

eman ta zabal zazu



**Universidad
del País Vasco**

**Euskal Herriko
Unibertsitatea**

**MEDIKUNTZA ETA ODONTOLOGIA FAKULTATEA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA**

**Dpto. de Biología
Celular e Histología**

**Zelulen Biologia
eta Histologia Saila**

**CITOCINAS PROINFLAMATORIAS:
PARTICIPACIÓN EN LA MODULACIÓN DE
LA ACTIVIDAD DEL MELANOMA
EXPERIMENTAL B16**

Por: Juan Carlos de la Cruz Conde

Licenciado en Ciencias Biológicas

LEIOA, 2014

Mi más sincero agradecimiento,

A la Dra. Alicia García de Galdeano, directora de este trabajo por su sinceridad, apoyo, orientación, dedicación y estímulo permanente; pero sobre todo, por la confianza que depositó en mí para la realización del mismo. La aventura que iniciamos está a punto de terminar. Juntos recorrimos todo este camino y a pesar de las adversidades, ha merecido con mucho la pena aprender y trabajar colaborando contigo en este grupo.

A los Profesores M^a Luz Cañavate, Juan Aréchaga, M^a Dolores Boyano, Antonia Álvarez, Francisco José Sáez, Fernando Unda, Enrique Hilario, Gorka Pérez-Yarza, Jon Arlucea, Carmen de la Hoz y Noelia Andollo, por todas las facilidades recibidas a lo largo de la realización de esta Tesis. Entre otras: la cesión de locales y el uso de equipos técnicos (citometría de flujo y microscopía de fluorescencia) e informáticos. Por su asesoramiento científico y haber puesto a mi disposición bibliografía. Así como, material de laboratorio de todo tipo, tanto fungible como diversos productos.

Además, quiero hacer mención especial al Dr. Manuel García Sanz, que aunque ya no este físicamente, nos brindó su colaboración desinteresada y del que siempre obtuvimos todo tipo de facilidades y atenciones.

A mis Amigos que forman parte del Departamento de Biología Celular e Histología, en especial a Loli García Vázquez, la persona que me enseñó con cariño y paciencia infinita. Cuyos consejos y opiniones siempre me resultaron útiles y de la que jamás obtuve palabras de reproche. Trabajamos codo con codo en el Laboratorio de Cultivos IV y a ella debo en gran parte todo lo que soy. Gracias por haber podido contar siempre contigo en cualquier momento de manera incondicional. Sabes que para mí eres la mejor, conocerte ha sido un privilegio y un gran Honor.

A las personas con las que empecé en este mundillo, casi todos ellos son ya Doctores o están trabajando lejos, que me recibieron con los brazos abiertos y que con su ejemplo de espíritu de equipo, afán de superación, constancia, capacidad de trabajo y sacrificio me metieron aún más el gusanillo de la investigación. De la Sala de Alumnos: el Grupo capitaneado por Lorea (Miren, Teresa, Marco, Billy, Josune, Joseba, María, Julio, Aitor, Bea y Javi Mikel) Raquel, Olga y Edurne (Histología) Isa y Javi (Citometría) Yolanda (Cultivos II) Loli y Teresa (Cultivos IV) Marimar, Noelia, Paola, Ricardo, Raúl y Peña (Embriología) y de los Cursos de Doctorado: Ibon y Jon (Biología Celular-Fisiología) y Javi (Central).

A mis Compañeros de sobremesa del "Central" (Celia, Naiara, Susana, Aitor, Arnaldo, Isbaal, María, Mónica, Lucía, Aintza, Bea y Agurtzane) por su hospitalidad, autenticidad y amistad desde el primer momento. Además, tanto en los momentos de ocio como en temas de trabajo, me ofrecieron su atención y me echaron una mano ante cualquier duda o situación adversa que se planteó.

A la segunda "Hornada" de Investigadores y Doctores por sus palabras de aliento: Sergio, Laura, Montse, Galder y Héctor (Histología) Alex, Unai, Cris, Lorena e Iker (Embriología Experimental) sin olvidar a Pipe (Central) al Grupo de los: Iñigo, Elvira, María, Natalia, Virginia, Verónica, Clarisa, Nerea, Aritz, Iker, Itzi, Feli, Joana y Aitor (Cultivos III). Y en especial, a mis colegas del laboratorio de Inmunología Celular en esta última etapa: Philippe, Jangi y Sahand, Borja, Itzi y Yoana. Su colaboración eficaz, experiencia, perseverancia y esfuerzo me empujaron a terminar con más ganas si cabe este proyecto. Mucha suerte a todos.

A los integrantes del "Talde Estabulario" (Gloria, Amale, Adolfo (aunque ya no estés físicamente, siempre serás un referente a seguir) Almu, Arantzazu, Miren Josu, Elena, Yolanda, Garbi, Pepe, Natalia, Arantza, Maite, Idoia, Susana, Eneritz y Cristina) trabajar con vosotras es una gozada. Nunca olvidaré los buenos momentos que disfrutamos juntos: los descansos de café y palmera, las cuchipandas, las parrilladas en Akarlanda y las salidas lúdico-gastronómicas. Pero sobre todo, gracias por vuestra amistad incondicional, ayuda constante y colaboración en lo laboral y en lo personal. Vuestra impecable profesionalidad, esfuerzo y asesoramiento, son un ejemplo a seguir de buen hacer y de Servicio óptimo. Bihotz-bihotzez eskerrik asko!

A la plantilla del AZP/PAS del Dpto. (Mila, M^a José, Cristina, Adolfo, Rafael, Pilar y Asun) Carmen (Microbiología) Fernando y Delbiñe (Neurociencias) y Zuriñe (Audiovisuales) por su alegría, paciencia y amabilidad. Además, por su eficacia y profesionalidad técnica y administrativa que contribuyeron a que todo fuera mucho más fácil. También a Mari Carmen, Candelas, Encarni, Vanessa, María y José Luis, por TODA su ayuda y simpatía cada tarde.

A TODOS mis inolvidables Compañer@s del Campus de Gipuzkoa, que desde el primer momento me recibieron con los brazos abiertos, donde todo fueron facilidades y atenciones. Juntos hemos colaborado y convivido intensamente durante casi 5 años en la Facultad de Psicología ¡Qué rápido pasa el tiempo cuando estás tan a gusto y te sientes uno más del Grupo! En especial, a TODOS los integrantes del Departamento de Procesos Psicológicos Básicos y su Desarrollo. Al Grupo de Psicobiología, que me brindó la oportunidad de vivir la Ciencia desde otro punto de vista (Arantza, Larraitz, Amaia, Joserra, Eduardo, Gari, Oscar, Yayone y Raúl entre otros) a los nuevos Investigadores que se incorporan al grupo (Aitziber, Eneritz, Eider, Aritz, Joana y Ainhitze). Agradecimiento que hago extensivo a TODO el Grupo de Aprendizaje, en especial a: Sindi, Gabriela, Elena, Rocío, Joxan, Naiara y Mirari. Por último, a dos grandes Profesionales que colaboraron conmigo en el Servicio General de Animalario del Campus de Gipuzkoa (SGIker) sin cuya ayuda nada habría sido posible (Eneritz Gómez y Raquel Amigo).

A mis Compañer@as del AZP/PAS de Gipuzkoa. Cada uno en su Campo contribuyó a que este trabajo fuera más fácil. El Grupo de la Biblioteca de Psicología/FICE (Idoia, Mónica, Arantza M y R, Gabi, Paloma, Txoperena, Edurne y María) el Personal de Conserjería (Joseba, Bea, Juan Mari, Mikel, Mertxe y Txerra) el Personal de Administración (Loli, Arrate, Isa y TODAS mis chicas de Secretaría FIFI y PIPI) Laura y Aitor (Audiovisuales) Jorge, Pello y Julio (CIDIR) Fredy (Mc Giver) y Mikel (Phone). Muy en especial, a mi gran Amiga Ana Saralegi a la que debo muchísimo.

A mis Padres (M^a del Rosario y Nicolás) a mis Hermanos (José Ignacio y Begoña) a mi cuñado Iñigo y a mi sobrino Iker, por haber estado a mi lado durante todo este tiempo, animándome y apoyándome en los buenos y malos momentos, sin su comprensión y ayuda este proyecto no hubiese sido posible. Vuestro cariño a pesar de mis agobios ha sido el aliento y la fuerza que me ha guiado durante este tiempo. Por todo esto y mucho más, esta Tesis Doctoral fruto del trabajo de estos años está dedicada especialmente a vosotros.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN.....	XIX

I. INTRODUCCIÓN **1**

1. Progresión tumoral y metástasis.....	1
2. Melanoma.....	7
3. Citocinas.....	11
3.1. Interleucina 2 (IL-2).....	14
3.2. Interleucina 6 (IL-6).....	19
3.3. El Factor de Necrosis Tumoral-alpha (TNF-α).....	23
3.3.1. Participación del TNF- α en el desarrollo tumoral.....	35

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS **43**

1. Antecedentes e Hipótesis.....	43
2. Objetivos.....	46

III. MATERIALES Y MÉTODOS **49**

1. Materiales.....	49
1.1. Líneas celulares.....	49
1.2. Materiales empleados en los cultivos celulares.....	51
1.3. Medios, reactivos y soluciones.....	51
1.3.1. Medios de cultivo.....	51
1.3.2. Reactivos y soluciones tamponadas.....	52
1.3.3. Soluciones fijadoras.....	53
1.3.4. Colorantes.....	54
1.3.5. Medios de montaje.....	54
1.4. Productos de origen biológico.....	55

2. Métodos	59
2.1. Cultivos celulares	59
2.1.1. Mantenimiento de las líneas tumorales.....	59
2.1.2. Mantenimiento de la línea L929.....	60
2.1.3. Mantenimiento de la línea CTLL-2.....	60
2.1.4. Congelación y descongelación de células.....	60
2.1.5. Viabilidad y recuento celular.....	61
2.2. Ensayo de invasión celular	62
2.3. Cámaras de cultivos celulares asociadas a portaobjetos	64
2.3.1. Tinción de F-Actina con TRICT-Faloidina.....	65
2.4. Ensayo de adhesión celular	66
2.5. Determinación de moléculas de superficie: CD44, ICAM-1	
RIL-2α, RIL-2β y VLA-4	68
2.5.1. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta.....	68
2.5.2. Análisis mediante citometría de flujo.....	69
2.5.3. Microscopía de inmunofluorescencia.....	70
2.6. Capacidad clonogénica: Formación de colonias	71
2.7. Estudio de la actividad proliferativa celular: Ensayo XTT	74
2.8. Ciclo celular: Marcaje con yoduro de propidio	75
2.8.1. Análisis mediante citometría de flujo.....	75
2.9. Producción de IL-2: ensayo biológico con las células	
CTLL-2	78
2.10. Producción de IL-6: inmunoensayo enzimático (Kit comercial de	
la IL-6)	81
2.11. Producción de TNF-α	83
2.11.1. Obtención de sobrenadantes.....	83
2.11.2. Determinación del contenido en TNF- α : Bioensayo con	
células L929.....	83
2.12. Determinación de los niveles de expresión de p21^{WAF1/CIP1}	
mediante inmunoensayo	85

IV. RESULTADOS **89**

1. Estudio del efecto de la IL-2 y de la IL-6 en las células del	
melanoma B16	89
1.1. Determinación de la capacidad de invasión de las células del melanoma	
B16 tratadas con IL-2 e IL-6.....	89

1.2. Determinación de la capacidad de adhesión “in vitro” de las células del melanoma B16 tratadas con IL-2 e IL-6.....	92
1.3. Estudio de la modulación por IL-2 de los niveles de expresión del receptor de la IL-2 (RIL-2 α , RIL-2 β) y de ICAM-1 en las células del melanoma B16.....	94
1.4. Estudio de la modulación por IL-6 de los niveles de expresión de VLA-4 en las células del melanoma B16.....	97
1.5. Determinación de la capacidad clonogénica de las células del melanoma B16 tratadas con IL-2 e IL-6.....	98
1.6. Estudio de la capacidad de producción de IL-2 e IL-6 en las células del melanoma B16.....	99
1.7. Determinación de la capacidad proliferativa en las células del melanoma B16 tratadas con IL-2 e IL-6.....	104
2. Estudio del efecto del TNF-α en las células del melanoma B16.....	108
2.1. Determinación de la capacidad de invasión de las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α	108
2.2. Efecto del TNF- α sobre el patrón de distribución de filamentos de F-actina en las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α	110
2.3. Determinación de la capacidad de adhesión “in vitro” de las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α	112
2.4. Estudio de los niveles de expresión de las moléculas de adhesión: VLA-4 y CD44 en células del melanoma B16 tratadas con TNF- α	114
2.5. Determinación de la capacidad clonogénica de las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α	119
2.6. Determinación de la capacidad de proliferación de las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α	120
2.7. Estudio del ciclo celular en las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α	123
2.8. Estudio de los niveles de expresión de p21 ^{WAF1/CIP1} en las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α	128
2.9. Efecto de la C ₂ -ceramida sobre las células del melanoma B16: proliferación y capacidad clonogénica.....	130
2.10. Estudio de la capacidad de producción de TNF- α por las células del melanoma B16.....	135
2.11. Inducción de la producción de IL-2 por TNF- α en las células del melanoma B16.....	137

2.12. Inducción de la producción de IL-6 por TNF- α en las células del melanoma B16.....	139
2.13. Análisis de la capacidad proliferativa y clonogénica del TNF- α en las células del melanoma B16 pretratadas con IL-2 e IL-6.....	141

V. DISCUSIÓN 145

1. Estudio de la IL-2 e IL-6 en el melanoma B16.....	147
1.1. Efecto inducido por IL-2: modulación de la invasión y la expresión de ICAM-1.....	147
1.2. Expresión del sistema IL-2/RIL-2 en el melanoma B16.....	152
1.3. Efecto inducido por IL-6: modulación de la invasión y la expresión de VLA-4.....	154
2. Estudio del TNF en el melanoma B16.....	161
2.1. Modulación por el TNF de las propiedades de invasión y adhesión.....	161
2.2. Modulación por el TNF- α de la capacidad de formación de colonias, la actividad proliferativa, el ciclo celular y el estado redox de las células B16.....	167
2.3. Mecanismos involucrados en el efecto del TNF- α : expresión de p21 ^{WAF1/Cip1}	171
2.4. Ceramida induce muerte celular en el melanoma B16.....	175
2.5. El TNF como factor de supervivencia para el melanoma B16.....	177
3. TNF y microambiente tumoral.....	180

