

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**SILENCIAMIENTO DE WT1 CON RNAi Y SU COMBINACIÓN
CON DOXORRUBICINA Y CISPLATINO EN UN
MODELO MURINO DE MELANOMA**

Por

Q.B.P. EDGAR MANILLA MUÑOZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS
con acentuación en Inmunobiología**

Mayo, 2012

**SILENCIAMIENTO DE WT1 CON RNAi Y SU COMBINACIÓN
CON DOXORRUBICINA Y CISPLATINO EN UN
MODELO MURINO DE MELANOMA**

Comisión de Tesis

Dr. Pablo Zapata Benavides
Director de Tesis

Dra. Diana Elisa Zamora Ávila
Secretario

Dra. Laura María Trejo Ávila
Vocal

“...no hay nada más difícil de emprender, ni más dudoso de hacer triunfar, ni más peligroso de manejar que tomar la iniciativa de introducir un nuevo orden en las cosas; el innovador se transforma en enemigo de todos los que se beneficiaban con el antiguo sistema, y no se granjea sino la amistad tibia de los que se beneficiarán con el cambio. La gente teme y desconfía de la persona que promueve el cambio y se resiste a creer en nuevas ideas hasta ver sus frutos”.

Nicolás Maquiavelo.

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, bajo la dirección del Dr. Pablo Zapata Benavides

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar doy gracias a Dios por las tantas bendiciones recibidas hasta hoy.

A mis padres y hermanos por ser impulsores de mi crecimiento personal y profesional, por animarme a seguir adelante, por tener siempre palabras y cosas buenas hacia mi persona.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico otorgado a través de una beca de estudios.

Al Dr. Pablo Zapata Benavides por ser un excelente asesor y un gran ser humano, pero sobre todo por ser amigo. Muchas gracias por su paciencia y enseñanzas (que no se limitan a lo académico), también por su sinceridad y apoyo incondicional.

A la Dra. Diana Zamora, por su amistad y por ser un ejemplo a seguir para muchos de los que estamos en el Laboratorio y hemos tenido el privilegio de conocerla.

A la Dra. Laura Trejo, por su interés en mi formación y su gran calidad como persona y como científica. Gracias por sus enseñanzas y por la meticulosa revisión de esta tesis.

De igual manera expreso mi agradecimiento a los Dres. Moisés Franco, Edgar Mendoza, Lydia Rivera, Ricardo Gómez y Diana Reséndez, quienes han sido muy importantes en este peldaño de mi formación.

Mil gracias también a todos mis amigos del laboratorio: Chago, Fer, Reina, Kary, Luisa, Debby, Ash, Carlos, Augusto, Evelyn, Mariel. Gracias por sus todos sus consejos, críticas y sugerencias, por su paciencia y apoyo.

Agradezco también a los maestros Máximo Eugenio Román, José Luis Méndez y Esther Treviño Holten, por estar pendientes de mí, por su valiosa amistad y guía.

A más amigos del LIV: Beto, Regina, Itza, Teo, Beto, Faby, Cristel, Luis Felipe, Luis Antonio, Diana, Citlali, Salomé, Jeannie, Claudio, Ángel y Nancyta, por su absoluta disponibilidad siempre que requerí su ayuda.

Y a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron a la conclusión de esta meta. Mil gracias!

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	iv
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	4
3. OBJETIVOS	5
3.1. Objetivo General	5
3.2. Objetivos Particulares	5
4. ANTECEDENTES	6
4.1. Cáncer de piel	6
4.2. Melanoma	6
4.3. Epidemiología	7
4.4. Factores de riesgo	8
4.5. Diagnóstico	9
4.5.1. Diagnóstico Clínico	10
4.5.2. Diagnóstico Histológico	11
4.6. Estadificación y pronóstico	12
4.7. Tratamiento	13
4.8. Terapia Génica	15
4.8.1. Terapia Génica dirigida a células de tumor	16
4.8.2. Terapia de silenciamiento génico	17
4.9. RNA de interferencia (RNAi)	18

4.10. RNAi en la lucha contra melanoma	20
4.11. Gen del Tumor de Wilm's (<i>wt1</i>)	21
4.12. Estructura de <i>wt1</i>	23
4.13. WT1 en cáncer	24
4.14. WT1 en melanoma	25
4.15. Estrategia experimental	27
5. MATERIAL Y MÉTODOS	29
5.1. Cultivo celular y animales	29
5.2. Construcción de plásmido que codifica para el RNAi dirigido contra WT1.	29
5.3. Transformación de bacterias <i>E. coli</i> DH5 α calcio competentes	30
5.4. Verificación y extracción a gran escala de los plásmidos pEGFP-N2 y WT1-1	30
5.5. Preparación de stock de polietilenimina (PEI)	31
5.6. Transfección <i>in vitro</i> y análisis de expresión de los plásmidos pEGFP-N2 y WT1-1 células de melanoma B16F10	31
5.7. Extracción y cuantificación de proteínas	32
5.8. Western Blot	32
5.8.1. Preparación de las muestras	32
5.8.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida	33
5.8.3. Transferencia a membrana de nitrocelulosa	33
5.8.4. Inmunodetección	33
5.9. Establecimiento del modelo de melanoma	34
5.10. Preparación de complejos plásmido-PEI para los tratamientos <i>in vivo</i>	35
5.11. Tratamiento con Cisplatino y Doxorrubicina	35
5.12. Combinación de WT1-1, Cisplatino y Doxorrubicina	36
5.13. Medición del peso de ratones	36
5.14. Obtención de masa e índice tumoral	36
5.15. Análisis estadístico	36
6. RESULTADOS	37

6.1. Verificación de los plásmidos pEGFP-N2 y WT1-1	37
6.2. Análisis de expresión y funcionalidad de los plásmidos pEGFP-N2 y WT1-1 en células B16F10	37
6.3. Inducción del tumor con células B16F10 inoculadas vía subcutánea	38
6.4. Monitoreo del peso de los ratones durante el experimento	38
6.5. Medición de masa tumoral en ratones tratados y no tratados	41
6.6. Obtención del índice tumoral en ratones tratados y no tratados	42
7. DISCUSIÓN	44
8. CONCLUSIONES	49
LITERATURA CITADA	50
RESUMEN BIOGRÁFICO	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	página
Tabla 1. Sistema de clasificación TNM para melanoma maligno.	13
Tabla 2. Rangos de supervivencia a 5 años para pacientes con melanoma.	13
Tabla 3. Ejemplos de investigaciones <i>in vitro</i> y/o <i>in vivo</i> que han utilizado RNA de interferencia para silenciar genes asociados a proliferación, invasividad y metástasis de melanoma.	20
Tabla 4. Genes que son blancos transcripcionales de <i>wtl</i> .	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Mecanismo de silenciamiento génico por RNA de interferencia.	19
Figura 2. Estructura del gen <i>wtl</i> .	23
Figura 3. Esquema de administración de tratamientos con pEGFP-N2, WT1-1 cisplatino y doxorubicina.	35
Figura 4. Visualización de los plásmidos 1) pEGFP-N2 y 2) WT1-1 en gel de agarosa al 0.8% teñido con Bromuro de etidio.	37
Figura 5. Efecto producido sobre células B16F10 por pEGFP-N2 y WT1-1 con expresión de la proteína reportera GFP.	37
Figura 6. Establecimiento de tumor subcutáneo en hembra C57BL6.	38
Figura 7. Cinética del peso promedio de los grupos de ratones C57BL6.	39
Figura 8. Estado físico de ratones C57BL6 en cuatro grupos experimentales.	41
Figura 9. Necropsia de ratones C57BL6.	42
Figura 10. Peso de los tumores de los grupos control y tratados con único agente o en combinación.	42
Figura 11. Índice tumoral obtenido para los grupos control y tratados con único agente o en combinación.	43

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac.	<i>Anticuerpo</i>
BCG	<i>Bacilo de Calmette-Guerin</i>
bFGF	<i>Factor de crecimiento de fibroblastos básico</i>
°C	<i>Grados Celsius</i>
Caspasa	<i>Cisteín-aspartato-proteasa</i>
CBDT	<i>Cisplatino-Carmustina-Dacarbazina-Tamoxifeno</i>
CCNU	<i>Lomustina</i>
CO₂	<i>Dióxido de carbono</i>
DTIC	<i>Dacarbazina</i>
ELISA	<i>Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima</i>
g	<i>Gramo</i>
H₂O	<i>Agua</i>
IL-2	<i>Interleucina 2</i>
IL-8	<i>Interleucina 8</i>
IFNα2b	<i>Interferón alfa 2b</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>
mg	<i>Miligramo</i>
μg	<i>Microgramo</i>
min.	<i>Minuto</i>
ml	<i>Mililitro</i>

μl	<i>Microlitro</i>
mM	<i>Milimolar</i>
NaCl	<i>Cloruro de sodio</i>
ng	<i>Nanogramo</i>
nm	<i>Nanómetro</i>
O₂	<i>Oxígeno</i>
PARP	<i>Poli (ADP-ribosa) polimerasa</i>
PBS	<i>Amortiguador fosfato salino</i>
PCR	<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>
PDGF	<i>Factor de crecimiento derivado de plaquetas</i>
pg	<i>Picogramo</i>
pH	<i>Potencial de hidrógeno</i>
rpm	<i>Revoluciones por minuto</i>
SDS	<i>Dodecil sulfato de sodio</i>
TBS	<i>Amortiguador tris salino</i>
Tie-2	<i>Receptor endotelial de tirosina quinasa</i>
V	<i>Volt</i>
VEGF	<i>Factor de crecimiento del endotelio vascular</i>
VEGF-R2	<i>Receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular</i>

RESUMEN

El gen del tumor de Wilm's (WT1) codifica para un factor de transcripción que modula la expresión de varios genes involucrados en proliferación y apoptosis. WT1 se sobreexpresa en numerosos tumores tanto hematológicos como sólidos, incluyendo melanoma. El objetivo de este trabajo fue investigar si el silenciamiento de WT1 con el ARN de interferencia denominado WT1-1 era capaz de sinergizar *in vivo* con el efecto antitumoral de los agentes quimioterapéuticos doxorubicina y cisplatino, así como evaluar la inocuidad de la terapia. Se inocularon vía subcutánea 5×10^5 células B16F10 en ratones hembra C57BL6. Se formaron 7 grupos experimentales con 5 ratones cada uno; el día 3 post inoculación y cada tercer día se administraron las diferentes dosis de tratamiento por vía intraperitoneal. Grupos: 1) Control negativo (C-), 2) 50 μ g pEGFP-N2, 3) 50 μ g WT1-1, 4) Doxorubicina 5mg/kg, 5) Cisplatino 5mg/kg, 6) 50 μ g WT1-1+Doxorubicina 5mg/kg, y 7) 50 μ g WT1-1+ Cisplatino 5mg/kg. El peso promedio de los grupos de ratones no mostró cambios significativos durante el estudio, excepto para los grupos tratados con Doxorubicina y WT1-1+Doxorubicina, en los cuales hubo una reducción drástica de 27g de peso inicial a 20g y 17g, respectivamente. A los 9 días post inoculación de las células se hizo evidente el tumor en los grupos C- y pEGFP-N2; el día 15 en los grupos WT1-1, Cisplatino y WT1-1+Cisplatino; el día 24 en Doxorubicina, mientras los tumores de WT1-1+Doxorubicina no fueron evidentes hasta la necropsia. Se observó una disminución significativa ($p=0.05$) en peso y volumen de la masa tumoral en ratones tratados con WT1-1, Doxorubicina y Cisplatino, en comparación con los grupos C- y pEGFP-N2. Finalmente se encontró un efecto aditivo del tratamiento con la combinación WT1-1+Cisplatino. Los resultados obtenidos muestran que el plásmido WT1-1 tiene efecto contra el tumor y sugiere su uso en combinación con agentes quimioterapéuticos convencionales en terapia contra melanoma.

ABSTRACT

The Wilm's tumor gene (WT1) encodes a transcription factor that modulates expression of several genes involved in proliferation and apoptosis. WT1 is overexpressed in many tumors both hematological and solid, including melanoma. The aim of this study was to investigate whether WT1 silencing with RNA interference called WT1-1 was able to synergize with antitumor effect of chemotherapeutic agents doxorubicin and cisplatin *in vivo* and evaluate the safety of the therapy. 5×10^5 B16F10 cells were subcutaneously inoculated in C57BL6 mice. Seven experimental groups were formed with 5 mice each; on day 3 after inoculation and every third day were administered different doses of intraperitoneal treatments. Groups: 1) Negative control (C-), 2) 50 μ g pEGFP-N2, 3) 50 μ g WT1-1, 4) Doxorubicin 5mg/kg, 5) 5mg/kg cisplatin, 6) 50 μ g WT1-1 + Doxorubicin 5mg/kg, and 7) 50 μ g WT1-1 + cisplatin 5mg/kg. The average weight of the groups of mice showed no significant changes during the study, except for the groups treated with doxorubicin alone and WT1-1 + Doxorubicin, in which there was a dramatic reduction weight, from initial 27g to 20g and 17g, respectively. At 9 days post inoculation of the cells, the tumor was evident in the groups C-and pEGFP-N2; on day 15 in groups WT1-1, Cisplatin and WT1-1 + Cisplatin, doxorubicin on day 24, while in WT1-1 + doxorubicin Group, tumor was not evident until autopsy. A significant reduction ($p = 0.05$) in weight and volume of tumor mass was observed in mice treated with WT1-1, doxorubicin and cisplatin, compared with groups C-and pEGFP-N2. Finally was observed an additive effect of combination treatment with WT1-1 + cisplatin. These results show that WT1-1 plasmid is effective against the tumor and suggests its use in combination with conventional chemotherapeutic agents in therapy against melanoma.

1. INTRODUCCIÓN

El melanoma maligno constituye el cáncer de piel más agresivo y potencialmente letal, lo cual se asocia a su elevada capacidad metastásica. Esta neoplasia afecta predominantemente a adultos en edad productiva y se estima que su incidencia se duplica cada 10 a 20 años, afectando principalmente a poblaciones de piel clara (Leitner, 2006).

Aún con los avances para el tratamiento contra el cáncer que se han dado en las últimas décadas, el pronóstico para los pacientes con melanoma no ha cambiado, teniendo un rango de supervivencia a 5 años menor al 10%. Para estos pacientes las terapias que se utilizan son la cirugía y radioterapia. La mayoría de los pacientes con melanoma avanzado reciben una terapia sistémica. La quimioterapia con un solo agente consistente en administrar dacarbazina, sin embargo, la respuesta es generalmente baja y muy pocos pacientes logran una remisión completa. También se ha utilizado inmunoterapia administrando dosis altas de IL-2 o interferon- α , pero sin mejoras en los resultados (Trinh, 2008). Por lo tanto, se hace urgente la necesidad de buscar nuevas alternativas de terapia que permitan aumentar los índices de supervivencia de los pacientes con melanoma.

