	RELA DN.V1 DN IL2 UP.V1 UP IL21 UP.V1 UP KRAS.600.LUNG.BREAST UP.V1 UP	P53 DN.V1 DN RPS14 DN.V1 UP VEGF A UP.V1 UP CYCLIN D1 KE .V1 DN SNF5 DN.V1 UP KRAS.KIDNEY UP.V1 DN
PTK7	———	———	———	RPS14 DN.V1 UP STK33 SKM UP HOXA9 DN.V1 UP STK33 UP STK33 NOMO UP EGFR UP.V1 UP SNF5 DN.V1 UP