VI. CONCLUSIONES 185

VII. BIBLIOGRAFÍA 189

VIII. ANEXO 245

1. Publicaciones.....	245
------------------------------	------------

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Cascada Metastática. Ilustración esquemática de la sucesión que tiene lugar en la diseminación hematológica de un tumor.....2
- Figura 2.** Vías de transducción de la señal del TNF- α29
- Figura 3.** Línea celular en cultivo. (A) Melanoma B16F10 (10x). (B) Melanoma B16F10 (32x).....50
- Figura 4.** Ensayo de invasión celular en macroplaca. (A) Materiales utilizados: insertos, macroplacas de 24 pocillos adaptadas para usar con insertos y pinzas. (B) Recubriendo el pocillo con MATRIGEL y añadiendo el medio de cultivo.....63
- Figura 5.** Cámara de cultivos celulares asociada a portaobjetos (Tissue Culture Chambers Slide, Nunc).....64
- Figura 6.** Ensayo de adhesión celular “in situ”. Histogramas de adhesión celular “in situ” de las líneas de melanoma B16F1, B16F10 y de la línea de fibroblastos L929 a MATRIGEL durante 1 o 2 horas de cultivo.....67
- Figura 7.** Ensayo de capacidad clonogénica en distintos recipientes de cultivo. (A) Colonias de células del melanoma B16F10 en placas Petri. (B) Colonias de células del melanoma B16F1 en placas Petri. (C) Colonias de células del melanoma B16F10 en microplacas de 96 pocillos. (D) Colonias de células del melanoma B16F10 en macroplacas de 24 pocillos (E) Placa de 24 pocillos de un ensayo de formación de colonias con células B16F10. (F) Detalle de una colonia 40X.....73
- Figura 8.** Citometría de flujo de células del melanoma B16F10 marcadas con yoduro de propidio. (A) Histograma biparamétrico de contornos de nivel. (B) Histograma biparamétrico de nube de puntos. (C) Histograma monoparamétrico de intensidad de fluorescencia en escala logarítmica.....77

Figura 9. Bioensayo para la determinación de IL-2. (A) Cultivo de células CTLL-2. (B) Curva patrón de la producción de IL-2.....	80
Figura 10. Inmunoensayo enzimático para la determinación de IL-6. (A) Kit comercial de IL-6. (B) Curva patrón de la producción de IL-6.....	82
Figura 11. Bioensayo para la determinación de TNF- α . (A) Cultivo de fibroblastos L929. (B) Placa de 96 pocillos con células B16F10 de un ensayo de producción de TNF- α	84
Figura 12. Citometría de flujo de células del melanoma B16F10 marcadas con p21 ^{WAF1/CIP1} . (A) Histograma biparamétrico de contornos de nivel. (B) Histograma biparamétrico de nube de puntos. (C) Histograma monoparamétrico de intensidad de fluorescencia en escala logarítmica.....	86
Figura 13. Ensayo de capacidad de invasión de las células del melanoma B16. (A) Células B16 con un movimiento invasivo predominantemente de tipo mesenquimal. (B) Células B16 con un movimiento invasivo predominantemente de tipo ameboide. (C) y (D) Células B16 que exhiben un movimiento invasivo tanto mesenquimático como ameboide.....	90
Figura 14. Capacidad de invasión de las células del melanoma B16 tratadas con IL-2 e IL-6. (A) Células B16F1. (B) Células B16F10.....	91
Figura 15. Capacidad de adhesión a MATRIGEL de las células del melanoma B16F1 y B16F10 tratadas con IL-2 e IL-6. (A) Tratamiento “in situ”. (B) Pretratamiento.....	93
Figura 16. Análisis de la expresión de los receptores de la IL-2: RIL-2 α , RIL-2 β e ICAM-1 en las células CTLL-2 y en las células del melanoma B16F1	95
Figura 17. Análisis de la expresión de las moléculas de superficie de las células del melanoma B16F1 tratadas con IL-2 y las células CTLL-2. (A) Receptor de la IL-2 (RIL-2 β). (B) Receptor de la ICAM-1.....	96
Figura 18. Capacidad de proliferación de las células CTLL-2 tratadas con PMA.....	100
Figura 19. Efecto del PMA en los cultivos de las células del melanoma B16. (A) Células B16F1. (B) Células B16F10.....	101

Figura 20. Estudio de la producción de IL-6 en las células del melanoma B16F1 y B16F10.....	102
Figura 21. Curva patrón de la inducción por PMA de la producción de IL-6 en las células del melanoma B16F1 y B16F10.....	103
Figura 22. Proliferación de las células del melanoma B16 tratadas con IL-2 durante 24, 48 y 72 h. de cultivo. (A) Células B16F1. (B) Células B16F10.....	105
Figura 23. Proliferación de las células del melanoma B16 tratadas con IL-6 durante 24, 48 y 72 h. de cultivo. (A) Células B16F1. (B) Células B16F10.....	106
Figura 24. (A) Curva patrón del efecto antiproliferativo de la actinomicina-D sobre las células del melanoma B16. (B) Proliferación de las células del melanoma B16F1 y B16F10 tratadas con IL-2 e IL-6.....	107
Figura 25. Efecto del TNF- α sobre la capacidad de invasión de las células del melanoma B16. (A) Número de colonias obtenidas en las células B16F1 pretratadas con TNF- α durante 72 h. (B) Número de colonias obtenidas en las células B16F10 pretratadas con TNF- α durante 24 h.....	109
Figura 26. Patrón de distribución de filamentos de F-actina en el citoesqueleto de las células del melanoma B16 teñidas con TRICT-faloidina. (A) Células B16 Control. (B) Células B16 tratadas con TNF- α . (C) Células del melanoma B16 en división celular. (D) Detalle del citoesqueleto de una de estas células.....	111
Figura 27. Capacidad de adhesión de las células del melanoma B16. (A) Tratamiento “in situ” (B) Pretratamiento con TNF- α durante 24 h.....	113
Figura 28. (A) Inmunofluorescencia de las células del melanoma B16F1 tratadas con TNF- α para la detección de la molécula de adhesión CD44 (B) Niveles de expresión de la molécula de adhesión CD44 en las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α en las dos concentraciones testadas.....	115

Figura 29. Histogramas monoparamétricos de intensidad de fluorescencia en escala logarítmica de citometría de flujo de los niveles de expresión de las moléculas de adhesión VLA-4 y CD44 en las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α	116
Figura 30. Histogramas monoparamétricos de intensidad de fluorescencia en escala logarítmica de citometría de flujo de los niveles de expresión de la molécula de adhesión VLA-4 en las células del melanoma B16 tratadas 24 h. con TNF- α	117
Figura 31. (A) Niveles de expresión de la molécula de adhesión VLA-4 en las células del melanoma B16F1 y B16F10 tratadas con TNF- α durante 24 y 48 h. (B) Niveles de expresión de la molécula de adhesión VLA-4 en las células del melanoma B16F1 tratadas con TNF- α durante 24 y 72 h.....	118
Figura 32. Proliferación de las células del melanoma B16F10 suplementadas al 1% y 10% SBF durante 24, 48 y 72 h. de cultivo.....	121
Figura 33. Proliferación de las células del melanoma B16F10 suplementadas al 1% y 10% de SBF, tratadas con dosis de TNF- α durante 96 h. de cultivo.....	122
Figura 34. Histogramas monoparamétricos de intensidad de fluorescencia en escala logarítmica de citometría de flujo de las células del melanoma B16F1 marcadas con el yoduro de propidio.....	125
Figura 35. Ciclo celular de células del melanoma B16F10 tratadas con TNF- α . (A) 10% de SBF. (B) 1% de SBF.....	126
Figura 36. Ciclo celular de las células tratadas con TNF- α . (A) Células B16F1. (B) Células L929.....	127
Figura 37. Citometría de flujo de las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α y marcadas con p21 ^{WAF1/CIP1} . (A) Histogramas monoparamétricos de intensidad de fluorescencia en escala logarítmica de citometría de flujo de células del melanoma B16F1 control (en negro) y tratadas con TNF- α (en azul). (B) Niveles de expresión de las células del melanoma B16F1 y B16F10 tratadas con TNF- α y teñidas con el fluorocromo p21 ^{WAF1/CIP1}	129

Figura 38. Células del melanoma B16F10 tratadas con C ₂ -ceramida durante 24 h.....	131
Figura 39. Proliferación de las células del melanoma B16 suplementadas con 1% y 10% de SBF y tratadas con C ₂ -ceramida. (A) 24 horas. (B) 48 horas. (C) 72 horas.....	132
Figura 40. Análisis de tres experiencias independientes de proliferación celular de 72 h. en células del melanoma B16 tratadas con TNF- α o C ₂ -ceramida. (A) Cultivos al 1% de SBF. (B) Cultivos al 10% de SBF.....	133
Figura 41. (A) Curva patrón de la producción de TNF- α por las células L929. (B) Sobrenadantes de las células del melanoma B16F10 tratadas con distintas dosis de IL-2 e IL-6 sometidos al ensayo de citotoxicidad de las células L929.....	136
Figura 42. Inducción de la producción de IL-2 por TNF- α en las células del melanoma B16. (A) Sobrenadantes de las células B16 cultivadas al 1% de SBF (B) Sobrenadantes de las células B16 cultivada al 10% de SBF.....	138
Figura 43. Inducción de la producción de IL-6 por TNF- α en las células del melanoma B16.....	140

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Miembros de la Familia o Sistema del TNF.....	24
Tabla 2. Ciclo celular de las células del melanoma B16.....	76
Tabla 3. Niveles de expresión de la molécula de adhesión VLA-4 en las células del melanoma B16 tratadas con diferentes dosis de IL-6.....	97
Tabla 4. Capacidad clonogénica de las células del melanoma B16F1 y B16F10 tratadas con IL-2 durante 24 h. y tratadas con IL-6 durante 48 h.....	98
Tabla 5. Capacidad clonogénica de las células del melanoma B16F1 y B16F10 tratadas con TNF- α durante 24 h.....	119
Tabla 6. Células del melanoma B16F1 y B16F10 tratadas con TNF- α	122
Tabla 7. Ciclo celular de las células del melanoma B16F1 tratadas con TNF- α	125
Tabla 8. Capacidad clonogénica de las células del melanoma B16F1 tratadas con C ₂ -ceramida.....	134
Tabla 9. Ensayos de capacidad clonogénica y proliferación celular de las células del melanoma B16 tratadas con IL-2 durante 24 h. o tratadas con IL-6 durante 48 h. a las dosis indicadas.....	141

ABREVIATURAS

Aa	Aminoácido.
Abs	Absorbancia.
Act-D	Actinomicina-D.
ADN	Acido desoxiribonucleico.
AJCC	American Joint Committee on Cancer.
AMF	Factor de motilidad autocrino.
apdo.	Apartado.
APRIL	A Proliferating-Inducing Ligand.
ARN	Acido ribonucleic.
BAFF	B cell Activating Factor belonging to the TNF Family.
BCG	Bacilo de Calmette-Guerin.
BCMA	B-Cell Maturation Antigen.
BRAF	Gen que codifica la quinasa de la proteína serina-treonina, (Serine-threonine protein kinase B-RAF).
BSA	Albúmina sérica bovina.
C ₂ -ceramida	N-Acetyl-D-erythro-Sphingosine.
CDK	Ciclinas dependientes de quinasas, (Cyclin Dependent Kinases).
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementario.
cél/ml	Células por mililitro.
cm	Centímetro.
cm ²	Centímetro cuadrado.
CsA	Ciclosporina A.
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole (dihydrochloride).
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
EDTA	Acido etilen-diamino-tetraacético.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico, (Epidermal Growth Factor).
EMT	Transición Epitelio-Mesenquimal.
ERM	familia de proteínas Ezrina-Radixina-Moesina.
FAS	Factor apoptotic synthesis.
Fig	Figura.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, (Fluorescein Isothiocyanate).

g	Gramo.
GSH	Glutación.
h	Hora.
HA	Ácido hialurónico.
HEPES	Tampón HEPES (4-(2-hidroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid).
HVEM	Herpes Virus Entry Mediator.
IAP	Inhibidores de la Apoptosis.
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1, (Intracellular Adhesion Molecule-1).
IFN	Interferón.
Ig G	Inmunoglobulina G.
IL-1 β	Interleucina 1 β .
IL-2	Interleucina 2.
IL-6	Interleucina 6.
IL-6R	Receptor de la Interleucina-6.
ILs	Interleucinas.
IP	Ioduro de propidio.
JAK	Janus quinasa.
Kd	Constante de Disociación.
KD	KiloDaltons.
l	Litro.
LAK	Células asesinas activadas por citocinas, (Lymphokine Activated Killer).
LDH	Lactato deshidrogenasa.
LPS	Lipopolisacárido.
2-ME	2-Mercaptoetanol.
M	Molar.
μ g	Microgramo.
μ g/cámara	Microgramo por cámara.
μ g/ml	Microgramo por mililitro.
μ g/vial	Microgramo por vial.
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad.
min	Minuto.
MITF	Factor de Transcripción asociado a la Microftalmia, (Microphthalmia-associated Transcription Factor).
MMP	Metaloproteinasa de la matriz extracelular, (Matrix MetalloProteinase).

μ l	Microlitro.
ml	Mililitro.
μ l/ml	Microlitro por mililitro.
ml/pocillo	Mililitro por pocillo.
μ l/tubo	Microlitro por tubo.
μ m	Micrómetro.
μ M	Micromolar.
mm	Milímetro.
mM	Milimolar.
mRNA	ácido ribonucléico mensajero.
ng/ml	Nanogramo por mililitro.
NF- κ B	Factor nuclear kappa B.
NGF	Factor de crecimiento nervioso, (Nerve Growth Factor).
NK	Células Natural Killer.
NKT	Células Natural Killer T.
nm	Nanómetro.
OPG	Osteoprotegerin.
p	probabilidad.
p21	p21 ^{WAF1/CIP1} .
PBS	Tampón fosfato salino, (Phosphate Buffered Solution).
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas, (Platelet Derived Growth Factor).
PET	Polietileno teretalato.
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa.
pg/ml	Picogramo por mililitro.
Pm	Peso molecular.
pM	Picomolar.
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate.
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand.
RIL-2 α	Receptor de la Interleucina-2 α .
RIL-2 β	Receptor de la Interleucina-2 β .
RIL-2 γ	Receptor de la Interleucina-2 γ .
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno.
SB	Sobrenadante.
SBF	Suero Bovino Fetal.
TGF- β	Factor de crecimiento transformante-B.
TACI	Transmembrane Activator and CAML interactor.