Una de las alternativas más prometedoras y de actualidad en la lucha contra el cáncer es la terapia génica mediante el silenciamiento de genes involucrados en el proceso neoplásico tales como los relacionados con proliferación celular, apoptosis, angiogénesis y metástasis. Una de las herramientas más utilizadas para este propósito es el RNA de interferencia (RNAi), que constituye una forma de silenciamiento post transcripcional potente y específica.

El silenciamiento de genes se ha utilizado no solo con fines terapéuticos, sino también para sensibilizar células tumorales a la quimioterapia convencional. Por ejemplo, se ha visto que la baja de Bcl-2 utilizando un antisentido incrementa la efectividad de las drogas anticancerígenas en pacientes con mieloma, leucemia y cáncer de pulmón, sin

embargo, no se mostró un efecto beneficioso de supervivencia para el melanoma maligno (Kim *et al.*, 2004). También se han utilizado liposomas con antisentidos bcl-2/bcl-xL logrando sensibilizar a las células de carcinoma a la muerte provocada por doxorubicina (Hussain *et al.*, 2006). En melanoma, utilizando antisentidos contra bcl-2 y c-myc en combinación con cisplatino se ha logrado incrementar la apoptosis y suprimir la angiogénesis *in vivo* (Zupi *et al.*, 2005).

WT1 es un gen que codifica para un factor de transcripción que regula genes involucrados en la diferenciación sexual, proliferación celular y apoptosis (Roberts, 2005). Este gen se encuentra sobreexpresado en neoplasias hematológicas como las leucemias y tumores sólidos como cáncer de mama, de próstata, de colon, de ovario, de pulmón, mesotelioma y melanoma (Koesters *et al.*, 2004; Loeb *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2006).

La expresión de WT1 y la multi droga-resistencia han sido asociadas en algunas neoplasias hematológicas, sugiriendo que WT1 puede ser considerado como un marcador de quimiorresistencia (Han *et al.*, 2008). Estudios recientes indican que WT1 es un marcador de malignidad para lesiones melanocíticas, ya que se expresa en melanomas metastásicos e invasivos, pero no así en piel normal ni en nevos melanocíticos benignos (Perry *et al.*, 2006), además estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que WT1 juega un papel esencial en la proliferación celular en melanoma (Zamora *et al.*, 2007).

En este trabajo se pretende demostrar *in vivo* en un modelo murino de melanoma que el silenciamiento de *wtl* es una estrategia terapéutica eficaz para disminuir masa tumoral y que además esta estrategia puede combinarse con las drogas quimioterapéuticas cisplatino o doxorubicina, para lograr un posible efecto de adición y/o sinergismo al efecto antiproliferativo inducido por las drogas.

JUSTIFICACIÓN

El melanoma maligno es responsable del 80% de muertes por cáncer de piel y su incidencia ha mostrado un incremento mayor que cualquier otra neoplasia en los últimos años.

Los tratamientos convencionales como la quimioterapia e inmunoterapia y combinaciones entre éstas no han logrado reducir los índices de mortalidad ni aumentar la sobrevivencia, además de que las elevadas dosis de fármacos empleados para controlar el progreso de la enfermedad, conllevan una elevada toxicidad para los pacientes.

Aunado a lo anterior, el melanoma presenta con mucha frecuencia resistencia a radio y quimioterapia, esto nos indica la apremiante necesidad de buscar nuevas estrategias de terapias altamente específicas, no tóxicas y de alta eficiencia para los pacientes con melanoma.

La expresión de genes durante las diferentes etapas del proceso neoplásico nos permite buscar biomarcadores que sirvan como blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevas estrategias de terapia génica.

El gen del tumor de Wilm's (*wil1*) se ha reconocido como esencial para la proliferación celular del melanoma, lo que le convierte en un atractivo blanco terapéutico, cuyo silenciamiento y/o combinación con los tratamientos convencionales de quimioterapia, podría representar una buena estrategia para suprimir el crecimiento tumoral y aumentar la sobrevivencia en pacientes con melanoma.

2. HIPÓTESIS

El silenciamiento del gen *w1* es capaz de inducir disminución de masa tumoral y potenciar el efecto antiproliferativo de agentes quimioterapéuticos en un modelo murino de melanoma

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar el efecto del RNAi dirigido contra WT1 y su combinación con cisplatino y doxorubicina en un modelo murino de melanoma.

3.2. Objetivos Particulares

1. Establecer la patología del melanoma con la línea B16F10 en ratones C57BL6.
2. **Evaluar** el peso de todos los grupos de ratones durante el experimento.
3. Determinar índice y masa tumoral en ratones tratados con el RNAi contra WT1.
4. Determinar índice y masa tumoral en ratones tratados con cisplatino y doxorubicina.
5. Determinar índice y masa tumoral en ratones tratados con las combinaciones WT1-1+Cis y WT1-1+Doxo.

4. ANTECEDENTES

4.1. Cáncer de piel

El cáncer engloba un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y diseminación de células anormales en el cuerpo y representa un problema de salud pública alarmante que ha ido en aumento, con incidencias que alcanzan anualmente 10 millones de casos en el mundo, con una mortalidad mayor a 6 millones de casos cada año (Stewart and Kleihues, 2003).

El cáncer de piel incluye un conjunto de neoplasias con muy diversas características, tanto por su origen como por sus factores de riesgo y pronóstico, distinguiéndose dos grupos principales: el grupo Melanoma maligno y el grupo de cáncer cutáneo No melanoma, que abarca esencialmente los carcinomas Espinocelulares y Basocelulares (Martinez and Otley, 2001).

En nuestro país, el cáncer de piel se encuentra en el segundo lugar de frecuencia, de acuerdo con un informe emitido en 2001 por el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Para las mujeres representa el segundo sitio de frecuencia y para los varones el primero (Secretaría de Salud, 2001).

4.2. Melanoma

En los últimos años ha aumentado enormemente el interés por el melanoma maligno, el cáncer de piel más agresivo y potencialmente letal.

El melanoma es un tumor que deriva de la proliferación de melanocitos atípicos, con capacidad o no para producir pigmento. Afecta principalmente la piel (90%), pero también puede localizarse en uvea e iris (9%) y con menor frecuencia en mucosas y meninges, siendo su principal característica una elevada capacidad de metástasis, la cual puede ocurrir por la vía linfática a tejidos vecinos o por la vía hemática a vísceras, principalmente a pulmón e hígado (Austoker, 1994; Denninghoff *et al.*, 2006).

4.3. Epidemiología

El melanoma afecta predominantemente a adultos en edad productiva, no obstante su aparición en infantes se relaciona con un nevo melanocítico congénito gigante, el síndrome de nevos displásicos o la enfermedad genética xeroderma pigmentoso. En el sexo masculino, la enfermedad se presenta muy frecuentemente en tronco, mientras en el sexo femenino suele manifestarse en extremidades inferiores (Goldstein and Goldstein, 2001).

El número de casos de melanoma se ha incrementado más rápido que cualquier otro cáncer. El crecimiento anual en la incidencia muestra variabilidad según las distintas poblaciones, pero en general fluctúa entre 3 a 7 % por año para personas caucásicas. En el año 2000, la incidencia de melanoma en el mundo fue de 2.4 por 100,000 para hombres y 2.21 por 100,000 para mujeres, produciéndose en los países desarrollados alrededor de 100,000 nuevos casos, lo que representa un 7-8% de todos los cánceres, mientras la mortalidad en el mismo año fue de aproximadamente 0.75 por 100,000 en varones y de 0.56 por 100,000 en féminas (Desmond and Soong, 2003; Walsh *et al.*, 2000).

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

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

La *American Cancer Society* estima que tan solo este año habrá en los Estados Unidos más de un millón de nuevos casos de cáncer no melanoma, contra 62, 480 nuevos casos de melanoma y calcula que se registrarán un promedio de 2,780 defunciones al año por cáncer de piel no epitelial y 8,420 muertes por melanoma (*American Cancer Society*, 2008).

4.4. Factores de riesgo

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

Hasta hoy, la literatura (*Schaffer et al.*, 2004; *Greene*, 1999; *Kraehn et al.*, 1994; *MacKie*, 1998) destaca los siguientes como factores de riesgo asociados a melanoma:

- *Piel clara*. Los caucásicos presentan incremento de hasta 10 veces en incidencia de melanoma comparado con personas de raza negra, y de 7 veces en contraste con poblaciones indígenas y criollas de Latinoamérica. El cabello rojizo, las efélides y otros indicadores de daño solar, aumentan el riesgo 3 veces.
- *Presencia de más de 50 nevos melanocíticos y/o nevos displásicos*.
- *Antecedente familiar o personal de melanoma*. Entre 6-12% de los melanomas se desarrollan en este contexto.
- *Exposición intermitente e intensa a las radiaciones ultravioletas*, particularmente en edades tempranas.
- *Otros factores geográficos*, como la latitud geográfica, altitud sobre el nivel del mar o época de año, pues influyen en la intensidad de los rayos solares.

- *Síndromes hereditarios raros* como el albinismo, xeroderma pigmentoso, síndrome de Li-Fraumeni.
- *El status socioeconómico y el nivel de educación* (Rodríguez, 2001).

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

Análisis genéticos en familias con síndrome de nevos displásicos han llevado a la identificación de genes relacionados con la aparición del melanoma. Diferentes autores coinciden en que alrededor del 20-40% de las familias con antecedentes de múltiples casos de melanoma, presentan alteraciones en el gen del inhibidor de la cinasa dependiente de la ciclina 2A (CDKN2A). Dichas mutaciones permiten que las células superen el punto de revisión en G1/S, dando como resultado proliferación y crecimiento descontrolado de las mismas (Piepkorn, 2000; Puig *et al.*, 2005).

Se han descrito mutaciones en el gen INK4A en 8% de pacientes con melanomas primarios múltiples. Algunas familias presentan mutaciones en la proteína cinasa 4 (CDK4), que es el compañero de unión de p16 (Heymann, 2004).

4.5. Diagnóstico

El diagnóstico de melanoma se da en primer lugar por sospecha clínica, seguido por la dermatoscopia y otros métodos diagnósticos no invasivos, pero solo se puede confirmar por medio de la Histopatología. Por lo anterior, conviene dividir el diagnóstico en dos apartados: Diagnóstico Clínico y Diagnóstico Histológico.

4.5.1. Diagnóstico Clínico

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

Clásicamente, se emplea la regla del *ABCD*, la cual describe la mayor parte de las características clínicas de los melanomas, incluyendo lesiones pigmentadas con *Asimetría*, *Bordes* irregulares, cambios de *Color* y *Diámetro* mayor a 6 mm; no obstante, esta regla no resulta fiable en el diagnóstico de melanoma en etapas iniciales, pues las lesiones pueden medir menos de 6 mm, ser simétricas y de bordes regulares. Adicionalmente, el prurito, la ulceración y el sangrado en una lesión pigmentada son signos de alerta. Algunos autores incluyen la letra *E*, de *Evolución* o *Elevación*. Se sabe que la acertividad diagnóstica del melanoma con el examen clínico es de aproximadamente 60% (Grin *et al.*, 1990).

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

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

4.5.2. Diagnóstico Histológico

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

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

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

La biopsia incisional se puede realizar en lesiones grandes sospechosas, tomándose la muestra de la zona más pigmentada o de la zona más elevada. Se ha comprobado que este procedimiento no aumenta el riesgo de extensión local o recurrencia de melanoma, no obstante puede caerse en errores diagnósticos en caso de que la muestra no sea tomada del sitio adecuado.

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

4.6. Estadificación y pronóstico

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

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

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

	más de cuatro nodos regionales, o nódulos linfáticos enmarañados, o metástasis en tránsito o satélite con nodos regionales metastáticos. Para ningún inciso se presenta metástasis a distancia
IV	Cualquier grosor de tumor, cualquier número de ganglios regionales metastáticos, con metástasis distante.

Tabla 1. Sistema de clasificación TNM para melanoma maligno.

A continuación se muestran los rangos de supervivencia de pacientes a cinco años, según estadio y presencia o no de ulceraciones (Tabla 2):

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

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

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

4.7. Tratamiento

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

Desafortunadamente muchos de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas, lo cual ha llevado a la búsqueda y desarrollo de diversas modalidades de tratamiento, pero

a pesar de numerosos esfuerzos ensayando combinaciones con terapias existentes, no se ha logrado incrementar la sobrevida de los pacientes en forma significativa.

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

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

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

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

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

Varios estudios *in vitro* han reportado la presencia de receptores estrogénicos en células de melanoma derivadas de tumores metastásicos (Fisher *et al.*, 1976; Walker *et al.*, 1987), por lo que se ha probado el tratamiento con tamoxifeno. No obstante, largos estudios randomizados no han podido demostrar un papel positivo de la terapia antiestrogénica en el manejo de melanoma metastásico (Lens *et al.*, 2003).

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

Los resultados obtenidos hasta hoy en el tratamiento de melanomas en estadios avanzados no han sido muy alentadores, por lo que los esfuerzos más recientes en la búsqueda de terapias eficaces se han enfocado en el desarrollo de vacunas y estudios sobre terapia génica.

4.8. Terapia Génica

La Terapia Génica (TG) es una modalidad emergente y muy prometedora para el tratamiento del cáncer. Se define como la transferencia de nuevo material genético dentro de una célula para obtener un beneficio terapéutico, esto mediante: a) reemplazo o inactivación de genes disfuncionales, b) reemplazo o adición de genes funcionales, o c) inserción de un gen dentro de una célula para inducir una respuesta inmune o citotóxica (Mulherkar, 2001).

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

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

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

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

4.8.1. Terapia Génica dirigida a células del tumor

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

Inactivación de oncogenes

Los oncogenes provienen de protooncogenes, que son genes que codifican proteínas con una función en la célula normal, con un papel en el control del crecimiento celular. No obstante, alteraciones moleculares en solo uno de los dos alelos de un protooncogén bastan para que éste se convierta en oncogén y promueva el crecimiento descontrolado y la conversión de la célula a un estado maligno.

En melanoma, se han considerado blancos de terapia génica los siguientes oncogenes: miembros de la familia *Ras*, *c-Myc* y *Stat3*.