TIL	Linfocitos infiltrantes del tumor, (Tumor-Infiltrating Lymphocytes).
TIMP-1	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1.
TNF	Factor de Necrosis Tumoral, (Tumor Necrosis Factor).
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral- α , (Tumor Necrosis Factor alpha).
TNF- β	Linfotoxina.
TNF-RI	Receptor del Factor de Necrosis Tumoral I.
TNF-RII	Receptor del Factor de Necrosis Tumoral II.
TRAIL	TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand.
TRITC	Isotiocianato de tetrametil-rodamina, (Tetramethyl rhodamine B isothiocyanate).
TWEAK	TNF-related Weak inducer of Apoptosis.
T ^a	Temperatura.
U/mg	Unidades por miligramo.
U/ml	Unidades por mililitro.
U/vial	Unidades por vial.
UV	Ultravioleta.
v	Volumen.
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular, (Vascular Cell Adhesion Molecule).
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial, (Vascular Endothelial Growth Factor).
VLA-4	Antígeno de aparición tardía-4, (Very Late Antigene-4).
XTT	Sal de tetrazoilo.
°C	Grados centígrados.

RESUMEN

RESUMEN

El melanoma es una enfermedad tumoral que se caracteriza por su alto potencial de agresividad y capacidad metastática. Su evolución con frecuencia es imprevisible y además, su incidencia está aumentando más rápidamente que la de cualquier otra neoplasia por lo que se ha convertido en un problema médico. Esta alta incidencia del melanoma se explica porque es una patología ligada a la exposición a la luz solar y por el incremento de la esperanza de vida en los países con cultura occidental. Una de las características fundamentales de esta patología tumoral es su localización superficial, lo que nos permite observar y estudiar directamente la progresión tumoral del melanoma. Los tratamientos habituales contra el cáncer no son efectivos en la terapia contra el melanoma, debido a que es resistente a la quimioterapia y a la radioterapia.

En las últimas décadas se está tratando de introducir la Bioterapia del cáncer, que se basa en el uso de sustancias que pueden ser sintetizadas por el propio sistema inmune del paciente, que se denominan agentes inmunomoduladores con objeto de luchar contra los tumores. Las citocinas son agentes inmunomoduladores y en el caso del melanoma, varias de ellas como son: la IL-2, los IFNs y el TNF- α pueden tener una relevancia especial como factores que también modulan la actividad de las células del sistema inmune, ya que este tipo tumoral es altamente inmunogénico. Por ello, muchas de las estrategias terapéuticas actuales se basan en la utilización de estas citocinas en combinación con factores que regulan los mecanismos de inmunosupresión y el empleo de las técnicas de biotecnología.

Utilizando el modelo de melanoma experimental B16, nuestra línea de investigación se ha centrado en el estudio de la interacción de las células tumorales con las células del sistema inmune, y más concretamente, en la participación de las citocinas proinflamatorias en la adquisición del fenotipo metastático. Resultados previos demostraron que las células B16F10 tratadas con IL-2 e IL-6 inducían un aumento de la capacidad metastática in vivo. Este efecto parecía ser órgano específico ya que la IL-2 aumentaba el número de focos tumorales en el hígado, mientras que el tratamiento con la IL-6 indujo un incremento de la capacidad metastática en el pulmón.

Para intentar averiguar el mecanismo responsable del efecto prometastático in vivo de la IL-2 y la IL-6, en el presente trabajo hemos querido profundizar en el papel de estas citocinas en la modulación de la actividad de las células del melanoma, utilizando sublíneas de distinta capacidad metastática (B16F1 y B16F10). Así mismo, hemos incluido en el estudio el TNF- α , otra potente citocina proinflamatoria y principal inductora de la expresión de la IL-6. Además, hemos analizado las posibles interacciones entre estas citocinas en este modelo.

Los resultados obtenidos revelan que tanto la IL-2, la IL-6 como el TNF- α modulan directamente la actividad de las células del melanoma. Las células B16 de distinta capacidad metastática (B16F1 y B16F10) responden de forma similar a estos factores, si bien con diferencias de magnitud. Aunque no son inductoras de procesos celulares típicamente asociados al fenotipo metastático como son la capacidad invasiva, clonogénica y actividad proliferativa, que de hecho en algunos casos están reguladas negativamente, el conjunto de los resultados apunta a que la IL-2, la IL-6 y el TNF- α actúan como factores de supervivencia para las células del melanoma B16, posiblemente utilizando mecanismos distintos; que en el caso del TNF- α el efecto estaría mediado por la inducción del regulador del ciclo celular p21^{WAF1/Cip1}.

I. INTRODUCCIÓN

1. Progresión tumoral y metástasis

El estudio de la metástasis, es decir, del proceso que conduce a la formación de focos metastáticos ha recibido una considerable atención ya que en pacientes cancerosos, la mayoría de las muertes son causadas por metástasis que son resistentes a la terapia (Fidler y Hart, 1982; Fidler y Balch, 1987). Aún así, puede ocurrir aunque raramente sucede, que se produzcan remisiones que conllevan el paso de formas malignas a benignas y en ciertos casos, la desaparición completa del tumor (Salomon, 1991).

La metástasis es un proceso activo, a lo largo del cual, células tumorales capaces de liberarse del tumor primario pueden dar lugar a la formación de nuevos focos tumorales o metástasis, las cuales suelen ser las causantes de la muerte del individuo. A lo largo de este proceso las células neoplásicas han tenido que superar diferentes barreras o restricciones potencialmente letales, impuestas por su propio crecimiento y por la interacción con las células del organismo, especialmente con las células del sistema inmune. Esta serie de etapas se denomina la cascada metastática (Figura 1) (Isamat y cols., 1994; Tannock y col., 1998; Brooks y cols., 2010; Chaffer y Weinberg, 2011; Ganguly y cols., 2013).

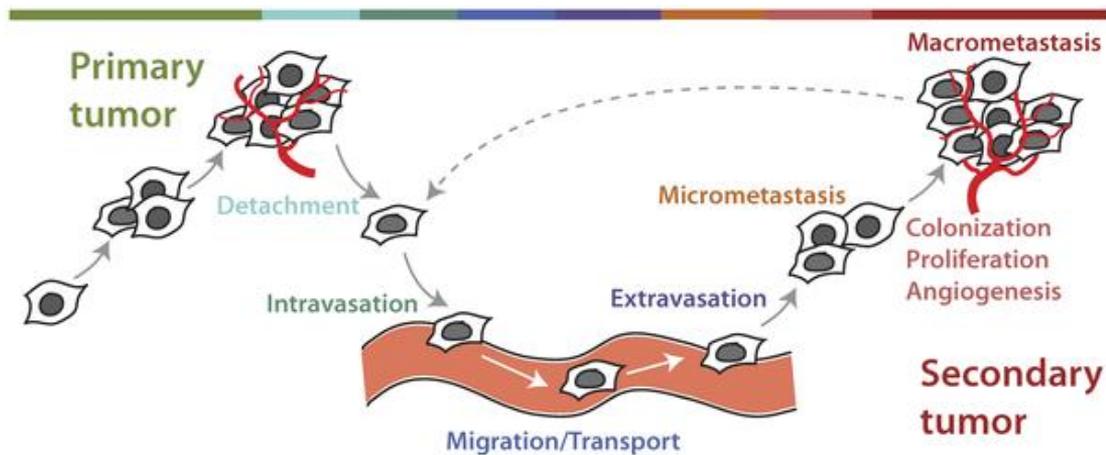


Figura 1. Cascada metastática. Ilustración esquemática de la sucesión que tiene lugar en la diseminación hematogena de un tumor. Fuente de la imagen: Divoldí A, Mendonca E.A, Evans J.A, Rzhetsky A. 2011. Conflicting biomedical assumptions for mathematical modeling: the case of cancer metastasis. PLoS Computational Biology 7 (10): 31002132.

El primer paso que conduce a la metástasis es la infiltración e invasión del tejido que rodea al tumor primario. De hecho, unas de las características de los focos malignos tumorales es que suelen estar mal delimitados respecto del tejido normal adyacente y sus células tienen capacidad de invadirlo. La presión mecánica, la motilidad celular, la adhesión (célula-célula o célula-matriz extracelular) y la capacidad de digestión de la matriz extracelular del tejido circundante (del estroma) son los mecanismos causantes de la invasión (Nicolson, 1988; Fidler, 1991; Liotta y cols., 1991; Aznavoorian y cols., 1993; Klein y Aplin, 2009).

Para que ocurra la invasión, las células tumorales deben atravesar las membranas basales. La membrana basal está constituida fundamentalmente por fibras proteicas como el colágeno IV, la laminina y elastina así como por diversos tipos de proteoglicanos. La invasión puede ser local, dentro del mismo tejido, aprovechar las características del mismo para crecer a su consta. Por otro lado, el mecanismo de invasión endotelial de la membrana basal por parte de las células tumorales se ha descrito en tres etapas: Primero se adhieren a la membrana subendotelial. Seguidamente, las células tumorales segregan elementos proteolíticos (colagenasa, catepsina, activador del plasminógeno, etc.) que degradan los componentes de la matriz extracelular. Por último, migran a través de la membrana basal mediante protusión de pseudópodos y locomoción (Feldman y Eisenbach, 1989; Aznavoorian y cols., 1993).

Una vez atravesada la membrana basal, las células tumorales invaden el estroma intersticial del tejido huésped utilizando mecanismos de adhesión y degradación enzimática de un modo coordinado. Para su diseminación las células tumorales utilizan los sistemas vasculares del organismo: el sistema linfático y el sistema sanguíneo. La entrada en los vasos o intravasación sigue el mismo proceso de invasión de la membrana basal ya descrito anteriormente.

Además del sistema circulatorio del huésped, las células tumorales pueden utilizar los vasos sanguíneos cuya formación han inducido ellas mismas en el seno de la masa tumoral. De hecho, la angiogénesis inducida por el propio tumor es uno de los procesos fundamentales que van a permitir el desarrollo tumoral (Weiss y cols., 1989; Blood y Zetter, 1990; Liotta y cols., 1991; Peignen 1995).

Las células tumorales que viajan por el torrente circulatorio o linfático, interactúan con moléculas y células de la sangre. Especialmente importante es la interacción con las células del sistema inmune ya que estas células pueden desencadenar la

lisis de las células tumorales y por tanto su eliminación. De hecho, de todas las células que entran en el torrente sanguíneo, sólo una pequeña parte sobreviven. Este hecho ha sido denominado "ineficiencia metastática" (Weiss, 1985). Por el contrario, las plaquetas pueden favorecer la metástasis ya que al unirse a las células tumorales les protegen del daño físico, les aportan factores de crecimiento, favorecen los mecanismos de adhesión a las paredes vasculares y forman émbolos que facilitan la detención en los capilares (Tuszynski y cols., 1987; Rusciano y Burger, 1992).

La detención de las células tumorales que viajan por el torrente sanguíneo es el primer paso para el inicio de la colonización del órgano diana. Para explicar la detención y colonización de las células en un órgano determinado se han mantenido dos teorías que en sí mismas no son exclusivas. La teoría del "seed and soil" de Paget (1889) que propone que las metástasis surgen como consecuencia de la interacción específica entre la célula tumoral y el órgano diana. La teoría anatómo-mecánica, que da especial relevancia a las conexiones vasculares.

La extravasación de las células tumorales se produce de forma similar a la invasión local, Esto es que tras la adhesión específica se produce la destrucción de la lámina basal, Seguida de la penetración y migración a través de la matriz subendotelial con digestión de los componentes de la misma. Sin embargo, la mera presencia de células tumorales en un órgano dado no siempre garantiza el desarrollo de metástasis debido a que si las células no encuentran un entorno adecuado para su proliferación (el "soil" de Paget) pueden permanecer en estado de latencia durante un período variable de tiempo e incluso desaparecer (Paget, 1889).

Si el entorno celular del órgano diana lo permite, se produce el último paso decisivo en el proceso metastático que es la proliferación de las células que se han asentado en el parénquima, dando colonias que son clínicamente detectables. En el nuevo medio las células tumorales pueden encontrar entre otros, factores de crecimiento y de motilidad, que favorezcan su colonización. Las células con mayor capacidad metastática pueden desarrollar mecanismos de estimulación autocrinos que les confieran autonomía respecto del entorno, e incluso pueden inducir a las células huésped a producir factores que tengan un efecto positivo sobre el crecimiento del foco metastático (Rusciano y Burger, 1992; Nicolson, 1993; Huang y cols., 2008; Kim y cols., 2009; Brooks y cols., 2010; Linsay y cols., 2011).

Para que el proceso metastático tenga lugar, las células malignas van mutando y adquiriendo nuevas características que les confieran la capacidad de sintetizar una serie de moléculas que les permitan completar con éxito su transformación y supervivencia. El conjunto de estas moléculas que son necesarias para la metástasis, así como las propiedades que dichas moléculas confieren a la célula, es lo que se ha denominado "fenotipo metastático".

Para la adquisición del fenotipo metastático, durante todo el proceso de la metástasis, no existe un único "metastogen" encargado de conferir malignidad a una célula, sino una colección de moléculas, como las oncoproteínas, las moléculas de adhesión, las proteasas, las citocinas, los factores de motilidad y los factores de crecimiento que colaboran unas con las otras (y con el entorno celular) para burlar los mecanismos que el organismo sano ha establecido precisamente para evitar la formación de las metástasis (Isamat y cols. 1994). Por ejemplo, las células tumorales pueden desarrollar mecanismos para evitar los efectos nocivos del estrés oxidativo (Pani y cols., 2010; Fiaschi y Chiarugi, 2012). Todas estas moléculas y las interacciones celulares con el entorno, en conjunto constituyen un microambiente tumoral específico (Bidard y cols., 2008; Alderton, 2012; Chou y cols., 2013) que junto con otra colección de factores e interacciones celulares se denominan hallmarks del cáncer y en conjunto, permiten analizar la carcinogénesis y la progresión tumoral desde un punto de vista más global (Hanahan y Weinberg, 2000; Hanahan y Weinberg, 2011).

Así, los genes que codifican ciertas proteasas y factores que influyen en la motilidad, funcionan de forma dominante y su sobreexpresión en la célula tumoral induce la capacidad metastática. Este sería el caso de la expresión de CD44, que es una molécula de adhesión y del factor de motilidad autocrino (AMF), que es liberado por muchos tipos de células tumorales (MacKay y cols., 1992). Además, existen rutas moleculares que ligan los procesos de inflamación y el desarrollo de la metástasis (Mantovani, 2009; Mantovani, 2010). Por otro lado, la regulación negativa de ciertos genes recesivos como los que codifican los antagonistas de las proteasas o de ciertas moléculas de adhesión como las E-cadherinas, aumenta la producción metastática (Birchmeier y cols., 1991).

Además de los genes relacionados directamente con la progresión de la metástasis, existen otros genes que intervienen en este proceso, a través de diversos mecanismos celulares tales como la regulación del ciclo celular. Por ejemplo, el p53 que es un gen supresor tumoral que regula negativamente la progresión tumoral a través del ciclo celular (Halaban y cols., 1998(a). También, la proteína p53 correspondiente actúa como un factor

de transcripción génico. Si se producen mutaciones en el gen p53 se inactiva el producto y no puede realizar su función de control del ciclo (Weinberg, 1991; Levine, 1993; Merino-Martín y Cordero-Campaña, 1998; Box y Terzian, 2008; Fenouille y cols., 2011).

También es interesante mencionar la familia de oncogenes “ras”, no sólo se ha relacionado con la transformación tumoral, sino también con la adquisición de un fenotipo metastático. De hecho, se conoce que el nivel de expresión de la proteína p21, producto de un gen “ras”, se correlaciona con la capacidad metastática y su transfección provoca un incremento en la producción de enzimas degradativos, de factores de motilidad así como otras alteraciones celulares relacionadas con la capacidad invasiva (Killion y Fidler, 1989; Klein y Aplin, 2009).

Además de la familia de oncogenes “ras”, merece la pena citar el oncogen BRAF que regula la actividad del NF- κ B en las células del melanoma humano (Liu y cols., 2007) e induce invasión celular en el melanoma (Arozarena y cols., 2011; Arsic y cols., 2012). En general, induce la metástasis del melanoma, así como la senescencia del melanocito y el melanoma en ratones (Dankort y cols., 2009; Dhomen y cols., 2009). Además, se ha descrito que el 70% de los melanomas se inicia por la mutación BRAF, que suele ser el primero de una serie de cambios genéticos después de la exposición excesiva al sol (Dhomen y cols., 2009). Sin embargo, también existen mutaciones no codificantes que pueden inducir el melanoma (Cossins, 2013).

Otros productos liberados por la célula tumoral que inciden en su capacidad metastática son las citocinas y la expresión de sus receptores específicos, ya que estos factores solubles pueden determinar la motilidad celular, la adhesión, el crecimiento y la proliferación (Sporn y Roberts, 1985; Nicolson, 1988; Aznavoorian y cols., 1993; Nicolson, 1993; Brooks y cols., 2010; Akst, 2012).

2. Melanoma

El melanoma es una neoplasia de naturaleza muy agresiva, y aunque en algunos casos se puede dar la regresión del tumor primario e incluso de las metástasis (Avinoach y Aflalo, 1992; Avril y cols., 1992) en general, una vez diseminado, es prácticamente incurable (Denninghoff y cols., 2006). Constituye una de las neoplasias que afectan a la piel y se integra en el grupo de los cánceres más frecuentes. Los tumores que afectan a la piel se clasifican en dos tipos: melanomas (debido a que se desarrollan a partir de los melanocitos) y los tumores que no son melanomas (cuyo origen son células de la piel que no son melanocitos); estando este segundo grupo constituido entre otros por los carcinomas espinocelular y basocelular. Dichos carcinomas son diez veces más frecuentes, sin embargo, presentan una relativa baja malignidad (Kashami-Sabet, 2008; Agarwala y cols., 2010).

La incidencia del melanoma ha aumentado considerablemente, habiéndose multiplicado el número de casos por 10 en los últimos 50 años. Además, el 81% de los casos diagnosticados se localiza en países desarrollados (AECC, 2011). Por citar un ejemplo, en Minnesota, USA en los últimos 30 años, la incidencia se ha multiplicado por 8 en mujeres jóvenes y por 4 en varones jóvenes (Reed y cols., 2012). En España, el incremento de la tasa de incidencia es del 181,3% en varones y del 205,3% en mujeres (Sáenz y cols., 2005). En Euskadi, según datos del registro del cáncer llevado a cabo en la Comunidad Autónoma del País Vasco, las tasas de incidencia aumentaron de 3,1 a 8,9 por cada 100.000 hombres y de 4,6 a 10,7 por cada 100.000 mujeres, entre los años 1986 y 2006. (Administración de la Comunidad Autónoma del País Vasco. Departamento de Sanidad y Consumo. Octubre 2010).

Los cambios de estilo de vida de la población, el incremento de la exposición al sol y la disminución de la capa de ozono, son las causas principales del incremento de la incidencia del melanoma (Manola y cols., 2000). De hecho, actualmente desde el punto de vista sanitario el melanoma constituye una de las patologías tumorales de mayor relevancia, ya que aunque su frecuencia dentro de las neoplasias cutáneas no es alta (entre el 1,5-7%) representa el 65% de las muertes por cáncer de piel, lo que indica su alto potencial de agresividad (Álvarez-Mon y cols., 1997; Zaballos-Diego y cols., 2001; Álvarez-Mon y cols., 2005; American Cancer Society, 2007).

El melanoma es un trastorno maligno que se produce por transformación tumoral de los melanocitos de la piel. Los melanocitos son células de origen neuroectodérmico,

derivadas de la cresta neural, que constituyen un componente menor de la población celular de la epidermis normal. Principalmente se encuentran localizados cerca de la base de la epidermis, siendo la tasa de queratinocitos a melanocitos de 35/1. Morfológicamente los melanocitos son células polidendríticas o bipolares que normalmente se replican muy poco, su principal característica es la capacidad de sintetizar melanina, un pigmento natural compuesto por polifenoles, a partir de un enzima fundamental: la tirosinasa, a través de una cascada de reacciones químicas (Lozano y Solano, 1989; Kondo y Hearing, 2011).

Como consecuencia de la biosíntesis de melanina se producen unos acúmulos del pigmento con estructura definida llamados melanosomas. Estos melanosomas según van madurando, migran por las dendritas del melanocito de forma que estas prolongaciones celulares se encuentran cargadas de gránulos de melanina. Las dendritas sirven para la distribución de la melanina por toda la capa epidérmica, ya que forman una red tridimensional proyectándose sobre los queratinocitos que mediante fagocitosis, ingieren los melanosomas y los transportan en su migración hacia las capas superficiales de la epidermis (Lozano y Solano, 1989; Hill, 1992; Gillbro y Olsson, 2011). El factor de transcripción asociado a la microftalmia (MITF) es el principal regulador del desarrollo del melanocito, de su función y supervivencia (Cheli y cols., 2011; Cheli y cols., 2012), mediante la modulación de varios genes implicados en la diferenciación y progresión del ciclo celular (Carreira y cols., 2005; Levy y cols., 2006; Fenouille y cols., 2011).

Aunque la etiología del melanoma no se conoce con exactitud, parece que existe una relación entre su aparición y la exposición de la piel a la radiación solar, especialmente a los rayos ultravioleta (UV) (Bennett, 2008; Bennett, 2008(a)). Esta relación parece estar basada en la interacción entre la radiación solar y el aparato biosintético de la melanina. Aunque se acepta que la melanina representa una protección adaptativa contra los efectos nocivos (mutagénicos) de los rayos UV, existe la evidencia de que el mismo sistema protector puede resultar mutagénico en determinadas circunstancias, por ejemplo, si la dosis de radiación es muy alta o continuada. En estas circunstancias, se acumulan las sustancias nocivas (radicales libres de oxígeno) que se generan en la síntesis del pigmento (Hill, 1992). Por otra parte, recientemente, se han aislado poblaciones de células madre de melanoma (Zabierowski y Herlyn, 2008) y además, células que inducen la diferenciación e inician el melanoma humano (Schatton y cols., 2008; Blanpain, 2013).

Los avances en biología molecular han permitido conocer cuáles son los genes relacionados con la pigmentación y su implicación en la susceptibilidad al melanoma (Fernández y cols., 2009). Para ello, se han desarrollado consorcios internacionales para la

secuenciación del genoma del melanoma. Fruto de estos trabajos, se han identificado mutaciones frecuentes asociadas al melanoma (Berger y cols., 2012; Hodis y cols., 2012).

En cuanto al desarrollo de esta enfermedad, una de las características fundamentales de esta patología tumoral es su localización superficial, este hecho junto con la presencia del pigmento melánico, permiten observar y estudiar directamente la progresión tumoral del melanoma. Ambas características han permitido definir con bastante precisión una serie de etapas fundamentales que tienen lugar en el desarrollo del melanoma humano (Clark y cols., 1984), que constituyen la base del diagnóstico objetivo del estadio del tumor y el pronóstico de riesgo. En cada nueva etapa de la evolución del melanoma, las células tumorales van adquiriendo progresivamente nuevas características, que conducen a una mayor malignidad.

A lo largo de la evolución del melanoma se distinguen varias etapas definidas en base a estas características y criterios morfológicos: Etapa I) lesión tumoral benigna o proliferación de melanocitos, denominada nevus común; Etapa II) lesión con anomalías estructurales y anatómicas o nevus displásico; Etapa III) crecimiento radial de la lesión; Etapa IV) crecimiento vertical de la lesión, con células capaces de metastatizar; y Etapa V) melanoma diseminado (Clark y cols., 1984).

A los niveles de invasión de Clark, se añadió luego el grosor tumoral de Breslow. Posteriormente, se ha propuesto una nueva clasificación denominada TNM, que aglutina la medida del diámetro del tumor y la presencia de ulceración (T), el número de nódulos de metástasis (N) y los niveles séricos de lactato deshidrogenasa (LDH) y la localización de los focos metastáticos (M) (Balch y cols., 2000). La combinación de las diferentes categorías TNM da lugar al sistema de estadiaje AJCC 2009, donde la incorporación de datos de mapeo linfático con la biopsia del ganglio centinela y la enfermedad micrometastática permiten categorizar a los pacientes en estadios tanto clínicos como patológicos (Balch y cols., 2009).

Desde el punto de vista terapéutico, los tratamientos habituales contra el cáncer no son efectivos para combatir el melanoma, debido a que es resistente a la quimioterapia y a la radioterapia (Jansen y cols., 1998). Por tanto, el tratamiento actual consiste en la extirpación quirúrgica de la lesión (como medida preventiva) así como, la vigilancia mediante revisiones ya que en las etapas avanzadas, el melanoma se considera una enfermedad sin tratamiento y prácticamente incurable. En las últimas décadas, se ha intentado introducir una nueva estrategia que se denomina la Bioterapia del cáncer. Basada en el uso de sustancias de origen biológico, que por ejemplo, estimulan o apoyan

la respuesta inmune del organismo frente al cáncer y por eso se denominan agentes inmunomoduladores (Jasmin, 1987).

Los primeros resultados obtenidos en dichos ensayos clínicos fueron poco alentadores (Rosenberg, 1990; Fridman, 1992). Sin embargo, se ha retomado con fuerza la inmunoterapia del cáncer fruto del desarrollo de nuevas estrategias combinando el uso de agentes inmunomoduladores con los mecanismos de inmunosupresión y la manipulación genética de las células aprovechando el desarrollo de la biotecnología. (Dougan y Dranoff, 2009; Jinushi y Tahara, 2009; Lesterhuis y cols., 2011; Finn y cols., 2012; Page y cols., 2014).

3. Citocinas

Existen productos de naturaleza polipeptídica de carácter soluble que actúan fundamentalmente a nivel local y que desarrollan un papel determinante como moléculas reguladoras de las propiedades biológicas de las células. Estas moléculas son conocidas como citocinas.

Las citocinas son pequeñas proteínas no estructurales que originariamente fueron denominadas linfocinas, monocinas o interleucinas para indicar su origen celular y son descritas como factores que están esencialmente relacionados con el sistema inmune. Posteriormente, se ha demostrado su participación en todos los procesos biológicos relacionados con el crecimiento, proliferación y diferenciación celular, lo que ha conducido a una redefinición más amplia y a veces muy poco precisa del concepto de citocina (Dinarello, 2000).

El significado del término "citocina" propuesto por Cohen en 1977, ha ido cambiando según se han ido conociendo y determinando con mayor precisión la naturaleza, función, producción y mecanismo de acción de los distintos factores que, cada vez en mayor número, constituyen el conjunto de las citocinas.

En el año 1989, Balkwill y Burke proponen la siguiente definición: "citocina es un término para nombrar un grupo de reguladores celulares proteínicos que se producen en una amplia variedad de células en el cuerpo, juegan un papel importante en muchas respuestas fisiológicas, están involucradas en la patofisiología de un serie de enfermedades y tienen potencial terapéutico".

Estos autores describen para este grupo heterogéneo de proteínas, una serie de características comunes: Las citocinas son proteínas glicosiladas de bajo peso molecular (generalmente menor de 80 kDa), que una vez sintetizadas son secretadas al medio extracelular y están involucradas en los procesos de inmunidad e inflamación, regulando la amplitud y duración de la respuesta. Se producen de forma transitoria y local, actuando de forma paracrina o autocrina. Actúan a concentraciones de picogramos, por lo que son extremadamente potentes e interaccionan con receptores de la superficie celular con alta afinidad, siendo cada receptor específico para cada citocina. La unión de la citocina con su receptor promueve un cambio en el patrón de la síntesis de RNA y de la síntesis de proteínas celulares, lo que desemboca en un comportamiento celular distinto. Además, cada citocina tiene múltiples acciones reguladoras que se superponen o se solapan. La

respuesta de una célula a una citocina depende de la concentración de dicho factor, del tipo celular, y de la interacción con otros reguladores a los que la célula está expuesta. Por último, las citocinas interactúan en una red extremadamente compleja. Una o varias citocinas inducen a otra u otras, también pueden modular la expresión de receptores de citocinas (el propio receptor o el correspondiente a otra citocina) así como interactuar de forma sinérgica, aditiva o antagónica sobre la misma célula.