Son los oncogenes de la familia *Ras* los que se han encontrado activados más frecuentemente en tumores humanos y animales -entre ellos el melanoma-, por lo que se considera a estos genes como un buen blanco para frenar el progreso del cáncer.

En un estudio realizado en 1998, se ensayó la actividad de un compuesto antagonista de *Ras* en dos grupos de ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) xenotransplantados con células de melanoma humanas 518A2 y 607B, observando que existía una inhibición estadísticamente significativa del crecimiento de los tumores (82 y 90%, respectivamente), mientras que *in vitro* ocurría disminución del número de células y reversión del fenotipo transformado en ambas líneas celulares (Jansen *et al.*, 1999).

En años recientes, se ha encontrado una fuerte asociación entre la desregulación en la expresión del gen *c-Myc* y la tumorigénesis en melanoma. Leonetti *y col.* inhibieron la proliferación de tres líneas celulares de melanoma humano *in vitro* e *in vivo* usando oligodesoxinucleótidos antisentido dirigidos contra *c-Myc*, logrando inducción de apoptosis. En los ratones xenotransplantados se obtuvo una citotoxicidad dependiente de dosis y una marcada disminución del crecimiento tumoral, reducción del número de metástasis pulmonares y un aumento en la supervivencia (Leonetti *et al.*, 1996).

Otro gen cuya activación ocurre con alta frecuencia en melanoma, contribuyendo directamente a la oncogénesis y progresión maligna es *Stat3*. Niu *y col.* (1999) usaron terapia génica para inhibir a *Stat3* activado en células de melanoma B16 *in vivo*. Para ello usaron un dominante negativo de *Stat-3*, obteniendo una regresión significativa de los tumores y una apoptosis masiva en los mismos (Niu *et al.*, 1999).

4.8.2. Terapia de silenciamiento génico

La posibilidad de atenuar o bloquear selectivamente la expresión de genes blanco específicos involucrados en la progresión tumoral, representa en la actualidad un método revolucionario en la lucha contra el melanoma maligno y otros cánceres. Los agentes de silenciamiento de genes más ampliamente conocidos son: ribozimas, oligonucleótidos antisentido y RNA de interferencia (RNAi) (Bhindi *et al.*, 2007)

4.9. RNA de interferencia (RNAi)

El RNAi es un fenómeno de silenciamiento génico postranscripcional, específico de secuencia y evolutivamente conservado. Fue descrito inicialmente en *C. elegans* al introducir moléculas RNA doble cadena (Fire *et al.*, 1998). El RNAi es una vía intracelular de múltiples pasos que puede ser dividido en dos fases: fase de iniciación y fase efectora.

En la *fase de iniciación* moléculas RNA doble cadena de origen endógeno o exógeno presentes en la célula son procesadas por una actividad de corte por la proteína DICER que es una ribonucleasa tipo 3 (Hamilton and Baulcombe, 1992; Zamore *et al.*, 2000) en fragmentos nucleotídicos pequeños de 21 a 23 bp llamados siRNAs. Estos contienen un extremo simétrico 2nt en el extremo 3' y en el 5' fosfato y un grupo OH en el 3'.

En la *fase efectora* estos siRNAs son incorporados en un complejo celular de multiproteínas nucleasas llamado RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA) (Hammond *et al.*, 2000).

La cadena duplex de siRNA es separada por actividad de una RNA helicasa (Nykanen *et al.*, 2001), este complejo se activa por la cadena sencilla del siRNA y guía al complejo RISC a su RNAm complementario blanco, este siRNA hibridiza con el RNAm y el complejo cataliza el corte endonucleolítico del RNAm en el sitio blanco resultando en extremos de RNA no protegidos que rápidamente son degradados (Figura 1).

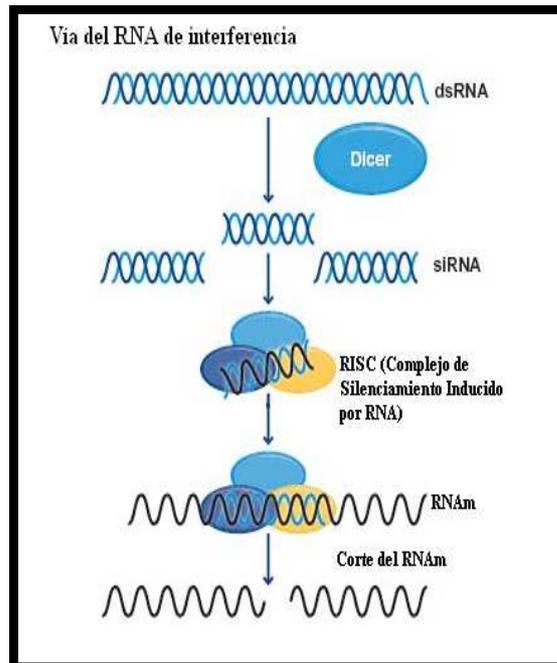


Figura 1. Mecanismo del RNA de interferencia (RNAi). En la fase de iniciación moléculas RNA doble cadena son procesadas por DICER en fragmentos nucleotídicos pequeños de 21 a 23 bp llamados siRNAs. En la fase efectora estos siRNAs son incorporados en el RISC, las cadenas se abren y el complejo RISC guía al RNAm a su complementario blanco catalizando el corte del RNAm.

Una alternativa para la entrega de un siRNA es por inyección intravenosa, en donde el hígado es el sitio primario de absorción del siRNA, otra alternativa son los liposomas y lípidos catiónicos con aplicaciones locales o sistémicas. Se han investigado otras estrategias para la liberación local y sistémica como modificaciones químicas a los siRNA, electropulsación, atelocolágeno, virosomas y ciertos polímeros catiónicos (Aigner, 2006).

Dentro de los polímeros catiónicos, actualmente se utiliza como alternativa formar complejos de los siRNA no modificados con el *polímero catiónico Polietilenamina (PEI)* (Godbey *et al.*, 1999).

4.10. RNAi en la lucha contra melanoma

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

Tabla 3. Ejemplos de investigaciones *in vitro* y/o *in vivo* que han utilizado RNA de interferencia para silenciar genes asociados a proliferación, invasividad y metástasis de melanoma

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

BRAF= Gen transformante *Braf*; CD147= Inductor de metaloproteinasas de matriz extracelular; c-myc= Proto-oncogén *c-myc*; Stat3= Transductor de señal y activador de transcripción 3; Skp2= Proteína cinasa 2 asociada a fase S; Mitf= Factor de transcripción asociado a microftalmia; PRL-3= Fosfatasa de

regeneración hepática 3; MTA-1= Proteína asociada a metástasis 1; MAPK= Proteína cinasa activada por mitógeno; MPM= Metaloproteinasas de matriz; VEGF= Factor de crecimiento del endotelio vascular

4.11. Gen del Tumor de Wilm's (*wt1*)

Mutaciones en el gen *wt1*, localizado en el brazo corto del cromosoma 11p13, fueron inicialmente descubiertas en el tumor de Wilm's (TW), un cáncer renal pediátrico que afecta células precursoras embrionarias pluripotentes y tiene una frecuencia cercana a 1 en 10,000 niños en Estados Unidos (Little and Wells, 1997).

Se sabe que sólo el 15% de los casos de TW esporádicos presentan alteraciones en *wt1*, denotando una función supresora de tumor, sin embargo en la mayoría de los casos de TW se expresa la forma silvestre de dicho gen y con baja frecuencia, mutaciones heterocigotas provocan síndromes asociados al TW, siendo éstos: WAGR (WT, aniridia, anomalías genitourinarias y retraso mental), Denys-Drash y Frasier (Little and Wells, 1997; Rauscher, 1993).

El gen *wt1* codifica un factor de transcripción involucrado en proliferación, diferenciación celular y apoptosis (Menke *et al.*, 1998).

Un largo listado de genes son blanco de activación/represión transcripcional por parte de *wt1*, destacando los involucrados en el crecimiento y metabolismo celular, como son componentes de matriz extracelular (CME), factores de crecimiento y factores de transcripción (incluido el mismo *wt1*).

En la tabla 4 se muestran ejemplos de genes que pueden ser regulados por *wnt1*, indicándose si dicha regulación es positiva o negativa (Yang *et al.*, 2007).

Tabla 4. Genes que son blancos transcripcionales de *wnt1*.

BLANCO	EFEECTO	BLANCO	EFEECTO
F. de crecimiento		F. de transcripción	
<i>Anfíregulina</i>	Activación	<i>c-Myb</i>	Represión
<i>Factor estimulante de colonias-1</i>	Represión	<i>c-Myc</i>	Activación/ represión
<i>Factor de crecimiento de la insulina II</i>	Activación/ represión	<i>Ciclina E</i>	Represión
<i>Factor de crecimiento der. de plaquetas</i>	Represión/ activación	<i>Ciclina G1,</i> <i>IGFBP-4</i>	Activación
<i>Factor de crecimiento transformante-β</i>	Represión	<i>P-21</i>	Activación
		<i>Pax-2</i>	Represión
Enzimas		CME	
<i>Transcriptasa reversa de telomerasa humana</i>	Represión	<i>E-caderina humana</i>	Incremento
<i>Descarboxilasa de ornitina</i>	Represión	<i>Trombospondina 1</i>	Represión
		<i>Sindecano 1</i>	Activación
Receptores		Otros	
<i>R. de andrógeno</i>	Represión	<i>Wnt-4</i>	Activación
<i>R. del factor de crecimiento epidermal</i>	Represión	<i>Bcl-2</i>	Activación/ represión
<i>R. de insulina</i>	Represión	<i>Eritropoyetina</i>	Activación
<i>R. del factor de crecimiento de insul. I</i>	Represión		
<i>R. alfa del ácido retinóico</i>	Represión		

En el desarrollo embrionario, *wnt1* se expresa primordialmente en el sistema urogenital; en tejidos adultos se expresa en sistema urogenital, sistema nervioso central y tejidos hematopoyéticos, incluyendo médula ósea y nodos linfáticos (Yang *et al.*, 2007).

4.12. Estructura de *wt1*

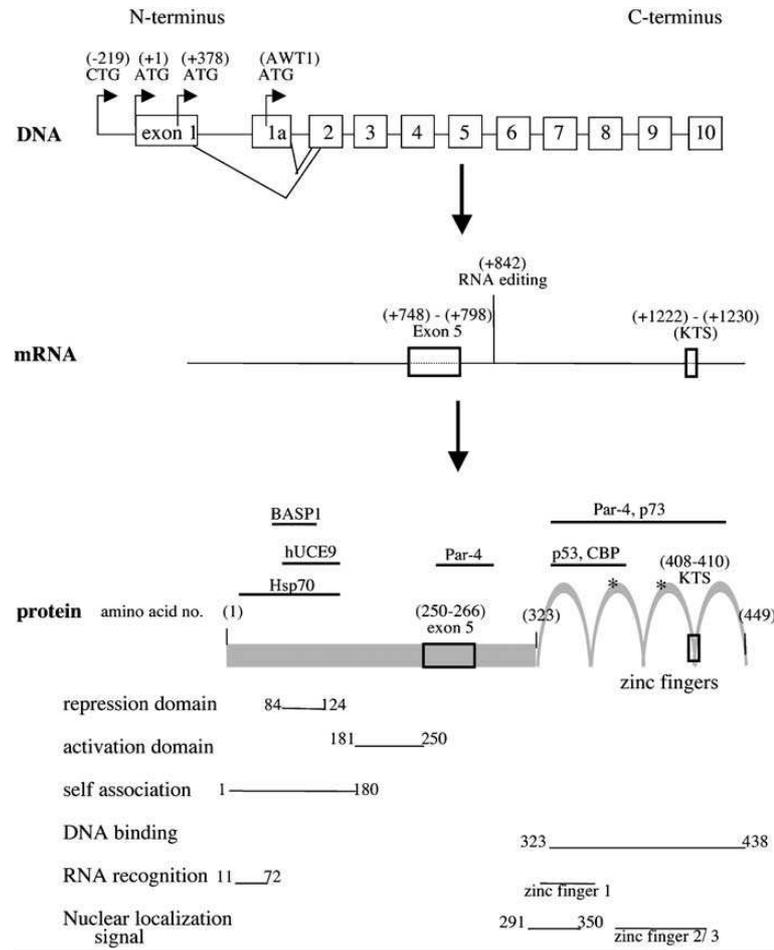


Figura 2. Estructura del gen *wt1*.

El gen de *wt1* está conformado por cerca de 50 kb, contiene 10 exones y produce un RNAm de 3.5 kb, el cual puede sufrir dos ‘splicing’ alternativos durante su maduración en los exones 5 y 9. En el primero se insertan o no 17 aminoácidos y en el segundo se incorporan o eliminan los aminoácidos lisina, treonina y serina (KTS), dando como resultado cuatro isoformas designadas como (-,-), (+,-), (-,+) y (+,+), representando la presencia o ausencia de los insertos 17aa y KTS, respectivamente (Haber *et al.*, 1991).

El RNAm tiene tres sitios de inicio de la traducción, lo que resulta en tres isoformas con distinto peso molecular: 36-38, 52-54 y 62-64 kilodaltones (Scharnhorst *et al.*, 1999). La isoforma mediana representa la forma típica de WT1 y posee un extremo carboxilo

terminal con cuatro dedos de zinc tipo Krüpel (codificados en los exones 7-10), que son los sitios de unión a secuencias de DNA ricas en G-C y algunas proteínas, así como un extremo amino terminal que presenta un sitio de transactivación rico en prolina y glutamina, un dominio de dimerización y otro de represión (Lee and Heaver, 2001).

Motivos adicionales en la proteína WT1 son esenciales para auto-asociación, localización nuclear y reconocimiento de RNA (Scholz and Kirschner, 2005).

La combinación de 'splicing' alternativos, edición de RNA y sitios de inicio de traducción, hacen que se generen al menos 24 diferentes variantes de WT1 en mamíferos (Wagner *et al.*, 2003).

4.13. WT1 en cáncer

El gen *w1* es ampliamente aceptado como supresor de tumor en aproximadamente 15% de los tumores de Wilm's. No obstante en los últimos años se han reportado datos de la expresión de WT1 wild-type en tumores adultos de diferente origen, por lo que se ha propuesto su rol como oncogén en esas neoplasias.

Por ejemplo, ha sido descrita la sobreexpresión de *w1* en malignancias hematológicas, incluyendo leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda y crónica, así como en síndromes mielodisplásicos, asociándose a un pobre pronóstico (Rosenfeld *et al.*, 2003).