Las citocinas constituyen un conjunto heterogéneo de factores que incluye diversas familias de factores, uno de ellos son las interleucinas (IL). Dicha denominación engloba en la actualidad un grupo de más de una treintena de miembros, que se caracterizan por ser producidas por células del sistema inmune, mediar una función importante en la respuesta inmune y tener más de una función. Sin embargo, la actividad biológica de las ILs no se restringe en absoluto al sistema inmune y muchas de ellas, presentan múltiples actividades que afectan a diversos procesos fisiológicos. Algunas de estas actividades se están empezando a comprender, como es su participación en el desarrollo embrionario.

Otro grupo de citocinas han mantenido una terminología propia, con objeto de ser diferenciadas por la actividad que desempeñan y fueron descritas. Aun así, todas ellas guardan una relación muy estrecha con el sistema inmune. Entre ellas se encuentran los interferones (IFN- α , IFN- β , IFN- γ), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α o caquetina) y el TNF- β o linfotoxina.

También pertenecen al grupo de las citocinas los factores solubles reguladores de la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Las moléculas que influyen en el proceso de hemopoyesis clásicamente se han denominado "factores estimuladores de colonias" (CSF) por su capacidad de estimular la formación de colonias, cuando células madre (stem cells) o células multipotentes del sistema hematopoyético se cultivan en un medio semisólido.

Además, se incluyen dentro de las citocinas el grupo de los "factores quimiotácticos" que están implicados en los procesos de motilidad celular no dirigidos o quimiocinesis y en los movimientos dirigidos o quimiotaxis.

Por último, se incluye dentro de las citocinas el grupo de los "factores de crecimiento" que están involucrados en la regulación del ciclo celular y por tanto, de la proliferación celular. La actividad de los factores de crecimiento se ha relacionado fundamentalmente con el mantenimiento de los tejidos del cuerpo, sobre todo en aquellos sometidos a mayor desgaste y que necesitan una renovación para mantener la homeostasis.

Como son entre otros: la epidermis, el intestino y el tejido hematopoyético, además de la participación en los procesos de cicatrización. Algunos autores, incluyen en el grupo de factores de crecimiento, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Este factor, es en realidad una familia de varios productos, con un amplio espectro y con actividad inhibidora sobre varios procesos celulares.

Las citocinas son pleiotrópicas en su acción y muchas citocinas tienen actividades que se solapan. Debido a esto, una misma citocina puede actuar sobre más de un tipo celular a través de sus receptores expresados en muchos tipos celulares. A su vez, una sola célula tiene receptores para múltiples citocinas y puede interactuar con varias a la vez. Una misma citocina puede actuar tanto como señal positiva o negativa, dependiendo del tipo celular o del estadio de desarrollo de la célula diana. Por el contrario, diferentes citocinas a través de diferentes receptores pueden inducir una respuesta biológica idéntica.

Actualmente, se postula que en el interior de la célula diana, las vías de transmisión de la señal no son lineales, sino que existe una compleja red con múltiples puntos de entrecruzamiento de las distintas vías de señalización de las citocinas. De hecho, un receptor de citocinas funcional está constituido al menos, por dos componentes. Uno es el lugar de unión con la citocina y el otro es el transductor de la señal al interior celular.

Los factores de crecimiento desempeñan un papel importante en la aparición de malignidad y metástasis. Los estudios llevados a cabo con células derivadas del tumor primario y células obtenidas de los focos metastásicos en cultivo "in vitro" demuestran que las células metastásicas son menos dependientes de los factores de crecimiento derivados del suero, para su proliferación y además, que liberan al medio sus propios factores solubles; lo que sugiere que los mecanismos de crecimiento autocrino pueden estar involucrados en la formación de metástasis. Además, las citocinas median en la inflamación ligada al cáncer. (Nicolson, 1993; Allavena y cols., 2011).

3.1. Interleucina 2 (IL-2)

La IL-2 se considera una señal clave en la respuesta inmune. Definida inicialmente como el factor de crecimiento para las células T y por tanto, un potente estimulador de la respuesta específica, se considera actualmente un factor esencial para la homeostasis del sistema inmune ya que, además de inducir la generación de células efectoras, genera células T reguladoras que pueden suprimir la respuesta inmune. De hecho, la IL-2 constituye un mecanismo esencial para la generación de tolerancia inmunológica por lo que el concepto que tenemos de la IL-2 ha pasado de un rol fundamentalmente inmunoestimulador a un rol inmunoregulador (Rosenberg, 1988; Smith, 1990; Minami y cols., 1993; Smith, 2001; Malek y Bayer, 2004; Fehervari y cols., 2006; Ma y cols., 2006; Waldman, 2006; Bachmann y Oxenius, 2007; Malek, 2008; Feinerman y cols., 2010; Malek y Castro, 2010; Boyman y Sprent, 2012).

La IL-2 es una glicoproteína de 153 Aa (humana) producida fundamentalmente por las células T CD4 activadas, y en menor proporción por linfocitos T citotóxicos CD8, células NK (natural killer) y células NKT (natural killer T). En ausencia de estimulación, estas células, localizadas en los órganos linfoides secundarios, liberan niveles bajos de IL-2, pero la producción se estimula marcadamente tras estimulación antigénica. En el linfocito T la producción de IL-2 está regulada indirectamente por el propio factor: la IL-2 induce la activación del factor de transcripción BLIMP1 que bloquea la expresión del gen de la IL-2. Además de células linfocitarias, células dendríticas y mastocitos pueden sintetizar niveles bajos de IL-2.

El receptor de alta afinidad de la IL-2 (RIL-2) está formado por 3 subunidades: cadena alfa (CD25 o RIL-2 α), cadena beta (CD122 o RIL-2 β), y cadena común gamma (CD132) y es el que se expresa en el linfocito T activado. Esta última, es compartida por varias citocinas (IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21) que controlan la maduración y actividad de las células linfoides (Minami y cols., 1993; Kim y cols., 2006).

En estado de reposo, las células T CD4 y CD8 no expresan la cadena alfa y sólo niveles bajos de $\beta\gamma$; pero tras contacto con el antígeno aparecen altos niveles de las tres subunidades. Además la propia IL-2 controla a nivel transcripcional la expresión de la cadena alfa del RIL-2, componente muy importante en la activación de células T ya que es responsable de la alta afinidad del RIL-2; de hecho, parece que la IL-2 se une primero a la cadena alfa, lo que produce un cambio molecular en la citocina, que seguidamente forma el complejo cuaternario con las otras dos cadenas. Sin embargo, existe también un

receptor funcional formado sólo por las subunidades $\beta\gamma$. Esta forma del RIL-2 tiene una afinidad menor por la señal por lo que se acepta que la activación del receptor requiere una concentración mayor de IL-2.

La interacción de la IL-2 con su receptor conduce a la rápida internalización del complejo que es degradado, excepto la subunidad alfa que puede ser reciclado y enviado de nuevo a la superficie celular. A pesar del papel clave de RIL-2 α , son las cadenas $\beta\gamma$ los componentes responsables de la transmisión de la señal. Se han identificado varios motivos moleculares presentes en las colas citoplasmáticas que están implicados en la transducción de la señal que ocurre por tres vías principales: la vía de las JAKs-STATs, la vía PI3K/Akt, y la vía de las MAPK quinasas.

En la vía de las JAKs-STATs se han identificado la participación específica de JAK1, que interacciona con la subunidad beta, y JAK3 que interacciona con la subunidad gamma; así mismo, la señal IL-2 induce la fosforilación de STAT5 y en menor medida, de STAT3, que regulan directamente la expresión de genes específicos. El factor de transcripción STAT5 por ejemplo, se une directamente al promotor del gen de la subunidad alfa del IL-2R. Las 3 vías de señalización parecen implicadas en la proliferación y diferenciación del linfocito T (Gaffen, 2001; Osinalde y cols., 2011). Así mismo, las 3 vías en la actividad de la IL-2 como señal de supervivencia, que parece mediada esencialmente por la activación de Bcl-2. Curiosamente la activación mediante IL-2 también puede conducir a la muerte celular.

Las dianas fundamentales de la IL-2 son los linfocitos T. En células CD4 activadas induce la proliferación y diferenciación de varias subpoblaciones. Así, participa en la generación de células Th1 y Th2. La polarización de células T en estas dos subpoblaciones depende del tipo de antígeno y de las señales presentes. Th1 requiere la señal de IL-12 y de interferon- γ (IFN- γ) y parece ser que la IL-2 contribuye a la producción de estos factores o sus receptores. La generación de Th2 está asociada a la señal de IL-4, IL-5 e IL-13, vías que también pueden ser inducidas por IL-2.

Además de la polarización Th1/Th2, la generación de Th17 también está modulada por IL-2, regulando negativamente la vía que conduce a la diferenciación de Th17 proceso en el que participa otra interleucina, la IL-6. La presencia de IL-2 a alta concentración conduce a una menor proporción de Th17 precisamente porque la IL-2 está induciendo la proliferación de células Treg. Estas células, que tienen actividad supresora expresan altos niveles de RIL-2 α en superficie y pueden ser un mecanismo para eliminar IL-2 del microambiente. En estado de reposo Treg también expresa RIL-2 α y así pueden utilizar

los bajos niveles de IL-2 presentes en el medio como señal de supervivencia; sin embargo no producen IL-2. Se cree que las células Treg son fundamentales para generar tolerancia y así evitar la respuesta a autoantígenos por lo que fallos en su actividad pueden conducir a autoinmunidad. La implicación de la IL2 en este fenómeno se pone de manifiesto en ratones knock-out para IL-2, CD25 o CD122: los ratones desarrollan autoinmunidad sistémica.

La IL-2 controla también la actividad de los linfocitos CD8: ratones *cd25^{-/-}* o *IL-2^{-/-}* tienen una respuesta muy disminuida frente a virus o células tumorales. Por efecto de IL-2 poblaciones de CD8 con alta expresión de RIL-2 α proliferan y dan lugar a células efectoras de vida corta que acaban muriendo por apoptosis. La vía de señalización parece ser fundamentalmente autocrina. Al mismo tiempo, surgen otras poblaciones de CD8 con baja expresión de RIL-2 α que se convierten en células de memoria. De hecho la generación de poblaciones T de memoria es una función importante de la IL-2, no sólo de CD8, sino también de linfocitos CD4. De forma general se acepta que a lo largo de la respuesta inmune, una concentración alta de IL-2 genera células efectoras mientras que una señal débil genera células de memoria.

Además de los efectos descritos sobre células T, la IL-2 coestimula junto con otras señales células B que residen en los centros germinales induciendo síntesis de anticuerpos e incrementa la actividad citotóxica de células NK y NKT.

Aunque el sistema IL-2/IL-2R mayoritariamente es propio de células linfoides, se ha descrito también en células dendríticas. Estas células, tras estimulación, producen bajos niveles de IL-2 y expresan el RIL-2 α , aunque el significado biológico de la presencia del receptor no está claro. Se ha propuesto que podría ser un mecanismo para facilitar la utilización de la IL-2 por las células T al inicio de la respuesta inmune, cuando todavía los niveles de RIL-2 α son muy bajos: es un mecanismo de trans-activación en el que las células dendríticas colaboran con su RIL-2 α de superficie a la formación del complejo tetramérico. De hecho, algo similar ocurre con la IL-15, una citocina que comparte dos subunidades del receptor ($\beta\gamma$) con la IL-2. La subunidad alfa que es específica (IL-15R α) se expresa en la célula productora de IL-15 y se presenta como un complejo dimérico a la célula receptora.

Componentes del IL-2R o el propio factor se han descrito también en células no-inmunes como fibroblastos o células endoteliales. Su expresión en este caso podría ser un mecanismo de control de la homeostasis de IL-2, o alternativamente, y sobre todo, en el

caso de las células endoteliales, podría ser una forma de aportar la señal de supervivencia mediada por IL-2 a los linfocitos T en tránsito.

El rol central de la IL-2 en el sistema inmune es lo que llevó desde hace más de dos décadas a desarrollar tratamientos de inmunoterapia antitumoral basados en IL-2 (Coventry y Ashdown, 2012). Precisamente muchos de estos tratamientos se han llevado a cabo en la inmunoterapia del melanoma (Rosenberg y cols., 1988; Rosenberg y cols., 1998; Atkins y cols., 2006; Smith y cols., 2008; Schwartzentruher y cols., 2011; Finn y cols., 2012).

Los primeros tratamientos con IL-2 en pacientes con melanoma metastático se llevaron a cabo por el grupo de Rosenberg, que, administraron IL-2 sola o en combinación con células linfoides activadas (células LAK, células TIL) generadas in vitro tras incubación con IL-2 y capaces de lisar a células tumorales, pero no a células normales. Los resultados en la clínica, aunque no muy consistentes, demostraron remisiones completas en melanoma metastático y condujeron en 1998 a la aprobación por la FDA (Food and Drug Administration) del tratamiento con altas dosis de IL-2.

Durante más de una década se ha venido utilizando la IL-2 en el tratamiento del melanoma pero a pesar de los intentos de optimizar el tratamiento la tasa de respuesta se sitúa en torno al 6-10% y una proporción aún más baja de pacientes consiguen una remisión completa. Además la elevada toxicidad de las altas dosis de IL-2 empleadas constituye uno de los principales problemas asociados a esta terapia. Una de las estrategias más eficaces consiste en la inoculación de IL-2 junto con la vacuna contra el péptido gp100, uno de los marcadores del melanoma, con la que se ha llegado a obtener un 16% de tasas de respuesta.