También se ha reportado la expresión de *w1* en múltiples tumores sólidos. En un estudio, se determinó la expresión de *w1* por RT-PCR en 34 líneas celulares de tumores sólidos, incluyendo provenientes de cáncer gástrico, de colon, pulmón, mama, de células germinales, ovario, útero, tiroides y carcinoma hepatocelular, de las cuales 28 (82%) expresaban *w1* (Oji *et al.*, 1999).

Nakatsuka *y col.* examinaron 494 casos de cánceres humanos por inmunohistoquímica (IHQ) y hallaron positividad a WT1 en tumores de estómago, próstata, cérvix, endometrio, ovario, cerebro, esófago, páncreas, próstata, mama, riñón, pulmón y piel, entre otros (Nakatsuka *et al.*, 2006).

La expresión de WT1 y la multi drogo-resistencia han sido asociadas en algunas neoplasias hematológicas, sugiriendo que WT1 puede ser considerado como un marcador de quimiorresistencia (Hirose, 1999). La relevancia de WT1 en proliferación y supervivencia de líneas leucémicas fue evidenciada al usar RNAi dirigidos contra WT1 y Bcl-2. La reducción de la expresión de *wil* provocó una baja en proliferación celular con inducción de apoptosis en células K562 y HL-60, pero interesantemente la combinación simultánea de ambos RNAi no logró el efecto del RNAi-wt1 solo, ni sobre el crecimiento celular ni en nivel de muerte celular programada (Glienke *et al.*, 2007).

4.14. WT1 en melanoma

Dentro de la diversidad de tumores sólidos que expresan altos niveles de WT1, melanoma no es la excepción.

En 1994, mediante PCR se detectaron transcritos de *wil* en 7 de 9 líneas celulares de melanoma, mas no así en 5 líneas de melanocitos normales (Rodeck *et al.*, 1994).

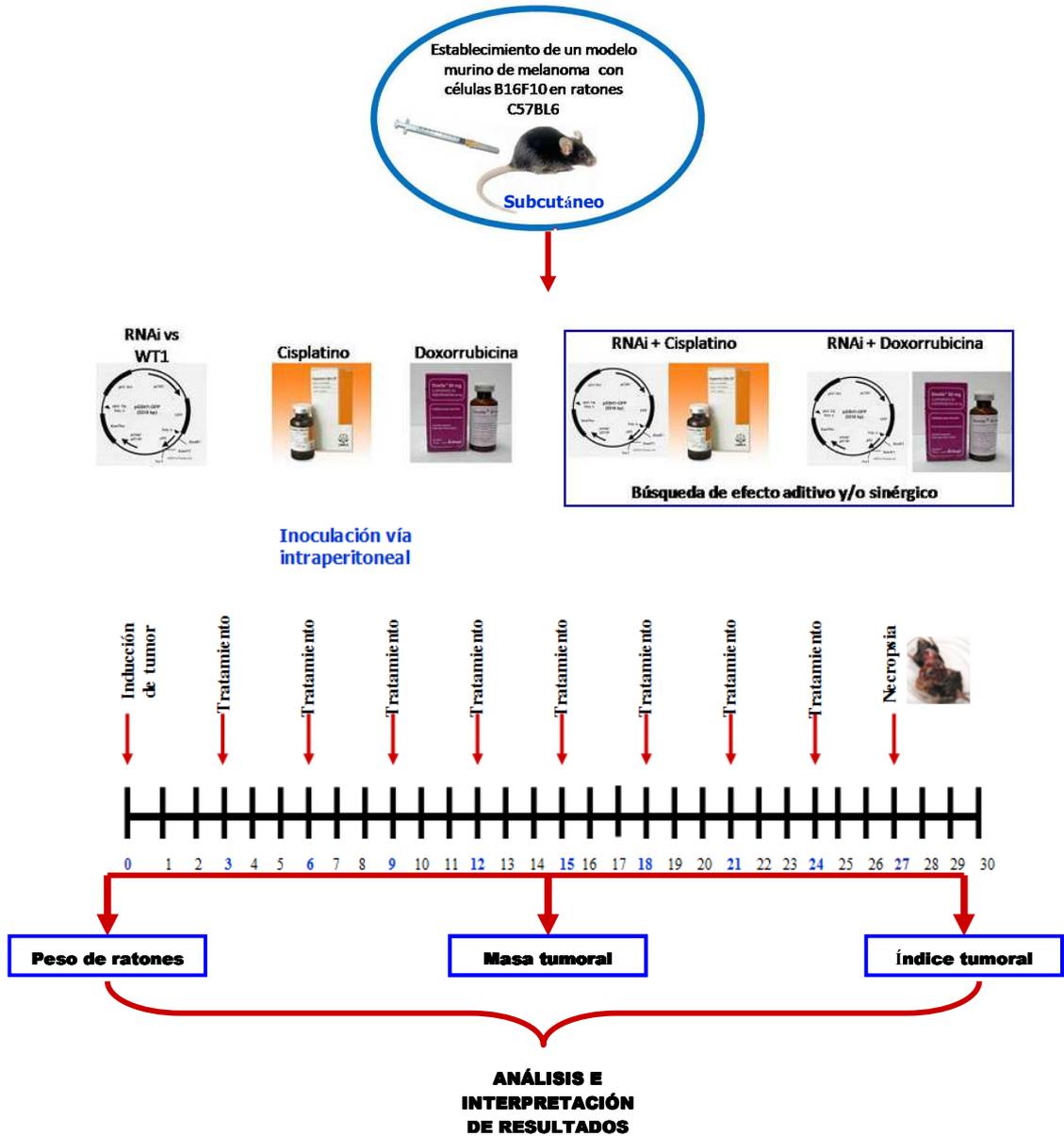
Perry *y col.* demostraron por IHQ que WT1 es más común en melanomas primarios (51-83.7%), comparado con nevos (7.4-29.6%), proponiendo la utilidad de la técnica empleada como una herramienta a considerar en la distinción de lesiones malignas y no malignas (Perry *et al.*, 2006).

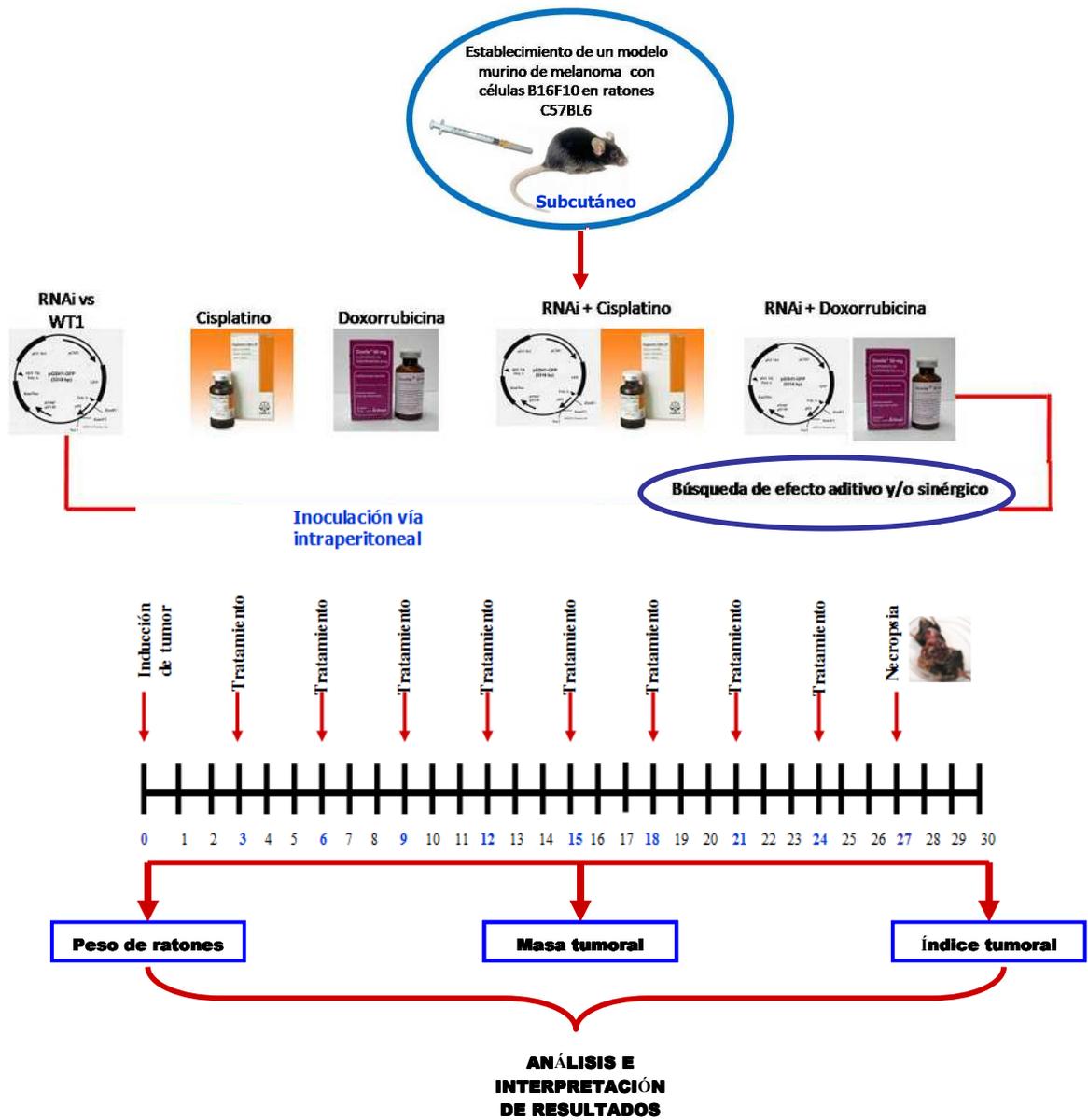
Otros investigadores analizaron 7 tumores de melanoma también por IHQ, para lo cual utilizaron un anticuerpo policlonal y otro monoclonal, ambos para WT1. Con el primer Ac. obtuvieron una inmunopositividad del 57%, en tanto el uso del segundo les permitió aumentar la positividad diagnóstica a un 86% (Nakatsuka *et al.*, 2007).

Recientemente Wagner *y col.* hallaron que más del 80% de las líneas de melanoma maligno usadas en su estudio expresaron WT1, pero no encontraron indicios de expresión en piel normal ni en nevos melanocíticos benignos (Wagner *et al.*, 2008).

Por todo lo anterior, dentro de los múltiples estudios preclínicos y clínicos que involucran Terapia Génica, deber considerarse a WT1 como un atractivo blanco terapéutico, cuyo bloqueo es capaz de disminuir la proliferación celular en diversas neoplasias, pudiendo combinarse con las modalidades convencionales de tratamiento para obtener mejores resultados.

4.15. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Cultivo celular y animales

Se utilizó la línea celular de melanoma murino B16F10, la cual fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA). Las células fueron cultivadas y mantenidas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM-F12) (Life Technologies, Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Grand Island, NY, USA) e incubadas a 37 °C en una atmósfera a 95% de O₂ y 5% de CO₂.

Se emplearon ratones hembra de la cepa C57BL6, de 7 a 8 semanas de edad (Harlan México, S.A. de C.V.). Los animales fueron mantenidos con agua y alimento *ad libitum*, bajo condiciones libres de patógenos.

Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo protocolos estandarizados, de acuerdo a las recomendaciones generales para el manejo y cuidado de animales de laboratorio.

5.2. Construcción de plásmido que codifica para el RNAi dirigido contra WT1.

El plásmido recombinante que se empleó en los tratamientos contiene el siguiente par de oligonucleótidos (sentido y antisentido) que codifican para el RNAi dirigido contra wt1 (El plásmido fue previamente denominado en el Laboratorio como WT1-1):

WT1-1: 5'-GATCCGGCTGTCCCACTTACAGATGGAAGCTTGCATCTGTAAG
TGGGACAGCTTTTTTGAAG -3',

3'-GCCGACAGGGTGAATGTCTACCTTCGAACGTAGACATTCACC
CTGTCGAAAAACCTTCGCCGG-5'

Estas secuencias fueron ligadas en el plásmido pGSH1-GFP para generar el plásmido WT1-1. Como control fue utilizado el plásmido pEGFP-N2.

5.3. Transformación de bacterias *E. coli* DH5 α calcio competentes

Se transformaron 70µl de bacterias *E. coli* DH5α competentes con 5µl del producto de ligación y se sembraron las bacterias en cajas Petri con agar LB con 50µg/ml de kanamicina y se crecieron toda la noche a 37 °C.

Posteriormente se tomaron 3-4 colonias transformadas, se sembraron en medio LB con 50 µg/ml de kanamicina y se crecieron toda la noche a 37 °C.

5.4. Verificación y extracción a gran escala de los plásmidos pEGFP-N2 y WT1-1

Se realizó una extracción de plásmidos a pequeña escala por el método de lisis alcalina y se llevó a cabo la visualización de los mismos en un gel de agarosa al 0.8%

Posteriormente se procedió a obtener suficiente cantidad de ambos para todos los tratamientos mediante un Gigaprep, utilizando el kit comercial de QIAGEN para la purificación de plásmidos.

Para ello se crecieron bacterias transformadas en 2.5 litros de medio LB a 37 °C toda la noche, las cuales se centrifugaron a 6000g por 15min a 4 °C. Mientras tanto, se colocó el QIAfilter en una botella de 45mm de grosor y se conectó una bomba de vacío. El paquete celular se resuspendió en 125ml de buffer P1, posteriormente se adicionaron 125ml de buffer P2 y se mezcló por inversión 4-6 veces y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Después se adicionaron 125ml de buffer P3, se mezcló inmediatamente por inversión 4-6 veces hasta que se formó un material blanco y el lisado tenía apariencia no tan viscosa. No se incubó en hielo, sino directamente se colocó el lisado en el QIAfilter y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se encendió la bomba de vacío y se dejó pasar todo el líquido; con la bomba aun conectada, se añadieron 50ml de buffer FWB2 y se mezcló con una espátula estéril, se encendió la bomba de vacío y se dejó pasar el líquido. Se equilibró la columna QIAGEN-tip 1000 con 75ml de buffer QBT y se dejó pasar por gravedad. Se aplicó el lisado filtrado en la columna y se dejó pasar por gravedad. Se aplicó el lisado filtrado en la columna y se dejó pasar por gravedad. Luego se lavó la columna con 600ml de buffer QC y se eluyó

el ADN con 100ml de buffer QF, para posteriormente precipitarse con 70ml de isopropanol (0.7 vol). Enseguida se mezcló y centrifugó a 15,000g por 30min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla de ADN con 10ml de etanol al 70%. Finalmente se dejó secar a temperatura ambiente y el ADN plasmídico se resuspendió en buffer TE pH 8.0.

5.5. Preparación de stock de polietilenimina (PEI)

Los plásmidos pEGFP-N2 y WT1-1 fueron acomplejados para los tratamientos con el polímero catiónico ramificado polietilenimina -PEI- (P.M. 25 kDa).

Primeramente se preparó un 'stock' a una concentración final de 4.3mg/ml disueltos en H₂O miliQ estéril. Para el ensayo de transfección *in vitro*, la relación de grupos amino de la PEI/ fosfatos del DNA plasmídico (radio N/P) calculada fue de 5 y para los ensayos *in vivo* el radio N/P utilizado fue de 10.

5.6. Transfección *in vitro* y análisis de expresión de los plásmidos pEGFP-N2 y WT1-1 células de melanoma B16F10

Se sembraron en una placa de 6 pozos un total de 150,000 células/ 3ml de medio por pozo y se incubaron en condiciones estándar hasta alcanzar un 70-80% de confluencia.

Posteriormente se diluyeron 4µg de los plásmidos pEGFP-N2 y WT1-1 y 0.4 µl de PEI, ambos en 100µl de NaCl 150mM. Se adicionó la dilución de la PEI a la del ADN y se incubó la mezcla 15 min. a temperatura ambiente. Finalmente se colocaron 200µl de los complejos por pozo y se incubó la placa durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo se analizó la eficiencia de transfección de los plásmidos bajo el microscopio de fluorescencia y se tomaron fotografías de las células bajo luz visible y ultravioleta.

5.7. Extracción y cuantificación de proteínas

Se recolectaron las células transfectadas con los RNAi. Enseguida fueron colocadas en tubos eppendorf y lavadas con PBS 1X. El paquete celular fue resuspendido en buffer de lisis (Tritón 1%, NaCl 150 mM, Tris 25 mM pH 7.6) e incubado en hielo por 30 min. Transcurrido ese tiempo se centrifugó por 5 min. a 10,000rpm y el sobrenadante conteniendo las proteínas fue transferido a un nuevo tubo y almacenado a -70 °C hasta su cuantificación.

Para la cuantificación, se utilizó el kit comercial Bio-Rad DC Protein Assay y se usaron estándares de concentraciones conocidas de albúmina bovina de 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/ml, que sirvieron para realizar la curva de calibración.

Las muestras de proteínas fueron diluidas en agua a una relación 1:5. En tanto se preparó una mezcla de los reactivos A y S (19 partes del primero + 1 parte del segundo).

Cinco µl de cada dilución y de los estándares se colocaron en una placa de 96, luego se adicionaron 20 µL de la mezcla A+S a cada pocillo a cuantificar y enseguida se añadieron 175 µL de reactivo B por pozo.

Se incubó la placa por 10 minutos a temperatura ambiente y se leyó la densidad óptica a 595 nm en un lector de placas de ELISA.

5.8. Western Blot

5.8.1. Preparación de las muestras

Cincuenta microgramos de proteínas totales fueron desnaturalizados en buffer de carga 6X (β -mercaptoetanol, SDS, Glicerol, Azul de bromofenol), para lo cual fueron hervidas durante 5min.

5.8.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se preparó un gel de poliacrilamida al 12%, se colocó en la cámara de electroforesis con buffer de corrida (Tris Base 25 mM, Glicina 250 mM pH 8.3, SDS 1%) y se cargaron las muestras en los carriles, incluido el marcador de peso molecular. Inicialmente se corrió por 20min. a 46V y posteriormente se aumentó a 100V, por espacio de 1 hora con 40 min.

5.8.3. Transferencia a membrana de nitrocelulosa

Para este paso, fue preparado el mismo día el buffer de transferencia (100ml solución stock Tris Base + Glicina, 200ml de metanol y 700ml de H₂O).

Una vez concluida la electroforesis, se sacó el gel con mucho cuidado y se formó un “sandwich”, para lo cual se colocaron de cátodo a ánodo: esponjas, papel filtro, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa, papel filtro y esponjas.

Se corrió en la cámara húmeda con buffer de transferencia por 2 horas a 26 volts.

5.8.4. Inmunodetección

Previamente fue preparada una solución stock de TBS 10X pH 7.6 (Para un litro: 31.5g Tris-HCl + 80g NaCl y ajustar al pH indicado).

Terminada la transferencia se colocó cuidadosamente la membrana de nitrocelulosa en una solución TBS-tween 1% + 5% leche por 1 hora (bloqueo).

Luego se retiró la solución anterior y se colocó el primer anticuerpo (WT1 monoclonal diluido 1:200 en TBS-tween + leche 2.5%) por 3 horas.

Concluido el tiempo del anticuerpo primario, éste se retiró y se lavó la membrana con TBS-Tween 1% por 10 minutos en 3 ocasiones y enseguida se añadió el anticuerpo

secundario (conjugado) anti-ratón diluido a 1:5000 también en TBS-Tween + leche al 2.5% y se incubó por 2 horas.

Se retiró el Ac. secundario y de nuevo se hicieron tres lavados a la membrana, igual como se indicó en el párrafo anterior.

Enseguida se agregó a la membrana el sustrato de quimioluminiscencia (luminol A y B) en partes iguales por 5 minutos, se eliminó el exceso de luminol y se fijó en un cassette para ser expuesto a un film y revelado en el cuarto oscuro.

Finalmente, para la normalización de las muestras se empleó un anticuerpo monoclonal para β -actina (diluido 1:500 en TBS-tween + leche 2.5%) y se incubó por 2.5 horas; el anticuerpo secundario fue anti-ratón diluido a 1:5000 en TBS-Tween + leche al 2.5% y se incubó por 2 horas.

La inmunodetección para β -actina se realizó de igual manera con quimioluminiscencia, como se describió anteriormente.

5.9. Establecimiento del modelo de melanoma

Para el establecimiento del modelo murino de melanoma se utilizó la línea celular B16F10, de la cual se utilizaron células de los pases 3-12 y se utilizó la vía de inoculación subcutánea de 5×10^5 células resuspendidas en 150 μ l de medio de cultivo sin suero. La inoculación subcutánea se realizó en el flanco posterior izquierdo de los animales.

Se formaron 7 grupos experimentales con 5 ratones cada uno; el día 3 post inoculación y cada tercer día se administraron las diferentes dosis de tratamiento por vía intraperitoneal. En total se aplicaron 8 tratamientos. Grupos: 1) Control negativo (C-), 2) 50 μ g pEGFP-N2, 3) 50 μ g WT1-1, 4) Doxorubicina 5mg/kg, 5) Cisplatino 5mg/kg, 6) 50 μ g WT1-1+ Doxorubicina 5mg/kg, y 7) 50 μ g WT1-1+ Cisplatino 5mg/kg. El

esquema de aplicación de tratamientos, desde el día de la inducción del tumor hasta la necropsia, se muestra a continuación:

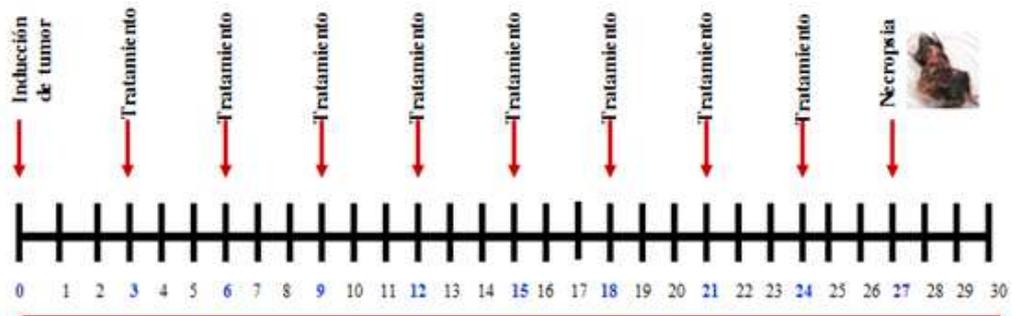


Figura 3. Esquema de administración de tratamientos con pEGFP-N2, WT1-1 cisplatino y doxorubicina. Todos los tratamientos fueron administrados por vía intraperitoneal a partir del tercer día de la inducción del tumor y cada tercer día hasta completar un total de 8. Dosis empleadas: pEGFP-N2 y WT1-1= 50 μ g; Cisplatino y Doxorubicina= 5 mg/kg.

5.10. Preparación de complejos plásmido-PEI para los tratamientos *in vivo*

Para preparar los complejos de transfección *in vivo* se diluyeron 50 μ g de cada plásmido en 250 μ l de glucosa al 5%, para cada ratón y se dio vortex. Paralelamente, se diluyeron 10 μ l de PEI 150nM para cada plásmido en glucosa al 5% y se dio vortex. Posteriormente se adicionó la PEI diluida al plásmido diluido, se dio vortex y se incubó por 15min. a temperatura ambiente. Finalmente los ratones fueron tratados con una inyección intraperitoneal.

5.11. Tratamiento con Cisplatino y Doxorubicina

Las concentraciones de las drogas (stock) con las que se trabajó son: Cisplatino (1 mg/ml) y Doxorubicina (2mg/ml). Ambas drogas se administraron por vía intraperitoneal a una dosis de 5mg/kg.

5.12. Combinación de WT1-1, Cisplatino y Doxorubicina

Las cantidades determinadas de plásmido y droga fueron aplicadas simultáneamente para los tratamientos. Se realizó la combinación del plásmido con ambas drogas, en las mismas dosis administradas en los tratamientos individuales.

5.13. Medición del peso de ratones

Durante el estudio se monitoreó cada tercer día el peso de los ratones de todos los grupos. También se llevó registro del estado físico general y conducta de los animales. Cuando se registró algún deceso, se removió el tumor y se anotaron las medidas y peso del mismo, así como el número de días que vivió.

5.14. Obtención de masa e índice tumoral

El día 27 posterior al inicio del experimento, se realizó el sacrificio de los ratones por dislocación cervical, al momento de la necropsia los tumores fueron removidos y pesados individualmente. Para el cálculo del índice tumoral se tomaron las medidas del largo y del ancho de los tumores, con ayuda de un vernier digital para obtener el volumen que refleja el índice tumoral.

5.15. Análisis estadístico

Los datos de masa e índice tumoral fueron graficados y analizados con ayuda del programa SPSS Statistics Versión 17.0 mediante una prueba de ANOVA ($p=0.05$), para ver si existía diferencia significativa entre los grupos de experimentación.

6. RESULTADOS

6.1. Verificación de los plásmidos pEGFP-N2 y WT1-1

Las secuencias para silenciar al gen WT1 fueron alineadas y ligadas al plásmido pGSH1-GFP, para generar el vector recombinante denominado WT1-1, en tanto el plásmido pEGFP-N2 fue usado como control en los experimentos. Posteriormente se realizó la transformación de bacterias competentes con las dos construcciones y se realizó una extracción rápida de plásmidos a pequeña escala para verificar la transformación, para ello se analizaron los plásmidos en un gel de agarosa al 0.8%, el cual fue teñido con Bromuro de etidio (Fig. 4).

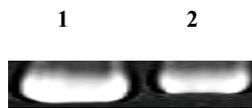


Figura 4. Visualización de los plásmidos 1) pEGFP-N2 y 2) WT1-1 en gel de agarosa al 0.8% teñido con Bromuro de etidio.

6.2. Análisis de expresión y funcionalidad de los plásmidos pEGFP-N2 y WT1-1 en células B16F10

El análisis de la expresión de los plásmidos se realizó por transfección de los mismos en la línea celular B16F10 y se visualizó la expresión de la proteína reportera GFP bajo microscopía de fluorescencia. La transfección con el plásmido pEGFP-N2 no mostró efecto sobre morfología ni sobre viabilidad celular, en tanto las células transfectadas con WT1-1 mostraron alteraciones morfológicas y muerte celular, además el efecto observado se atribuyó a la disminución de la expresión de la proteína de WT1 (Fig. 5).

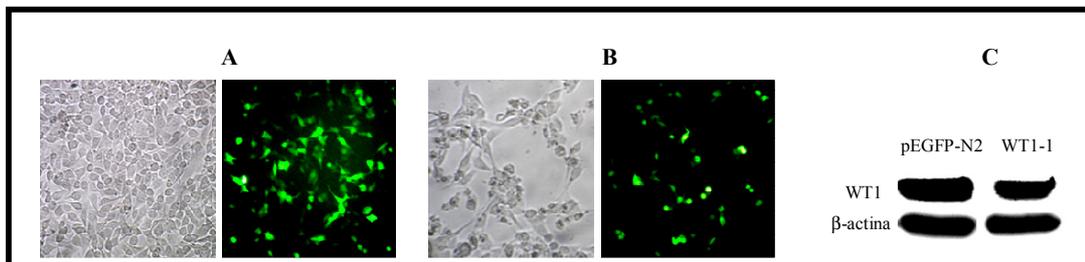


Figura 5. Efecto producido sobre células B16F10 por A) pEGFP-N2 (4µg) y B) WT1-1 (4µg) con expresión de la proteína reportera GFP. Las fotografías fueron obtenidas a las 48 horas de incubación de un microscopio de fluorescencia, bajo luz visible (izquierda) y ultravioleta (derecha). C) Análisis de la

expresión de la proteína WT1 mediante Western blot, en células tratadas con ambos plásmidos. Como control endógeno se utilizó β -actina.

Una vez corroborada la efectividad del plásmido WT1-1 para silenciar al gen WT1, se realizaron extracciones de plásmidos a gran escala, con el propósito de obtener cantidades suficientes para todos los experimentos *in vivo*.

6.3. Inducción del tumor con células B16F10 inoculadas vía subcutánea

Para probar el efecto del plásmido WT1-1 y las drogas doxorubicina y cisplatino, así como sus combinaciones, el primer paso fue el establecimiento de la patología de melanoma, en ratones hembra de la cepa C57BL6. Para ese fin, se inocularon en la pata posterior derecha de los animales 5×10^5 células B16F10 por vía subcutánea.

La masa tumoral fue aparente al día 9, tiempo en el cual se realizó el sacrificio del ratón, siendo evidente la implantación del tumor (Figura 6).