Los escasos resultados en clínica de la IL-2, sus efectos colaterales adversos, junto con el cambio en la visión de la IL-2, que puede tener en determinados contextos un efecto inmunosupresor, han llevado a cuestionar la utilidad de este tratamiento. Además, recientemente, han aparecido nuevas estrategias en inmunoterapia las basadas en el bloqueo de marcadores supresores (CTLA4 o PD-1) que parecen ser más eficaces. No obstante actualmente todavía se considera que hay base suficiente que justifique el tratamiento basado en la IL-2 en la terapia del melanoma metastático y se siguen investigando posibles mejoras como la identificación de biomarcadores que permitan predecir en qué pacientes puede ser beneficiosa la terapia con IL-2. Así parece ser la probabilidad de responder al tratamiento aumenta en pacientes con melanoma que

presentan mutaciones NRAS, mientras que ocurre lo contrario los niveles séricos de VEGF o fibronectina previos al tratamiento son altos.

Por otra parte, basándose en el conocimiento del funcionamiento del sistema IL-2/IL-2R se han diseñado alternativas moleculares como complejos IL-2/anticuerpo anti-IL-2, o IL-2 mutada (IL-2 superkine) que se han testado en ratones obteniendo una mayor respuesta antitumoral in vivo junto con una menor inducción de células Treg y menos efectos secundarios. Estos estudios han puesto en evidencia la importancia en la homeostasis del sistema del IL-2R α pero no sólo del expresado en células linfoides, sino también en células no linfoides como las células endoteliales y han demostrado que su papel determinante en la inducción de efectos secundarios como edema pulmonar (Letourneau y cols., 2010; Krieg y cols., 2010; Levin y cols., 2012). Precisamente, en algunos de estos estudios se ha utilizado el melanoma B16 como modelo tumoral con el objetivo de explorar nuevas vías, lo que confirma la vigencia de este modelo en el estudio del melanoma.

3.2. Interleucina 6 (IL-6)

La IL-6 es una citocina proinflamatoria que constituye un elemento estratégico que conecta el sistema inmune innato con el sistema inmune adaptativo: se considera una citocina de la respuesta inmune innata ya que es producida abundantemente por las células de este sistema, pero tiene un papel clave en la diferenciación de células T y B y por tanto, en la generación de la respuesta inmune adaptativa. Es una glicoproteína de bajo peso molecular (21kDa) que se identificó inicialmente como moduladora de la actividad de linfocitos B. Actualmente, por el tipo de receptor que utiliza se enmarca en la superfamilia de citocinas tipo I, al igual que la IL-2 y algunas de las interleucinas más conocidas (Hirano, 1998; Kishimoto, 2005, Kishimoto, 2010; Rincon, 2012).

Las principales células productoras son los macrófagos, células dendríticas y mastocitos, y también puede ser liberada por células B y algunas células Th, aunque en menor proporción. Así mismo, ciertas células no-leucocitarias son capaces de producir IL-6, entre otras, células endoteliales o fibroblastos. La expresión de IL-6 en los distintos tipos celulares suele ser inducida por algún tipo de daño o estrés celular, por ejemplo, por radiación UV, aumento de ROS o por otras citocinas proinflamatorias. Además, la inducción suele ser regulada a nivel transcripcional fundamentalmente por la actividad de los factores de transcripción NF- κ B y NF-IL-6 (también denominado C/EBP α).

El receptor de la IL-6 funcional está formado por dos subunidades: la subunidad IL-6R α (80 kDa) y la subunidad gp130. La subunidad IL-6R α o IL-6R se expresa en leucocitos pero también en hepatocitos, mientras que la subunidad gp130 es ubicua y se puede encontrar en distintos tipos celulares; además, gp130 es un componente compartido con otros receptores de citocinas como LIF (leukemia inhibitory factor), oncostatina o la IL-11.

Cuando la IL-6 soluble se une al receptor se producen una serie de cambios en el dominio citoplasmático de gp130 que además, se dimeriza y recluta a proteínas de la familia de quinasas JANUS (JAKs); de forma específica son reclutadas y activadas las proteínas quinasas JAK1, JAK2 y Tyk2. Como consecuencia se produce la fosforilación de STAT3, que es un elemento fundamental en la transducción de la señal de la IL-6 y que, una vez translocado al núcleo, puede inducir genes implicados en la supervivencia. Otras dos vías de señalización intracelulares son también activadas por la IL-6: la vía RAS-RAF-MAPs quinasas y la vía PI3K/Akt y que llevan a la activación de factores de transcripción como NF- κ B.

Hay que decir que la activación del IL-6R puede ocurrir aunque la célula exprese sólo la subunidad gp130, en este caso la IL-6 se presenta asociada a IL-6R α soluble (sIL-6R). El complejo previamente formado se une a gp130 en la célula diana. Mediante este mecanismo de activación o trans-activación pueden responder a IL-6 células que no expresan el RIL-6 específica, es decir, que el espectro de dianas de IL-6 puede ser bastante más amplio. El sIL-6R se genera sobre todo por macrófagos, neutrófilos y también por células T CD4, por maduración alternativa del mRNA de IL-6R.

La IL-6 se caracteriza por su amplio rango de actividad. Una de sus dianas principales es el linfocito T CD4. De hecho actualmente se admite que IL-6 es un factor clave en la modulación fina de este tipo celular.

Por un lado, IL-6 es una señal de supervivencia para células CD4 ya que por vía STAT3, es capaz de activar proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 o alternativamente, suprimir la expresión del ligando Fas y así inducir resistencia frente a Fas, señal inductora de muerte celular. Además, IL-6 participa en la diferenciación de células T CD4 en distintas subpoblaciones. Así, promueve la proliferación y diferenciación de Th2 ya que induce la expresión de IL-4 y de IL-13, citocinas que favorecen la población Th2; al mismo tiempo inhibe la diferenciación de Th1 mediante la regulación negativa de la producción de IFN- γ . En resumen, afecta al balance Th1/Th2 favoreciendo la línea Th2. Afecta también al equilibrio entre las poblaciones Th17 y Treg, favoreciendo en este caso la generación de Th17, lo que subyace a la naturaleza proinflamatoria de esta citocina. Precisamente por su efecto sobre Th17 se ha implicado a IL-6 en procesos patológicos autoinmunes como la artritis reumatoide.

Otra función importante de la IL-6 es la diferenciación células B: induce la generación de células productoras de anticuerpos a partir de células precursoras. Sin embargo, los últimos datos parecen confirmar que no lo hace de forma directa sino a través de la producción de IL-21. Según este modelo IL-6 activa a células T CD4 que liberan IL-21 que se une a su receptor específico RIL-21 expresado en células B.

Aunque el rol de IL-6 sobre células T y B responsables de la respuesta inmune específica es muy importante, estudios recientes apuntan a que también ejerce su actividad sobre las células del sistema inmune innato. De acuerdo con esto se ha visto que IL-6 contribuye a la diferenciación de monocitos en macrófagos y a la supervivencia de neutrófilos. Además, modula la expresión de receptores de quimiocinas específicos que reclutan a células específicas del sistema innato. Sin embargo, muestra poco efecto sobre otras células de la primera línea de defensa como células NK, NKT o sobre mastocitos.

Fuera del sistema inmune la IL-6 ejerce un efecto claro sobre los hepatocitos, que como ya se ha mencionado, expresan el RIL-6. La señal de la IL-6 induce en estas células la producción de proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva o la proteína suero amiloide A, es decir, que colabora directamente en la generación de la reacción de fase aguda que se produce en el hígado.

El rol de IL-6 sobre los hepatocitos es uno de los mecanismos que subyacen a procesos patológicos de naturaleza inflamatoria, pero no el único. Se ha propuesto que IL-6 probablemente, mediante un mecanismo de trans-activación puede activar osteoclastos encargados de degradar matriz ósea, o inducir a fibroblastos a secretar colágeno o a liberar VEGF (vascular endotelial growth factor) que aumenta la permeabilidad vascular. Mediante estos mecanismos la IL-6 puede contribuir a la pérdida de hueso, la fibrosis del tejido o la inflamación crónica que se producen en situaciones patológicas como la artritis reumatoide.

El papel de la IL-6 en el desarrollo tumoral cada vez está más establecido en ciertos tipos tumorales. Su efecto se debe en gran medida a que, por su carácter proinflamatorio, contribuye a crear un microambiente favorable tanto en las etapas iniciales del desarrollo tumoral como en la progresión y metástasis (Hodge y cols., 2005; Ancrile y cols., 2007; Drost y Agami, 2009; Bromberg y Wang, 2009; Iliopoulos y cols., 2009; Ara y De Clerck, 2010; Rattigan y cols., 2010).

Así mismo, la presencia de altos niveles de IL-6 o su receptor soluble en pacientes con procesos tumorales se ha asociado con progresión tumoral y con un mal pronóstico (Dosquet y cols., 1994; Duffy y cols., 2008; Lo y cols., 2011; Heikkila y cols., 2008). Por todo ello, y desde hace ya unos años, se ha propuesto la neutralización del sistema IL-6/sIL-6R como estrategia terapéutica antitumoral (Tripathi y cols., 2003; Rose-John y cols., 2006; Rose-John y cols., 2007; Dorff y cols., 2010; Weidle y cols., 2010; Culig y cols., 2012; Guo y cols., 2012; Ataie-Kachoei y cols., 2013).

Según el tipo tumoral la IL-6 puede actuar como factor de crecimiento o también ejercer un efecto antiapoptótico, angiogénico, o inmunosupresor. Su participación es especialmente relevante en mieloma (Bataille y cols., 1989; Lokhorst y cols., 1994; Gaillard y cols., 1997; Hallek y cols., 1998; French y cols., 2002; Kuehl y cols., 2012); lo que es lógico, ya que la IL-6 estimula proliferación de linfocitos B. Así mismo, es un factor clave para el cáncer de próstata (Smith y cols., 2001; Santer y cols., 2010; Culig y cols., 2012; Qu y cols., 2013), el cáncer de mama (Korkaya y cols., 2012; Chang y cols., 2013), el cáncer de ovario (Nilsson y cols., 2005; Lo y cols., 2011; Wang y cols., 2012),

de cabeza y cuello (Duffy y cols., 2008; Lederle y cols., 2011; Yadav y cols., 2011) o para el cáncer de colon (Bollrath y cols., 2009; Grivennikov y cols., 2009).

En melanoma sin embargo, aunque varios estudios apuntan a un efecto protumoral (Hoejberg y cols., 2012) no está tan claro el rol de esta citocina. Así, los primeros estudios sobre la IL-6 y el melanoma enfocaban el rol de IL-6 como un factor producido por las células del sistema inmune con actividad antitumoral. Estos trabajos describían la existencia de células de melanoma susceptibles y resistentes a la acción inhibidora de la IL-6. La adquisición de resistencia se asociaba a progresión tumoral e incluso se proponía que en este proceso la IL-6 se podría convertir en un factor de crecimiento que podrían utilizar de forma autocrina las células de estadios avanzados de melanoma (Florenes y cols., 1999; Lu y Kerbel, 1993; Silvani y cols., 1995; Bohm y cols., 2001).

Estudios posteriores han confirmado que las células de melanoma, sobre todo de mayor malignidad son resistentes a un efecto inhibidor de la IL-6 y el efecto protumoral de esta citocina se ha comprobado en modelos de ratón deficientes en IL-6: los ratones IL-6^{-/-} eran más resistentes al desarrollo de melanomas inducidos (von Felbert y cols., 2005). La IL-6 favorece las vías de supervivencia, pero, más recientemente se ha descrito que la IL-6 también promueve angiogénesis en melanoma (Karst y cols., 2009), o que favorece la evasión de la actividad del sistema inmune al inducir la liberación de otra citocina, la IL-10, un potente factor inmunosupresor (Terai y cols., 2012). Por otra parte, varios estudios clínicos sugieren que la concentración sérica de IL-6 puede ser utilizada como marcador pronóstico en melanoma. En el caso de melanoma metastático (estadio IV), los pacientes con concentraciones de suero elevadas tuvieron una esperanza de vida más corta que pacientes con niveles más bajos de IL-6, si bien no se puede discriminar si la alta concentración de IL-6 es consecuencia tratamiento (Hoejberg y cols., 2012).

En resumen, la IL-6 es un factor que parece claramente implicada en la biología del melanoma aunque el significado exacto de su función necesita todavía ser clarificado.

3.3. El Factor de Necrosis Tumoral-alpha (TNF- α)

La historia del descubrimiento del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) comienza a finales del siglo XIX. Aunque se describió por su actividad antitumoral, su función primordial sería la capacidad del TNF de iniciar (junto con la IL-1) la cascada de citocinas y otros factores asociados con las respuestas inflamatorias e inmunes. Se le considera miembro de una familia de proteínas que orquestan la respuesta del organismo a las lesiones y a las infecciones (Old, 1985; Argilés y López-Soriano, 1997; Eigler y cols., 1997). El TNF es una potente citocina proinflamatoria, que juega un papel importante en el control de la apoptosis, diferenciación y proliferación celular. Además, interviene en la comunicación intercelular activando genes y vías de transducción (Baud y Karin, 2001).

El TNF es una citocina con una gran pleiotropía debido a la ubicuidad de sus receptores y a que es capaz de activar múltiples vías de transducción de la señal e inducir o suprimir la expresión de un vasto número de genes (factores de crecimiento, citocinas, factores de transcripción, receptores, mediadores inflamatorios y proteínas de fase aguda). Es producido fundamentalmente por el macrófago activado y tiene múltiples células diana (células endoteliales) en las que ejerce actividades muy diversas, asociadas con las respuestas inflamatorias y la resistencia normal del huésped a las infecciones y al crecimiento de tumores malignos, sirviendo como inmunoestimulador (Old, 1988; Fiers, 1991; Beutler 1995; Aggarwal y cols., 2001; Mocellin y Nitti, 2008; Bertazza y Mocellin, 2010).

Inicialmente se describieron el TNF- α y el TNF- β , pero con el tiempo han ido emergiendo nuevos miembros que constituyen la familia o el sistema del TNF. Estos factores se agrupan por compartir una característica molecular común a todos ellos, no por su actividad. Tienen una región homóloga de 150 Aa en el dominio extracelular de sus receptores. Hasta la fecha, se han descrito 22 miembros de la familia del TNF y 30 miembros de la superfamilia de los receptores de TNF/NGF (Factor de Necrosis Tumoral/Factor de Crecimiento Nervioso), Tabla 1 (Smith y cols., 1994; Baker y Premkumar-Reddy, 1996; Inoue y cols., 2000; Gross y cols., 2000; Idriss y Naismith, 2000; Locksley y cols., 2001; Wallach y Kovalenko, 2009).