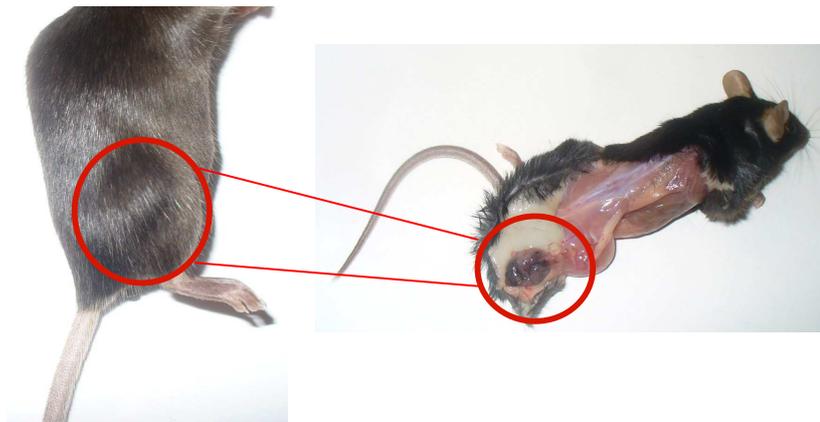


Figura 6. Establecimiento de tumor subcutáneo en hembra C57BL6. La fotografía fue tomada 9 días post inoculación de 5×10^5 células B16F10 en la pata posterior derecha del ratón.

6.4. Monitoreo del peso de los ratones durante el experimento

A partir del día de la inoculación de las células B16F10 (día 0), se llevó a cabo el registro del peso de los 5 ratones de cada grupo, el cual fue monitoreado cada tercer día durante todo el experimento.

En la mayor parte de los grupos, el peso de los ratones no mostró cambios significativos, sin embargo destacan el grupo tratado con doxorubicina, así como la combinación WT1-1+doxorubicina. En el primero ocurrió una disminución de peso de casi 7g a los 18 días del inicio de los tratamientos (día 3), pasando de un promedio de 27g a menos de 20 g, registrándose un ligero aumento hasta alcanzar un poco más de 20g al día 27. Respecto al grupo tratado con la combinación WT1-1+doxorubicina, se observó una caída del peso de casi 5g al día 12, pasando de un promedio de 27g a 22g, con una rápida recuperación de peso en los 3 días siguientes, alcanzando los 25g, para después caer nuevamente hasta alrededor de 17g para el día 21, lo cual se mantuvo hasta el día del sacrificio (Figura 7).

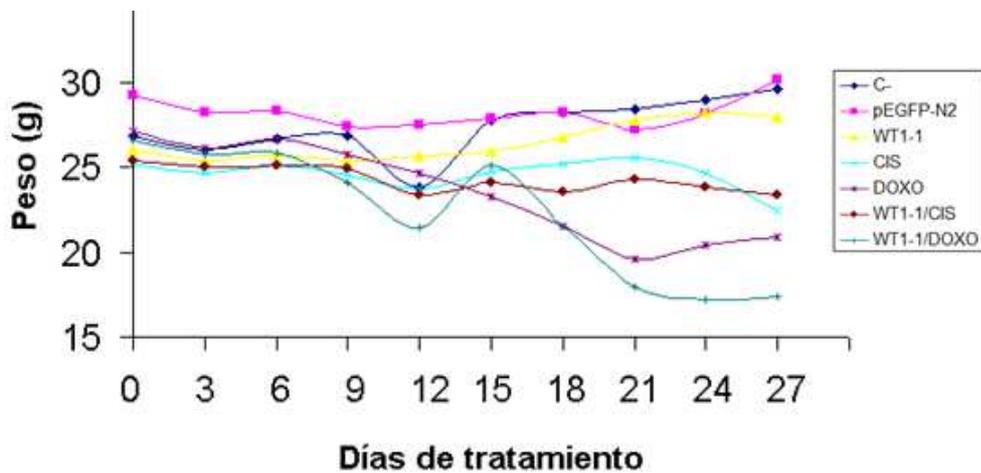


Figura 7. Cinética del peso promedio de los grupos de ratones C57BL6, desde el día de la inoculación de las células B16F10 (día 0) y cada tercer día hasta el momento de la necropsia de los mismos (día 27).

Cabe destacar que desde el tratamiento número 2, a pesar de que el tumor aun no era evidente, los ratones del grupo control mostraron un comportamiento aletargado, en comparación con el resto de los grupos que se mostraban activos. Para el tercer tratamiento (día 9) la masa tumoral fue visible en ratones de los grupos C- y pEGFP-N2, además se observaron signos de alopecia moderada en 3 de los 5 ratones del grupo C-.

El día 15, la masa tumoral fue evidente en los grupos WT1-1, Cisplatino y WT1-1+Cisplatino y el día 24 en Doxorubicina, mientras los tumores de WT1-1+Doxorubicina no fueron evidentes hasta la necropsia. Pese a no presentar tumor visible en la mayor parte del estudio, los ratones tratados únicamente con doxorubicina mostraron fatiga y abundante secreción ocular desde el día 18, hasta la conclusión del experimento (similar a lo observado para la combinación WT1-1+Doxorubicina).

El día 21 murió un ratón del grupo C- que presentaba alopecia severa y masa tumoral de 4.3g; el día 24 murió uno del grupo WT1-1+Doxorubicina, que no desarrolló tumor, pero tenía un peso muy bajo (<15g).

El día del sacrificio de los ratones (día 27), 2 de los 4 ratones del grupo C- presentaban alopecia, exhibían dificultades motoras por el tamaño de la masa tumoral y lucían moribundos, en tanto los ratones tratados con el plásmido pEGFP-N2 se veían más activos y no presentaron caída de pelo. Los grupos Cisplatino, WT1-1 y WT1-1+Cisplatino tampoco mostraron alopecia, fatiga o algún otro síntoma que evidenciara disminución en su calidad de vida (Figura 8).

Cabe mencionar que uno de los ratones del grupo control y otro del grupo tratado con el plásmido pEGFP-N2 presentaron metástasis a pulmones, mientras en el resto de los grupos no fue observado este proceso. No se encontraron indicios de metástasis a riñones, bazo, hígado o hueso en ninguno de los grupos experimentales.

Todos los ratones tratados con los plásmidos presentaron una marcada esplenomegalia.

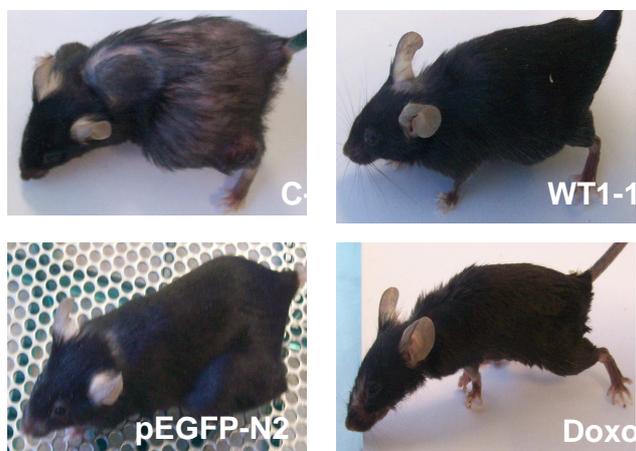


Figura 8. Estado físico de ratones C57BL6 en cuatro grupos experimentales el día 27, a 3 días de la administración del octavo tratamiento.

6.5. Medición de masa tumoral en ratones tratados y no tratados

Al momento de la necropsia de los ratones, los tumores fueron removidos y pesados individualmente (Figura 9). El peso promedio de la masa tumoral en los ratones que recibieron tratamiento individual fue: WT1-1= 2.7g; Cisplatino= 2.3g y Doxorubicina= 0.2g. Estos valores fueron significativamente ($p=0.05$) menores en comparación con el grupo control (5.3g) y el tratado con el plásmido pEGFP-N2 (5.0g). En lo que respecta a las combinaciones, el peso promedio de los tumores fue: WT1-1+Cisplatino= 1.1g y WT1+Doxorubicina= <0.1 g. Este resultado indica la existencia de un efecto aditivo en la primera combinación, mientras que en el caso de la combinación WT1-1+Doxorubicina no es posible mencionar la existencia de un sinergismo, puesto que los tumores de ratones del grupo tratado únicamente con Doxorubicina no mostraron diferencia significativa con los tratados con la combinación con WT1-1 (Figura 10).

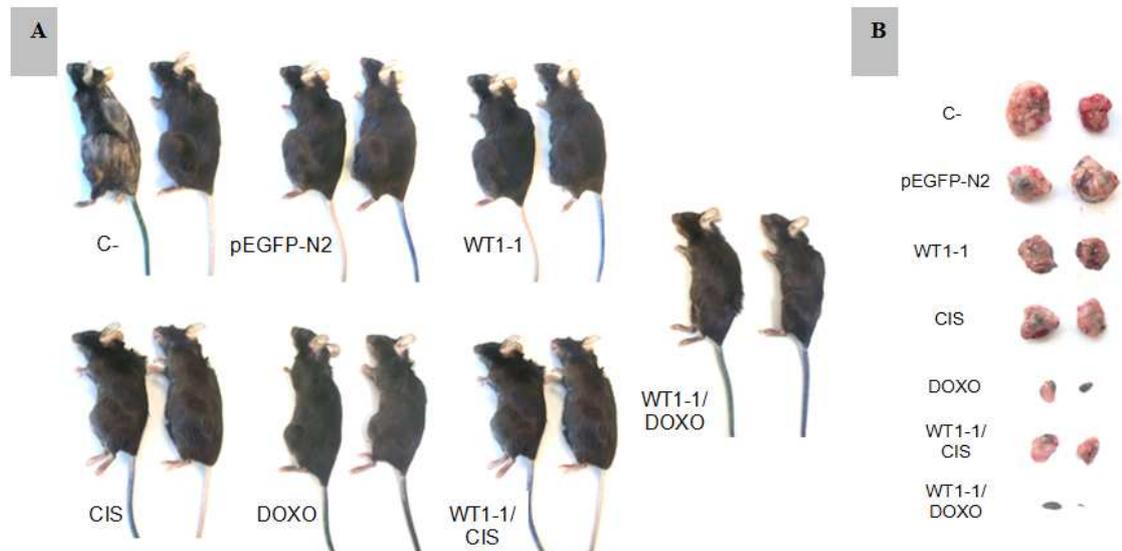


Figura 9. Necropsia de ratones C57BL6. A) Fotografías de ratones representativos de todos los grupos experimentales. B) Tumores extraídos de ratones en A.

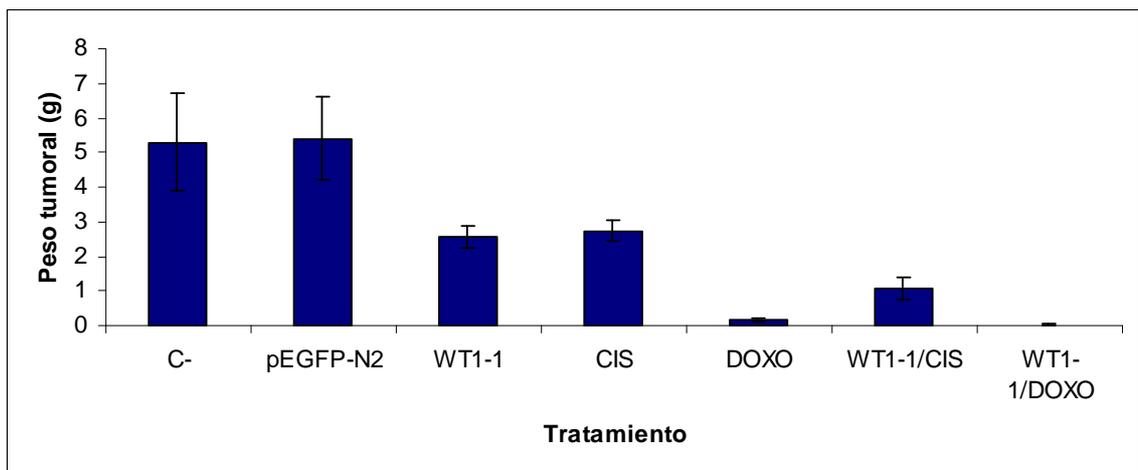


Figura 10. Peso de los tumores de los grupos control y tratados con único agente o en combinación, a los 27 días del inicio de los experimentos.

6.6. Obtención del índice tumoral en ratones tratados y no tratados

El índice tumoral representa la carga tumoral, este se obtuvo en base al volumen del tumor, mediante la siguiente fórmula: $\text{Volumen} = (\text{ancho del tumor})^2 \times \text{largo del tumor} / 2$. El volumen promedio de la masa tumoral en los ratones que recibieron tratamiento individual fue: WT1-1= 3290mm^3 ; Cisplatino= 2297mm^3 y Doxorubicina=

96mm³. Estos valores fueron significativamente ($p=0.05$) menores en comparación con el grupo control (6118mm³) y el tratado con el plásmido pEGFP-N2 (5574mm³). Para las combinaciones, el volumen promedio de los tumores fue: WT1-1+Cisplatino= 492mm³ y WT1+Doxorrubicina= 2mm³ (Figura 11).

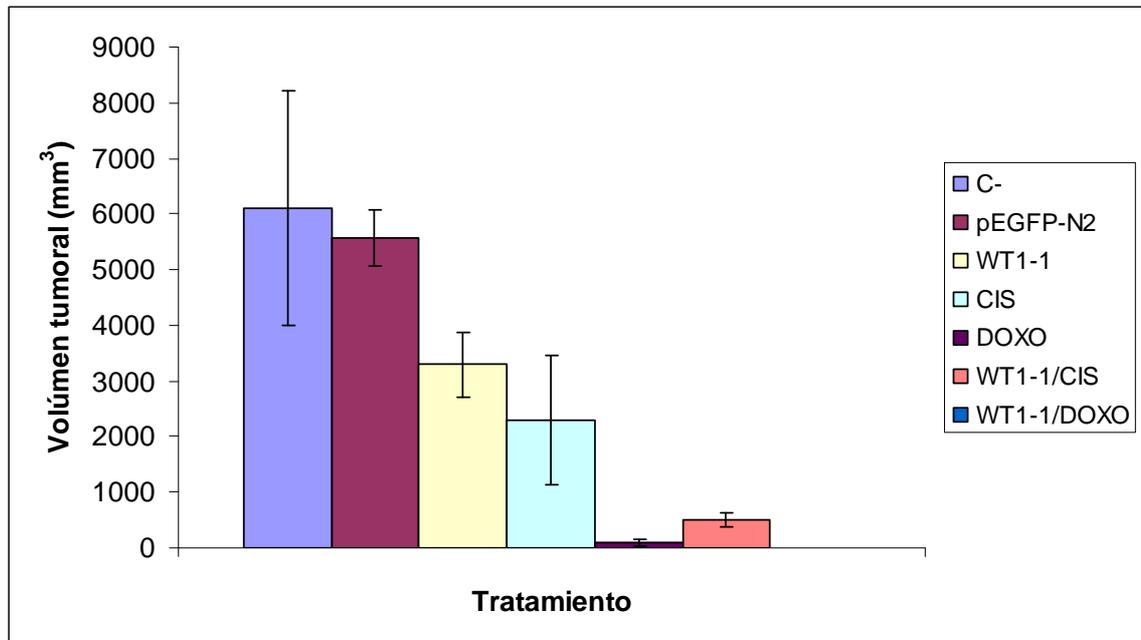


Figura 11. Índice tumoral (expresado como volumen en mm³) obtenido para los grupos control y tratados con único agente o en combinación, a los 27 días del inicio de los experimentos.