Tabla 1. Miembros de la familia o sistema del TNF.

SUPERFAMILIA DE RECEPTORES DEL TNF/NGF	LIGANDOS DE LA FAMILIA DEL TNF
TNF-RI	TNF- α , TNF- β
TNF-II	TNF- α , TNF- β
Fas	FasL
LT β -R	LT- α 1 β 2, HVEM
NGF-R	NGF
OPG	RANKL, TRAIL
RANK	RANKL
TRAIL-1R	TRAIL-1
TRAIL-2R	TRAIL-2
TRAIL-3R	TRAIL-3
TRAIL-4R	TRAIL-4
HVEM	TNF- β
OX40	OX40L
CD27	CD27L
CD30	CD30L
CD40	CD40L
4-1BB	4-1BBL
PV-T2R	?
PV-A53R	?
STV-T2	?
TACI	BAFF, APRIL
BCMA	BAFF, APRIL
BAFF-R	BAFF
GITR	GITR-L
Fn14	TWEAK
EDAR	EDA-A1
XEDAR	EDA-A2
DcR3	FasL, HVEM, TL-1A
TRAMP	TL-1A
DR6	?
Troy	?
RELT	?

? : Desconocido en la actualidad.

La familia del TNF cuenta cada vez con más miembros. La actividad de algunos de ellos todavía no se conoce, pero todos sus receptores sin excepción se encuentran en los linfocitos T y B por lo que parece claro su papel fundamental en las interacciones directas entre células del sistema inmune, considerando que casi todos son glicoproteínas de membrana. Por otro lado la capacidad de inducir muerte celular a excepción de la IL-1 y el IFN- γ , parece ser casi única de esta familia de citocinas, en concreto para TNF- α , TNF- β y FasL (Wallach y cols., 1999).

En cuanto a su síntesis, el TNF- α se produce fundamentalmente por macrófagos activados y monocitos (la activación se produce por muchos agentes exógenos diferentes tales como LPS y β -glucanos, o por mediadores endógenos como la IL-1) pero también es sintetizado por: neutrófilos, linfocitos activados (células T y B), células NK, células LAK, queratinocitos, fibroblastos, astrocitos, células de Langerhans, células endoteliales, células de músculo liso y algunas células transformadas (Vandenabeele y cols., 1995). Debido a su pleiotropía exhibe una gran variedad de efectos como son: promover e inhibir el crecimiento, angiogénesis, invasión, citotoxicidad, inflamación e inmunomodulación. Por último, también toma parte en la regulación del metabolismo. El TNF- β es sintetizado sólo por el linfocito y su efecto es más restringido (modulador) (Wallach y cols., 1999).

A nivel molecular, existen dos formas activas de TNF- α . La glicoproteína de TNF- α madura, es una proteína transmembrana de tipo II que se encuentra expuesta en la superficie de la membrana celular y se sintetiza como una pro-proteína de 233 Aa con un Pm de 26 kDa. Es biológicamente activa y participa en procesos de citotoxicidad e inflamación por interacción celular. La pro-proteína es después seccionada por una metaloproteínasa (también llamada enzima convertidora del TNF- α o TACE), para dar lugar a una forma monomérica de 17 kDa que contiene 157 Aa no glicosilados, que constituyen el TNF- α soluble. En condiciones fisiológicas, el polipéptido de TNF- α soluble liberado al medio tiende a formar complejos de diferente número de unidades mediante enlaces no covalentes; aunque la forma activa es el homotrímero, que presenta forma de cono, estando el extremo del cono o pirámide dirigido hacia la superficie celular (Old, 1988; Vandenabeele y cols., 1995).

En cuanto a su localización dentro del genoma, el locus que codifica para el TNF se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 en la posición 6p21.3, dentro de la región del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase III, entre los genes HLA-B y el del factor C del Complemento. El locus para el TNF está conformado por un grupo de genes denominados Linfotoxina (LT- β) y los genes TNF. El gen TNF- α tiene un

tamaño de 3,6 Kb y está formado por cuatro exones; el primero se encarga de codificar una proteína precursora de 233 aminoácidos, mientras que los tres restantes codifican para cada uno de los monómeros que conforman la proteína activa. Además, este gen posee tres intrones cuya función es desconocida. El gen que codifica para el TNF- β está ubicado a 1,2 Kb del TNF- α ; ambos genes son regulados de forma independiente (Anaya, 2003).

El TNF- α se une a 2 receptores: uno de los receptores, TNFR tipo I con Pm 55 kDa (TNF-R55) también denominado CD120a o p55; el otro TNFR tipo II con un Pm aparente de 75 kDa (TNF-R75) también llamado CD120b o p75. Ambos son glicoproteínas de membrana con dominios extracelular, intracelular y transmembrana. Todos los tipos celulares estudiados muestran la presencia de uno o de ambos receptores. Sin embargo hay ligeras diferencias el TNF-R55, es expresado ubicuamente y el TNF-R75, se expresa fundamentalmente en células del sistema inmune. Se han encontrado formas solubles de los receptores en el suero y en orina humana. Estas formas solubles son capaces de neutralizar las actividades biológicas de los TNFs y pueden servir para modular y localizar las actividades de los TNFs o puede servir como reservorio para la liberación controlada de TNFs (Smith y cols., 1994; Vandenabeele y cols., 1995; Bartholdy y cols., 1999; Wehrli y cols., 2000).

A nivel bioquímico, las características principales de los receptores del TNF son las siguientes. La molécula TNF-R75 tiene una afinidad (Kd 100 pM) y tasa de disociación ($t_{1/2}$ =10 min) más altas para el TNF- α que el TNF-R55 (Kd 500 pM, $t_{1/2}$ >3 h). Es decir, el TNF-R75 presenta una afinidad por el TNF- α 5 veces superior al TNF-R55. Por tanto, preferentemente se une al TNF a concentraciones bajas. Luego el ligando se pasa al TNF-R55 vecino (Modelo de pasar el ligando). En este proceso parece importante la tasa entre TNF-R75 y TNF-R55 (Tartaglia y Goeddel, 1992; Tartaglia y cols., 1993(a)).

Las características de los receptores determinan las funciones que ejerce cada tipo de receptor. Así, la actividad celular inducida por el TNF parece mediada fundamentalmente por TNF-R55 (papel importante en respuestas proinflamatorias y citotóxicas), y la función del TNF-R75 sería el pasar el TNF al otro receptor. Además, la forma de 75 kDa puede ser responsable de generar las señales proliferativas y reguladoras en linfocitos. Todas las actividades atribuidas a TNF-R75 pueden ser ejercidas por TNF-R55, generalmente a densidades de receptores mucho más bajas. El TNF-R75 soluble también tendría funciones de neutralización y eliminación fisiológica del TNF de la circulación (Vandenabeele y cols., 1995; Liu y cols., 1996; Leonardi y cols., 2000; Bazzoni y Regalia, 2001).

A nivel celular, el TNF- α activa sistemas señal en múltiples compartimentos subcelulares incluyendo: la membrana plasmática, mitocondria, endosomas, citosol, núcleo y aparato de Golgi. La diferente localización de las moléculas señal relacionadas con el TNF- α puede ser el mecanismo que provea de especificidad a la señal del TNF- α . Así, la mayoría de moléculas de TNF-RII se localizan en la superficie celular y algunas en vesículas recubiertas de clatrina. La mayoría de moléculas de TNF-RI se localizan en el complejo de Golgi perinuclear, en la red TRANS-Golgi, y sólo unos pocos receptores en la superficie celular. Todavía no se conoce el papel exacto a través del cual el TNF- α intracelular conduciría su señal o el mecanismo que emplea en su transporte hacia compartimentos como: endosomas, mitocondrias y otros orgánulos (Ledgerwood y cols., 1999).

La activación de los TNF-Rs se produce por oligomerización mediante el ligando trimérico. De hecho, la única función del TNF- α parece ser la asociación de los receptores y no muestra actividad tras la internalización del complejo receptor-ligando. Para la activación óptima se requiere trimerización y no es suficiente la dimerización del receptor. Anticuerpos anti-TNF pueden simular el papel del TNF- α .

En el TNF-R de 55 kDa se ha identificado un dominio (región acídica de 80 Aa) denominado "Dominio Muerte" (DD) (Tartaglia y cols., 1993). El TNF-R55 es capaz de asociarse entre sí mediante el dominio muerte de la zona intracelular, que es fundamental para la actividad citotóxica (Bianchi y Meier, 2009). El dominio muerte participa tanto en la inducción de apoptosis como en la activación génica. El TNF-R75 más abundante no se autosocia (Vandenabeele y cols., 1995).

La oligomerización es generalmente seguida de fosforilación del receptor, no es autofosforilación, sino inducida por quinasas que se consideran ligadas al receptor y se activan tras la oligomerización del receptor (Kaiser y cols., 1999). Existen dos familias de adaptadores proteicos. Los que contienen el dominio muerte, se unen al TNF-R55 y al Fas a nivel del dominio muerte de estos receptores. Y los adaptadores proteicos con motivos menos definidos, que se agrupan en la familia de las TRAF (Factores Asociados al Receptor del TNF) que se unen al TNF-R75 y al CD40. Conduciendo en ambos casos a una estimulación de múltiples vías de señalización intracelular y factores de transcripción (Baker y Premkumar-Reddy, 1996; Ledgerwood y cols., 1999; Wallach y cols., 1999; Inoue y cols., 2000; Wajant y cols., 2003; Aggarwal y cols., 2009).

Tras la unión con el TNF- α , en la mayoría de las células el complejo TNF-receptor es rápidamente internalizado por endocitosis mediante vesículas recubiertas de clatrina y luego degradado en lisosomas. El TNF-R75 carece de Aa tirosina en su dominio intracelular y carece por tanto de la secuencia señal para ser internalizada rápidamente mediante vesículas recubiertas (Vandenabeele y cols., 1995).

La unión del TNF- α a su receptor promueve la interacción de diversas proteínas que enlazan la acción del TNF- α con dos tipos de respuestas específicas, la muerte celular y la activación génica a través de múltiples rutas señal (Heller y Krönke, 1994; Hsu y cols., 1996; Grell y cols., 1999; Screaton y Xu, 2000; Baud y Karin, 2001; Bianchi y Meier, 2009) (Figura 2). Las quinasas que se unen al complejo receptor-ligando, dependiendo de la fisiología y de los estímulos y señales que recibe la célula, son las que van a determinar qué tipo de respuesta se activa (Hannun y Luberto 2000; Bertazza y Mocellin, 2008).

El TNF- α puede inducir muerte por tres procesos: necrosis, apoptosis y necroptosis (Shulga y Pastorino, 2012). A pesar del tiempo transcurrido desde su descubrimiento, aun no se ha dilucidado por completo, porque el TNF- α es citotóxico para células tumorales y no para células normales (Beyaert y Fiers, 1994). Se estudió la susceptibilidad de células de 60 tipos de cáncer al TNF- α , en un tercio produce lisis, en otro tercio inhibición del crecimiento y en el resto no da efecto. En el melanoma produce inhibición del crecimiento. Podría ser que las células más susceptibles carecieran de los mecanismos necesarios para reparar o contrarrestar el efecto de TNF- α .

La mayoría de los datos que se conocen se refieren a la inducción de apoptosis (Jiang y Porter, 1998; Jiang y cols., 1999; Ivanov y cols., 2000; Penning y cols., 2000; Adinolfi y cols., 2009; Bianchi y Meier, 2009). Las rutas de activación de caspasas son exclusivas del TNF-RI, y su efecto neto es la muerte celular por apoptosis.

Las caspasas son unas cisteínproteasas, con una secuencia muy conservada evolutivamente, que se encuentran latentes en el citoplasma como procaspasas. La unión de las procaspasas al complejo formado por el receptor y las quinasas asociadas, se denomina complejo señal de inducción de muerte. Esta unión, induce la activación de las caspasas por autocatálisis y la activación del complejo señal de inducción de muerte, que conduce a la muerte por apoptosis. Así, las caspasas 2 y 8 ligan directamente la activación del TNF-R que se produce a nivel de membrana con la maquinaria efectora de la apoptosis. Estos enzimas poseen dos motivos cerca de su extremo N-terminal que se

pueden asociar con el dominio de muerte de FADD o RAIDD que a su vez se asocia con el TNF-R (Wallach y cols., 1999; Kontermann y cols., 2008).