El índice tumoral calculado se correlaciona con el peso promedio de la masa tumoral para todos los grupos de experimentación y en su conjunto demuestran la capacidad de WT1-1 para disminuir masa tumoral, asimismo sugieren la existencia de un efecto de adición de la administración simultánea de WT1-1 y cisplatino en este modelo.

7. DISCUSIÓN

El melanoma maligno representa una de las neoplasias más agresivas, cuya incidencia ha crecido alarmantemente en el mundo en los últimos años. En México existen reportes que estiman un aumento de alrededor del 500% en los últimos 25 años, lo cual constituye un grave problema, considerando que se trata de un tumor intrínsecamente radio y quimiorresistente. A pesar de la intensa investigación y numerosos ensayos en fases preclínica y clínica acerca de opciones de tratamiento que incrementen la sobrevivencia de pacientes con melanoma, a la fecha no existe una terapia efectiva contra formas diseminadas de esta neoplasia, lo cual obliga a diseñar y poner en práctica nuevas y eficaces estrategias de tratamiento.

En ese sentido la terapia génica representa una opción prometedora contra el cáncer, siendo el RNA de interferencia (RNAi) la herramienta molecular más potente, que permite el bloqueo específico de la expresión de genes involucrados en tumorigénesis. Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han utilizado RNAi para silenciar genes asociados a procesos tales como proliferación, invasividad y metástasis de melanoma (Sumimoto *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2006; Katagiri *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2007; Nakai *et al.*, 2007), con resultados alentadores.

Desde hace años se propuso al gen del tumor de Wilm's (WT1) como blanco de terapia; WT1 es un factor de transcripción involucrado en diferenciación, proliferación celular y apoptosis, que inicialmente fue identificado como supresor de tumor, pero desde hace algunos años se sabe que su sobreexpresión está implicada en numerosas neoplasias, desde malignancias hematológicas hasta tumores sólidos de mama, ovario, estómago, útero, colon, pulmón, etc. (Koesters *et al.*, 2004; Loeb *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2006) dándole un rol oncogénico.

En estudio previo en nuestro laboratorio se demostró que el bloqueo de la expresión de WT1 mediante 2 secuencias de RNAi (denominadas WT1-1 y WT1-2) induce muerte de células B16F10 por el mecanismo de apoptosis, con evidencia de activación de Caspasa-

3 y PARP, formación de cuerpos apoptóticos, condensación de cromatina y fragmentación de DNA (Zamora *et al.*, 2007).

Más recientemente realizamos un estudio para investigar la capacidad de ambos RNAi para dar un posible efecto sinérgico y/o sensibilizante al efecto de las drogas cisplatino y doxorrubicina *in vitro*, los resultados indicaron un efecto aditivo de WT1-1 y WT1-2 al incrementar la muerte de células tratadas con las combinaciones, siendo mayor el efecto en los ratones tratados con WT1-2+Cisplatino. Además se observó que al tratar a las células con WT1-2 se requirieron menores dosis de droga para alcanzar el mismo efecto que se lograría con altas dosis de quimioterapia, sugiriendo la existencia de un efecto sensibilizante de potencial aplicación clínica, en la cual se lograría reducir la toxicidad asociada al empleo de drogas, sin comprometer la efectividad antitumoral de la terapia (Zapata *et al.*, 2012).

El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto del RNAi WT1-1 (que previamente mostró mejor efecto que WT1-2 *in vivo* **CUAL ¿¿**) contra WT1 y su combinación con cisplatino y doxorrubicina, en un modelo murino de melanoma. Como primer paso se obtuvieron los plásmidos pEGFP-N2 (control de transfección) y WT1-1 en cantidades suficientes para la realización de los experimentos. El análisis de la efectividad de las construcciones *in vitro* mostró una buena eficiencia de transfección en ambos casos, con disminución de la proteína de WT1 en células B16F10 tratadas con WT1-1 y disminución de la viabilidad celular, en tanto el plásmido pEGFP-N2 no produjo alteraciones morfológicas ni muerte de las células, tal y como había sido reportado por nuestro grupo de trabajo (Zamora *et al.*, 2007).

Para probar el efecto del plásmido WT1-1 y las drogas doxorrubicina y cisplatino, así como sus combinaciones, se estableció la patología de melanoma subcutáneo, en la cepa de ratones C57BL6. La masa tumoral fue aparente al día 9, tiempo en el cual se realizó la necropsia del ratón, observando la implantación del tumor. Con este resultado se corroboró la funcionalidad del modelo de melanoma.

La quimioterapia representa la alternativa terapéutica de mayor uso en la actualidad. Desafortunadamente su efectividad no se limita a la erradicación de células tumorales y muy a menudo se asocia con el deterioro en la calidad de vida de los pacientes. Algunos de los efectos colaterales reportados para la quimioterapia son: pérdida de peso, alopecia, náuseas, vómitos, alteraciones dermatológicas, desequilibrios hematológicos, entre otros.

Por lo anterior, en este trabajo se llevó a cabo el monitoreo del peso de los ratones durante el experimento. Al respecto no se observaron cambios significativos en el peso en la mayor parte de los grupos, a excepción del grupo tratado con doxorubicina, así como la combinación WT1-1+doxorubicina. En el primero ocurrió una disminución de peso de casi 7g a los 18 días del inicio de los tratamientos, registrándose al día 27 una pérdida de peso de alrededor del 26%, con respecto al peso inicial; en el grupo tratado con la combinación WT1-1+doxorubicina, se observó una caída del peso de casi 5g al día 12, pasando de un promedio de 27g a 22g, con una rápida recuperación de peso en los 3 días siguientes, alcanzando los 25g, para después caer nuevamente hasta alrededor de 17g para el día 21, lo cual representa una disminución del 37% en comparación al peso inicial. El resultado anterior sugiere que la dosis de doxorubicina empleada en los tratamientos fue la responsable de la pérdida de peso observada.

Cabe destacar que desde el **tratamiento número 2** (día 6), a pesar de que el tumor aun no era evidente, los ratones del grupo control **(SIN TRATAMIENTO)** mostraron un comportamiento aletargado, en comparación con el resto de los grupos que se mostraban activos, además para el día 9 se observaron signos de alopecia moderada en 3 de los 5 ratones del grupo C-.

Otro aspecto importante es el retraso en la aparición de masa tumoral observada en los grupos de ratones tratados. Mientras el día 9 apareció el tumor en los ratones del grupo C-, fue evidente hasta el día 15 en los grupos WT1-1, Cisplatino y WT1-1+Cisplatino y hasta el día 24 en el grupo de Doxorubicina, mientras los tumores de WT1-1+Doxorubicina no fueron evidentes hasta la necropsia. Destaca que pese a no presentar

tumor visible en la mayor parte del estudio, los ratones tratados únicamente con doxorubicina mostraron fatiga y abundante secreción ocular desde el día 18, hasta la conclusión del experimento (similar a lo observado para la combinación WT1-1+Doxorrubicina). El potente efecto antitumoral en los grupos tratados con doxorubicina corrobora que la dosis de droga empleada fue elevada para los ratones, sugiriendo que la pérdida de peso y otros efectos adversos observados puede deberse a la alta dosis de quimioterapia empleada.

En lo que respecta a sobrevivencia de los ratones durante el experimento, el día 21 murió un ratón del grupo C- que presentaba alopecia severa y masa tumoral de 4.3g, el resto de los ratones de ese grupo lucían moribundos el día 27 y además 2 de los 4 restantes presentaban alopecia severa y todos exhibían dificultades motoras por el tamaño de la masa tumoral; el día 24 murió uno del grupo WT1-1+Doxorrubicina, que no desarrolló tumor, pero tenía un peso muy bajo (<15g), atribuible al tratamiento con doxorubicina.

Interesantemente los ratones tratados con el plásmido pEGFP-N2 (que presentaban tamaño de tumor similar al grupo C-) se veían más activos y no presentaron caída de pelo. Los grupos Cisplatino, WT1-1 y WT1-1+Cisplatino tampoco mostraron alopecia, fatiga o algún otro síntoma que evidenciara disminución en su calidad de vida.

Cabe mencionar que uno de los ratones del grupo control y otro del grupo tratado con el plásmido pEGFP-N2 presentaron metástasis a pulmones, mientras en el resto de los grupos no fue observado este proceso. No se encontraron indicios de metástasis a riñones, bazo, hígado o hueso en ninguno de los grupos experimentales, siendo un dato a destacar la presencia de una marcada esplenomegalia en todos los ratones tratados con los plásmidos pEGFP-N2 y WT1-1.

Respecto al peso promedio de la masa tumoral en los ratones que recibieron tratamiento individual, se obtuvo una reducción significativa ($p=0.05$) en los grupos tratados con

WT1-1, cisplatino o doxorubicina, en comparación con el grupo C- y el tratado con el plásmido pEGFP-N2. En lo que respecta a las combinaciones, el peso promedio de los tumores fue: WT1-1+Cisplatino= 1.1g y WT1+Doxorrubicina= <0.1g. Este resultado indica la existencia de un efecto aditivo en la primera combinación, mientras que en el caso de la combinación WT1-1+Doxorrubicina no es posible mencionar la existencia de un sinergismo, puesto que los tumores de ratones del grupo tratado únicamente con Doxorubicina no mostraron diferencia significativa con los tratados con la combinación con WT1-1 ; Nuestros resultados concuerdan con otros que han demostrado *in vitro* e *in vivo* que el bloqueo en la expresión de oncogenes es capaz de trabajar sinérgicamente con diversos agentes antitumorales, mejorando el efecto final. Se ha comprobado en melanoma, donde un régimen basado en la supresión en la expresión de c-myc y bcl-2 con oligos antisentido combinado con cisplatino en un modelo xenógrafo resultó efectivo sobre dos de tres líneas celulares, con aumento en la apoptosis, efecto antiangiogénico y aumento significativo en la vida media de los ratones tratados (Zupi *et al.*, 2005) y en leucemia, donde el bloqueo en la expresión de la isoforma WT1/17aa+ usando RNAi, se asoció a una baja en los niveles de MDR1 y glicoproteína-P, potenciando de esta manera la citotoxicidad de doxorubicina, con lo que se propone a dicha isoforma de WT1 como moduladora de la resistencia a multi-drogas (Shen *et al.*, 2007).

Asimismo EN trabajos previos ha sido propuesto que el silenciamiento de la expresión de *wtl* sensibiliza a células tumorales a agentes quimioterapéuticos. Por ejemplo: Naoya y *col.* (2008) demostraron que un shRNA dirigido contra el exón 5 de *wtl* potencia la apoptosis inducida por doxorubicina y etopósido en líneas celulares de tumores sólidos de pulmón (LU99B), ovario (TYKnuCPr), fibrosarcoma (HT-1080), glioblastoma (A172) y gástrico (AZ-521), proponiendo que las isoformas 17 aa+ (tanto KTS+ como -) previene el daño mitocondrial inducido por etopósido, inhibiendo así la apoptosis, observando además que el bloqueo del exón 5 incrementa la expresión de las proteínas proapoptóticas Bak y Bax y baja los niveles de las proteínas antiapoptóticas Bcl-X1 y Bcl-2, esto en las células HT-1080 (Naoya *et al.*, 2008).

Finalmente el índice tumoral reflejó que el volumen promedio de la masa tumoral en los ratones que recibieron tratamiento individual fue significativamente ($p=0.05$) menor en comparación con el grupo control y el tratado con el plásmido pEGFP-N2, mientras para las combinaciones, el volumen promedio de los tumores fue aun menor.

El índice tumoral calculado se correlaciona con el peso promedio de la masa tumoral para todos los grupos de experimentación y en su conjunto demuestran la capacidad de WT1-1 para disminuir masa tumoral, asimismo sugieren la existencia de un efecto de adición de la administración simultánea de WT1-1 y cisplatino en este modelo.

8. CONCLUSIONES

1. Se estableció la patología de melanoma subcutáneo, siendo evidente el tumor al día 9 post inoculación de las células B16F10.
2. El peso promedio de ratones tratados con Doxorubicina y WT1-1+Doxorubicina disminuyó significativamente durante el experimento (26 y 37%, respectivamente).
3. El tratamiento con Doxorubicina, Cisplatino y WT1-1 disminuyó masa tumoral significativamente, en comparación con los grupos C- y pEGFP-N2.
4. Los ratones tratados con Doxorubicina, Cisplatino y WT1-1 tuvieron menor índice tumoral, en comparación con los grupos C- y pEGFP-N2.
5. La combinación WT1-1+Cisplatino mostró un efecto aditivo sobre masa e índice tumoral.

LITERATURA CITADA

Aigner A. 2006. Delivery Systems for the Direct Application of siRNAs to Induce RNA Interference (RNAi) in Vivo. *J Biomed Biotechnol.* 71659.

American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2008.* Atlanta: American Cancer Society.

Anderson CM, Buzaid AC and Legha SS. 1995. Systemic treatments for advanced cutaneous melanoma. *Oncology (Huntingt).* 9:1149-1158.

Austoker J. 1994. Melanoma: Epidemiología y diagnóstico precoz. *BMJ.* 2:408-413.

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA and Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2001;19(16):3635-48.

Ballo M, Ang KK. Radiation therapy for malignant melanoma. *Surg Clin North Am* 2003; 83: 323-42.

Bhindi R, Fahmy RG, Lowe HC, Chesterman CN, Dass CR, Cairns MJ, Saravolac EG, Sun LQ and Khachigian LM. DNA Enzymes, Short Interfering RNA, and the Emerging Wave of Small-Molecule Nucleic Acid-Based Gene-Silencing Strategies. *American Journal of Pathology.* 2007;171(4):1079-1087.

Brady MS. Sentinel lymph node mapping in patients with cutaneous melanoma. *Dermatol Surg.* 2004;30:272-8.

Chen X, Lin J, Kanekura T, Su J, Lin W, Xie H, Wu Y, Li J, Chen M and Chang J. A small interfering CD147-targeting RNA inhibited the proliferation, invasiveness, and metastatic activity of malignant melanoma. *Cancer Res.* 2006;66(23):1323-1330.

Denninghoff V, Falco J, Curutchet HP and Elsner B. Estudio del ganglio centinela, Diagnóstico y tratamiento del Melanoma Maligno Cutáneo, estadios I y II. MEDICINA (Buenos Aires). 2006; 66:144-146.

Desmond RA and Soong SJ. Epidemiology of malignant melanoma. Surg Clin North Am. 2003;83:1-29.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in caenorhabditis elegans. Nature 391:806–811.

Fisher RI, Neifeld JP and Lippman ME. Estrogen receptors in human malignant melanoma. Lancet. 1976;2:337–338.

Glienke W, Maute L, Koehl U, Esser R, Milz E and Bergmann L. Effective treatment of leukemic cell lines with wt1 siRNA. Leukemia. 2007;21:2164-2170.

Godbey WT, Wu KK, Mikos GA. 1999. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. Journal of Biomedical Materials Research 45:268–275.

Goldstein BG and Goldstein AO. Diagnosis and management of malignant melanoma. Am Fam Physician. 2001;63:1359-68.

Greene M. The genetics of hereditary melanoma and nevi. Cancer. 1999;86:2464-77.

Grin CM, Kopf AW, Welkovich B, Bart RS and Levenstein MJ. Accuracy in the clinical diagnosis of malignant melanoma. Arch Dermatol. 1990;126:763-6.

Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM and Housman DE. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. Proc. Nati. Acad. Sci. USA. 1991;88:9618-9622.

Hamilton AJ, Baulcombe DC. 1992. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science 286:950–952.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. 2000. An RNA- directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404:293–296

Han Y, Yang L, Suárez-Saiz F, San-Marina S, Cui J and Minden MD. Wilm's tumor 1 suppressor gene mediates antiestrogen resistance via down-regulation of estrogen receptor- α expression in breast cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2008;6:1347-1355.

Heymann WR. The genetics of melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51:801-802.

Hirose M. The role of Wilm's tumor genes. *J Med Invest.* 1999;46(3-4):130-140.

Hong J, Zhao Y and Huang W. Blocking c-myc and stat3 by *E. coli* expressed and enzyme digested siRNA in mouse melanoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;348(2):600-605.

Hussain S, Plückthun A, Allen TM, Zangemeister-Wittke U. Chemosensitization of carcinoma cells using epithelial cell adhesion molecule-targeted liposomal antisense against bcl-2/bcl-xL. *Mol Cancer Ther.* 2006 Dec;5(12):3170-80.

International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2002. *Cáncer Mundial.* Página web: <http://www-dep.iarc.fr/>

Jansen B, Schlagbauer-Wadl H, Kahr H, Heere-Ress E, Mayer BX, Eichler HG, Pehamberger H, Gana-Weisz M, Ben-David E, Kloog Y and Wolff K. Novel Ras antagonist blocks human melanoma growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96(24): 14019-14024.

Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LA, Wu X, Jamison PM, Wingo PA, Howe HL, Anderson RN and Edwards BK. Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975-2001, with special feature regarding survival. *Cancer.* 2004;101(1):3-27.

Katagiri Y, Hozumi Y and Kondo S. Knockdown of Skp2 by siRNA inhibits melanoma cell growth in vitro and in vivo. *J Dermatol Sci.* 2006;42:215–224.

Keilholz U, Goey SH, Punt CJ, Proebstle TM, Salzmann R, Scheibenbogen C, Schadendorf D, Lienard D, Enk A, Dummer R, Hantich B, Geueke AM and Eggermont

AM. Interferon alfa-2a and interleukin-2 with or without cisplatin in metastatic melanoma: a randomized trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Melanoma Cooperative Group. *J Clin Oncol.* 1997;15:2579-2588.

Kim R, Emi M, Tanabe K, Toge T. Therapeutic potential of antisense Bcl-2 as a chemosensitizer for cancer therapy. *Cancer.* 2004 Dec 1;101(11):2491-502. Review.

Koesters R, Linnebacher M, Coy JF, Germann A, Schwitalle Y, Findeisen P and von Knebel Doeberitz M. 2004. WT1 is a tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by in vitro stimulated cytotoxic T cells. *Int J Cancer* 109: 385–392.

Kraehn M, Scharl M and Peter R. Human melanoma: a genetic disease? *Cancer.* 1994; 75: 1228-37.

Lazo PA. Terapia génica humana: tendencias y problemas. *Med Clin (Barc).* 1996; 106:469-476.

Lee SB and Heaver DA. Wilms tumor and the wt1 gene. *Exp Cell.* 2001;264:74-99.

Legha SS, Ring S, Bedikian A, Plager C, Eton O, Buzaid AC and Papadopoulos. Treatment of metastatic melanoma with combined chemotherapy containing cisplatin, vinblastine and dacarbazine (CVD) and biotherapy using interleukin-2 and interferon-alpha. *Ann Oncol.* 1996;7:827-835.

Legha SS. Current therapy for malignant melanoma. *Semin Oncol.* 1989;16:34-44.

Leitner RMC. Epidemiología del melanoma cutáneo. *Rev Argent Dermatol.* 2006; 87:86-97.

Leitner RMC. Epidemiología del melanoma cutáneo. *Rev Argent Dermatol.* 2006; 87:86-97.

Lens MB, Reinam T and Husain AF. Use of tamoxifen in the treatment of malignant melanoma. Systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *Cancer.* 2003; 98:1355-1361.

Leonetti C, Agnado ID, Lozupone F, Valentín A, Geiser T, Zon G, Calabretta B, Citro G and Zupi G. Antitumor Effect of c-myc Antisense Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides on Human Melanoma Cells In Vitro and in Mice. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:419–429.

Little M and Wells C. A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat.* 1997;9:209–225.

Loeb DM, Evron E, Patel CB, Sharma PM, Niranjana B, Buluwela L, Weitzman SA, Korz D and Sukumar S. 2001. Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Res* 61: 921–925.

MacKie RM. Incidence, risk factors and prevention of melanoma. *Eur J Cancer.* 1998; 34:3-6.

Martinez J and Otley C. The management of melanoma and non melanoma skin cancer: a review for the primary care physician. *Mayo Clinic Proc.* 2001;76:1253-65.

Martínez-Saíd H, Cuellar-Hubbe M, Barrón Velásquez E, Padilla RA, Herrera-Gómez A, López Graniel CM, De la Garza SJ and Mohar-Betancourt A. Epidemiology of cutaneous melanoma in México (1980-2002). *Eur J Surg Oncol.* 2004;30(2):163.

Menke AL, Van der Eb AJ and Jochemsen AG. The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene? *Int. Rev. Cytol.* 1998;181:151.

Mulherkar R. Gene therapy for cancer. *Current Science.* 2001;81(5):555-560.

Nakai N, Kishida T, Shin-Ya M, Imanishi J, Ueda Y, Kishimoto S and Mazda O. Therapeutic RNA interference of malignant melanoma by electrotransfer of small interfering RNA targeting Mitf. *Gene Ther.* 2007;14(4):357-365.

Nakatsuka S, Oji Y, Horiuchi T, Kanda T, Kitagawa M, Takeuchi T, Kawano K, Kuwae Y, Yamauchi A, Okumura M, Kitamura Y, Oka Y, Kawase I, Sugiyama H and Aozasa K. Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Modern Pathology.* 2006;19:804–814.

Naoya T, Yusuke O, Naoko T, Asako T, Mari H, Sayaka A, Iyuko F, Ken I, Junya N, Satoshi T, Yayoi K, Saori M, Tanyarat J, Zheyu L, Toshiaki S, Sumiyuki N, Akihiro T, Yoshihiro O and Sugiyama H (2008). Wilm's tumor gene WT1-shRNA as a potent apoptosis-inducing agent for solid tumors. *International Journal of Oncology*. 32:701-711.

Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, Coppola D, Jaroszeski M, Dalton W, Jove R and Yu H. Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res*. 1999;59:5059-5063.

Nykanen A, Haley B, Zamore PD. 2001. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107:309–321.

O'Day SJ, Kim CJ and Reintgen DS. Metastatic melanoma: chemotherapy to biochemotherapy. *Cancer Control*. 2002;9(1):31-38.

Oji Y, Ogawa H, Tamaki H, Oka Y, Tsuboi A, Kim EH, Soma T, Tatekawa T, Kawakami M, Asada M, Kishimoto T and Sugiyama H. Expression of the Wilm's tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res*. 1999;90(2):194-204.

Perry BN, Cohen C, Govindarajan B, Colsonis G and Arbiser J. Wilms tumor 1 expression present in most melanomas but nearly absent in nevi. *Arch Dermatol*. 2006; 142:1031–1034.

Piepkorn M. Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. *J Am Acad Dermatol*. 2000; 42:705-23.

Puig S, Malvehy J, Badenas C, Ruiz A, Jiménez D, Cuéllar F, Azon A, González U., Castel T, Campoy A, Herrero J, Martí R, Brunet-Vidal J and Milá M. Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *J Clin Oncol*. 2005;23:3043-51.

Qian F, Li YP, Sheng X, Zhang ZC, Song R, Dong W, Cao SX, Hua ZC and Xu Q. PRL-3 siRNA Inhibits the Metastasis of B16-BL6 Mouse Melanoma Cells in vitro and in vivo. *Mol Med*. 2007;13(3-4):151-159.

Qian H, Yu J, Li Y, Wang H, Song C, Zhang X, Liang X, Fu M and Lin C. RNA interference against metastasis-associated gene 1 inhibited metastasis of B16F10 melanoma cell in C57BL/6 model. *Biol Cell*. 2007; 99(10):573-81.

Rauscher FJ. The WT1 Wilms tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. *The FAUSEB Journal*. 1993;7:896-903.

Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Mariotto A, Fay MP, Feuer EJ and Edwards BK. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2000, National Cancer Institute. Bethesda, MD. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2000/, 2003.

Roberts SG. 2005. Transcriptional regulation by WT1 in development. *Curr Opin Genet Dev* 15: 542–547.

Rodeck U, Bossler A, Kari C, Humphreys CW, Györfi T, Maurer J, Thiel E and Menssen HD. Expression of the wt1 Wilms' tumor gene by normal and malignant human melanocytes. *Int J Cancer*. 1994;59(1):78-82.

Rodríguez García R, Hechavarría Miyares JH and Azze Pavón MA. Cáncer de piel y ocupación. *Revista Cubana de Medicina [en línea]* 2001; 40 (4): 266-272. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75232001000400005&script=sci_arttext

Rosenfeld C, Cheever MA and Gaiger A. WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. *Leukemia*. 2003;17:1301-1312.

Saiag P, Bernard M, Beauchet A, Bafounta ML, Bourgault-Villada I and Chagnon S. Ultrasonography using simple diagnostic criteria vs palpation for the detection of regional lymph node metastases of melanoma. *Arch Dermatol*. 2005;141:183-9.

Schaffer JV, Rigel DS, Kopf AW and Bolognia JL. Cutaneous melanoma- Past, present and future. *J Am Acad Dermatol*. 2004;51: S65-9.

Scharnhorst V, Dekker P, Van der Eb AJ and Jochemsen AG. Internal Translation Initiation Generates Novel WT1 Protein Isoforms with Distinct Biological Properties. *Jour. of Biol. Chem.* 1999;274(33):23456–23462.

Scholz H and Kirschner KM. A Role for the Wilms' Tumor Protein WT1 in Organ Development. *Physiology*. 2005;20:54–59.

Secretaría de Salud. Registro Histopatológico de las Neoplasias Malignas. Compendio de Cáncer. 2001. México.

Shen H, Xu W, Wu Z, Tang H, Xie Y and Zhong X (2007). Down-regulation of WT1/+17AA gene expression using RNAi and modulating leukemia cell chemotherapy resistance. *Haematologica*. 92:1270-1272.

Stewart BW and Kleihues P. (Eds): *World Cancer Report*. IARC Press. Lyon 2003.

Sumimoto H, Miyagishi M, Miyoshi H, Yamagata S, Shimizu A, Taira K and Kawakami Y. Inhibition of growth and invasive ability of melanoma by inactivation of mutated BRAF with lentivirus-mediated RNA interference. *Oncogene*. 2004;23(36):6031-6039.

Tannous ZS, Mihm MC, Sober AJ and Duncan LM. Congenital melanocytic nevi: Clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52:197-203.

Trinh VA. Current management of metastatic melanoma. *Am J Health Syst Pharm*. 2008 Dec 15;65(24 Suppl 9):S3-8

Wagner KD, Wagner N and Schedl A. The complex life of WT1. *Journal of Cell Science*. 2003;116(9):1653-1658.

Wagner N, Panelos J, Massi D and Wagner KD. The Wilms' tumor suppressor WT1 is associated with melanoma proliferation. *Pflugers Arch*. 2008;455(5):839-47.

Walker MJ, Beattie CW, Patel MK, Ronan SM and Das Gupta TK. Estrogen receptor in malignant melanoma. *J Clin Oncol*. 1987;5:1256–1261.

Walsh P, Gibbs P and Gonzalez R. Newer strategies for effective evaluation of primary melanoma and treatment of stage III and IV disease. *J Am Acad Dermatol*. 2000;42:480-489.

Yang L, Han Y, Suarez Saiz F and Minden MD. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story (Review). *Leukemia*. 2007;21:868–876.

Zamora-Avila DE, Franco-Molina MA, Trejo-Avila LM, Rodríguez-Padilla C, Reséndez-Pérez D, Zapata-Benavides P. RNAi silencing of the WT1 gene inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the B16F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Res*. 2007 Dec;17(6):341-8.

Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101:25–33.

Zitelli JA, Brown CD and Hanusa BH: Surgical margins for excision of primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 1997;37:422-429.

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*. 2005 Mar 1;11(5):1990-8

RESUMEN BIOGRÁFICO

Edgar Manilla Muñoz

Candidato para el Grado de
M.C. con acentuación en Inmunobiología

Tesis: Silenciamiento de WT1 con RNAi y su combinación con Doxorrubicina y Cisplatino en un modelo murino de melanoma

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacido en Ciudad Valles, San Luis Potosí, el 30 de Noviembre de 1983. Hijo del señor Aristeo Manilla García y la señora Juana Muñoz Mendoza.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, de la carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2009, con la tesis titulada: “Efecto combinado del silenciamiento del gen WT1 con RNAi y agentes quimioterapéuticos sobre la proliferación de células de melanoma murino B16F10 *in vitro*”.

Artículos publicados: WT1 silencing by RNAi synergizes with chemotherapeutic agents and induces chemosensitization to doxorubicin and cisplatin in B16F10 murine melanoma cells. 2012. *Oncology Letters*. 3: 751-755.