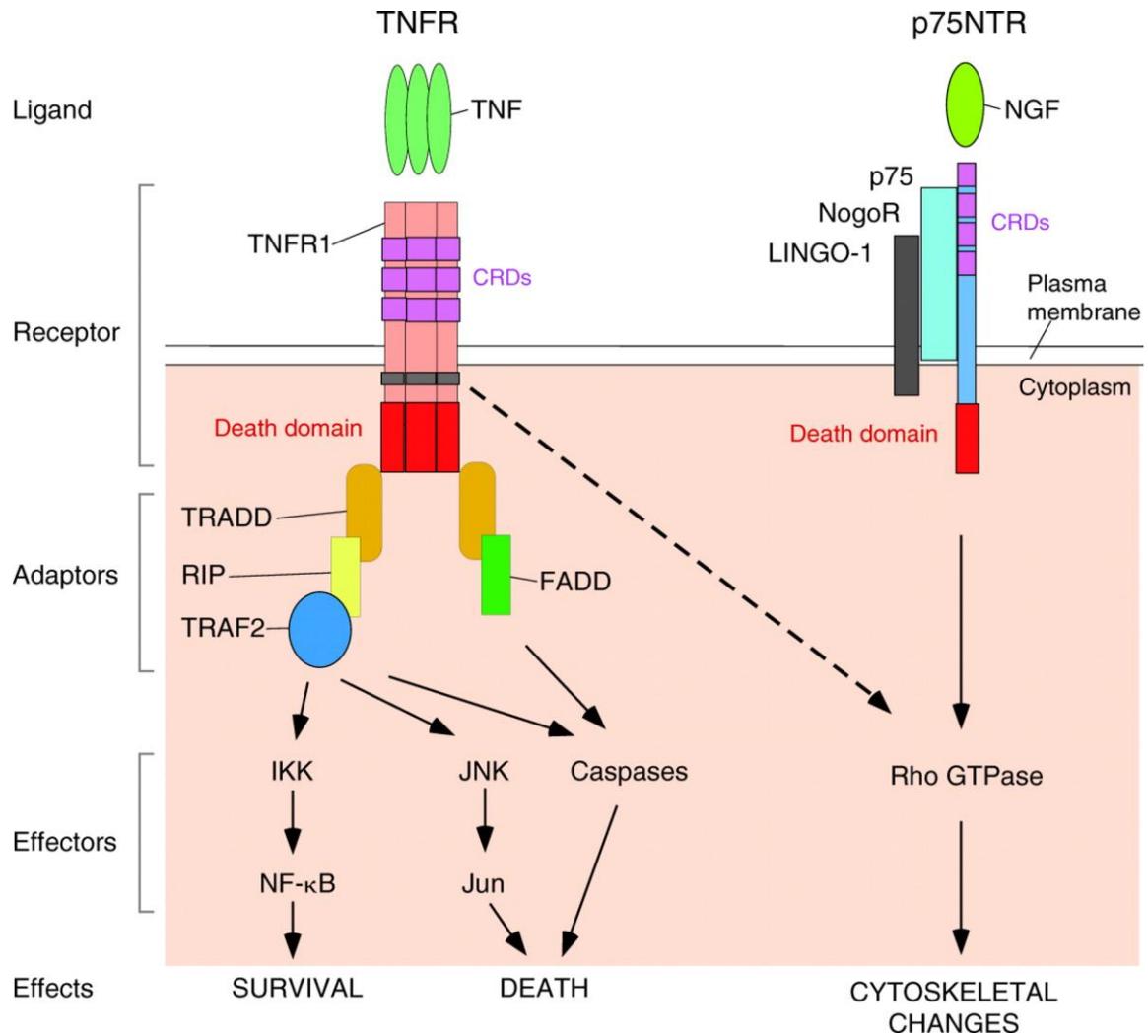


Figura 2. Vías de transducción de la señal del TNF- α . Fuente de la imagen: Mathew S.J, Haubert D, Krönke M, Leptin M. 2009. Looking beyond death: a morphogenetic role for the TNF signalling pathway. *J. Cell Sci.* 122: 1939-1946.

Por último, se activaría a nivel nuclear la expresión de genes y la maquinaria necesaria para desencadenar la apoptosis mediada por el TNF- α . En células L929 se descubrió que el sistema de transporte electrónico mitocondrial juega un papel clave en la citotoxicidad inducida por el TNF- α , presumiblemente mediante la formación de Intermediarios Reactivos del Oxígeno (ROI) (Ledgerwood y cols., 1998) que además de ser citotóxicos, actúan como señales de transducción de la expresión de genes inducidos por el TNF- α (Schulze-Osthoff y cols., 1993; Pastorino y cols., 1996; Ledgerwood y cols., 1999; Baregamian y cols., 2009).

Se ha comprobado que el TNF- α puede regular negativamente su propia capacidad de inducir apoptosis. Parece ser que la inhibición de apoptosis está mediada por el factor de transcripción NF- κ B (Factor Nuclear Kappa B) que inactivo se encuentra en el citoplasma y activo pasa al núcleo, donde estimula la expresión de genes específicos, cuyos productos inhiben la apoptosis. La activación del NF- κ B se debe fundamentalmente a la unión del TNF- α al TNF-RI, pero también puede iniciarse a través de P13-quinasa y el TNF-RII (Van Antwerp y cols., 1998; Soengas y cols., 2001). Además, el gen que codifica la quinasa de la proteína serina-treonina B-RAF (BRAF), estimula de forma constitutiva las rutas señal que inducen la proliferación y la supervivencia en las células de melanoma. La inhibición de la señal de BRAF debida al TNF- α requiere de la participación de NF- κ B y del regulador del ciclo celular p21^{Cip1}, lo que provoca la detención del ciclo celular e induce la muerte celular por apoptosis (Gray-Schopfer y cols., 2007; Abbas y Dutta, 2009; Xia y cols., 2011). Este efecto sugiere una nueva y prometedora estrategia terapéutica para el tratamiento del melanoma (Gray-Schopfer y cols., 2007(a); Bastian, 2008).

Las respuestas de activación génica debidas al TNF- α tienen como resultado neto la supervivencia celular. La transducción de la señal se lleva en este caso a través de la activación de los factores de transcripción: AP-1 (Activador Proteico-1) y en NF- κ B (Ledgerwood y cols., 1999), que se encuentran inactivos en el citoplasma y pasan al núcleo, donde activan genes y rutas señal relacionadas con la inflamación y la supervivencia celular (Schulze-Osthoff y cols., 1993; Kastenbauer y cols., 1999; Ledgerwood y cols., 1999; You y cols., 2001; Kesanakurti y cols., 2011; Kesanakurti y cols., 2012).

El TNF- α también es capaz de activar rutas de proteinquinasas (JNK o p38) que regulan la señal extracelular. En la mayoría de células el TNF- α activa el JNK; para ello la señal es transducida por TRAF2 y RIP a través de la fosforilación secuencial del módulo

de las MAP-quinasas. Estas a su vez, activarán al JNK que inducirá la apoptosis. Esta vía de transducción de la señal puede ser suprimida por el NF- κ B (Van Horsesen y cols., 2006).

Los efectos que induce el TNF- α en las células dependen del balance entre los metabolitos de los intermediarios que ha activado (Waterson y Bower, 2004; Bertazza y Mocellin, 2010). Así, en la primera ruta señal inducida por el TNF- α que se describió. La vía de la esfingomielinasa, que hidroliza el lípido esfingomielina en ceramida y fosforilcolina a través de enzimas esfingomielinasa (SMasa). Hay 2 tipos: acídica ligada al lisosoma, y neutra localizada a nivel de membrana.

La estimulación con TNF- α eleva rápidamente los niveles intracelulares de ceramida. Esta puede actuar como segundo mensajero (Wiegmann y cols., 1994; Venkataraman y Futerman, 2000) activando el factor de transcripción NF- κ B, que pasa al núcleo e induce la expresión de genes específicos, entre ellos la producción de IL-6 por L929. También puede inducirse activación de NF- κ B añadiendo ceramida exógena (Wiegmann y cols., 1994; Li y Lin, 2008; Gentle y Silke, 2011; Wajant y Scheurich, 2011).

Pero además, la ceramida es capaz de modular la actividad de ciertas enzimas, engarzando la respuesta al estrés (TNF- α , agentes quimioterapéuticos y calor) contribuye a la activación de JNK y a la inducción de muerte mediante el sistema TNF/Fas (Carpinteiro y cols., 2008; Cianchi y cols., 2010). Se ha sugerido que esta última actividad está mediada sólo mediante SMasa ácida ligada al lisosoma e implica la activación de la proteasa lisosómica catepsina D, a la cual se une la ceramida específicamente (Heinrich y cols., 1999). Por ello, se ha intentado emplear la ceramida en el tratamiento de quimioterapia de algunos tumores (Dimanche-Boitrel y cols., 2011).

El Factor de Necrosis Tumoral denominado así, debido a que inyectado en ratones causó necrosis hemorrágica de los tumores y además, "in vitro" era altamente citotóxico para las células cancerosas (Old, 1988). Debido a la pleiotropía y a la amplia distribución que presentan sus receptores, ejerce en las células endoteliales distintas actividades: Regula el crecimiento y diferenciación de muchos tipos celulares e inhibe el crecimiento de otros. Los cultivos "in vitro" de melanocitos crecen más rápido en presencia de TNF- α , ya que este factor promueve la proliferación y el crecimiento de esta línea celular. Sin embargo, las células de melanoma crecen bien sin TNF- α , pero la adición de TNF- α al cultivo da lugar a inhibición del crecimiento (Old, 1988).

Está implicado en la angiogénesis. El TNF- α lesiona los vasos sanguíneos que nutren el tumor. Ese daño reduce el flujo de sangre y oxígeno hacia las células tumorales y las mata. Sin embargo el efecto de TNF- α sobre la angiogénesis en tejidos normales es el contrario: induce la formación de vasos, induciendo el crecimiento de células endoteliales normales. Podría ser que las células tumorales o bien las propias células de defensa presentes en el foco tumoral sintetizaran un factor que indujera que los vasos se tornen susceptibles al daño inducido por el TNF- α (Van Horssen y cols., 2006).

Es citotóxico directamente o en combinación con IFN- γ en muchas líneas de células tumorales "in vitro" (Old, 1988; Himeno y cols., 1990) e induce necrosis hemorrágica de algunos tipos de tumores transplantados. Es un potente mediador endocrino y paracrino de las funciones inflamatorias e inmunes. Debido a esto, está implicado en diversos tipos de enfermedades (Eigler y cols., 1997; Bradley, 2008). De hecho, puede regular la respuesta inmune porque promueve la inducción de la producción de protimocitos, timocitos y células T. Además, activa la citotoxicidad de los macrófagos y de las células NK. Está implicado en la producción de diversas citocinas proinflamatorias (IFN- γ , IL-1, IL-6 e IL-8) y de marcadores inflamatorios (Zidi y cols., 2010). También está implicado en la adhesión de los leucocitos ya que controla la expresión de la Molécula de Adhesión Intercelular-1 (ICAM-1), la Molécula de Adhesión Celular Vascular-1 (VCAM-1) y la E-selectina.

Interviene en el movimiento de algunos tipos celulares. Está implicado en regular la quimioatracción debido a su capacidad de controlar la expresión de la Citocina Quimiotáctica del Monocito (MCP-1) y la interleucina 8 (IL-8). La presencia del TNF/LT es fundamental para el control del movimiento leucocitario, mediante la regulación de la expresión de sustancias quimioatrayentes del sistema nervioso central. Durante las inflamaciones de tipo autoinmune y el movimiento en los órganos linfoides secundarios en estado normal. El linfocito T y el macrófago sintetizan y liberan TNF- α que es la señal que llega a los astrocitos y a la microglia (tienen TNFR/LT- β R) que a su vez sintetizan y liberan al medio quimioatrayentes, que son los que inducen el movimiento del macrófago/linfocito T (Sedgwick y cols., 2000). Además, la asociación del TNF- α con la fibronectina de la matriz extracelular, promueve la señal de detención de la migración quimiotáctica de las células T (Franitza y cols., 2000).

Otra de sus múltiples actividades sería la implicación del TNF- α en la degradación tisular a través de la regulación de la expresión de las Metaloproteinasas de la Matriz (MMP-1 y MMP-3) (Gearing y cols., 1994; Hofmann y cols., 2000) y está implicado en la modulación de muchas respuestas metabólicas tanto en la actividad de estados fisiológicos

normales, como en estados patológicos (Vassalli, 1992; Newton Bishop, 1997; Walczak, 2011).

A nivel humano, el TNF- α no se detecta en el suero de las personas sanas, pero debido a su pleiotropía interviene en la modulación de múltiples patologías. Se han demostrado altas concentraciones de TNF- α en el plasma de pacientes de una gran variedad de enfermedades infecciosas e inflamatorias: síndrome séptico, meningitis bacteriana, malaria cerebral, SIDA, artritis reumatoide, osteoporosis, neuropatías inflamatorias y trastornos autoinmunes (esclerosis múltiple) y rechazo de trasplante de órganos (hígado, corazón). Pero también, ligadas a síndromes inflamatorios asociados a terapia y fracaso de órganos: síndrome de distrés respiratorio del adulto, infarto de miocardio, fallo agudo hepático, dosis de IL-2, vacuna de la fiebre amarilla y hemodialisis. Por tanto, teóricamente la supresión del TNF- α supondría un beneficio terapéutico en varias de estas enfermedades (Beutler y Cerami, 1988; Dinarello y Cannon, 1993; Eigler y cols., 1997; Tsenova y cols., 1999; Walczak, 2011).

Sin embargo, en pacientes con síndrome séptico, estudios controlados usando anticuerpos anti-TNF- α han fallado en demostrar una ventaja en la supervivencia de los pacientes. Un beneficio clínico más definitivo se ha conseguido en pacientes con enfermedades inflamatorias pero no infecciosas tales como la artritis reumatoide.

Utilizando anticuerpos monoclonales quiméricos anti-TNF- α se ha demostrado por primera vez, la eficacia del bloqueo de citocinas específico en una enfermedad humana autoinmune, la artritis reumatoide. En el suero de estos pacientes aparecen las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6, TNF- α y las antiinflamatorias TGF β e IL-10. En los pacientes, tratados con anticuerpos anti-TNF- α se disminuye la síntesis secundaria de IL-1 y otras citocinas. Además, el tratamiento con anti-TNF- α previene el desarrollo de inflamación crónica poliartrítica (Eigler y cols., 1997; Gross y cols., 2000).

Debido a que se identificó simultáneamente que el TNF- α y la caquectina, eran un único factor responsable de los síndromes de adelgazamiento que se observan en muchas enfermedades crónicas (Beutler y Cerami, 1986). Se describe el papel fundamental de este factor en diversos procesos patológicos.

La caquexia asociada al cáncer es un síndrome complejo que es responsable de casi un tercio de las muertes por cáncer, caracterizado por: pérdida de peso, anorexia, debilidad, anemia y astenia. A nivel metabólico la caquexia se asocia con la pérdida de proteína del músculo esquelético junto con una pérdida de la masa lipídica del cuerpo.

Además, hay inhibición del transporte de glucosa y de la lipogénesis “de novo” en el tejido. (Old, 1988; Beutler y Cerami, 1988; Gelin y cols., 1991; Argilés y López-Soriano, 1997).

Analizando este proceso con mayor profundidad, se ha demostrado que el TNF- α disminuye la actividad LPL (LipoProteínLipasa) y participa en la pérdida de proteína muscular asociada con las situaciones de caquexia. Podría ser que el TNF- α active las proteasas dependientes de ubiquitina, no lisosómicas, que se asocian con el recambio de la proteína muscular. Este efecto parece ser directo, no mediado por IL-1 o glucocorticoides (Argilés y López-Soriano; 1997).

El TNF- α tiene el papel de controlar la masa lipídica corporal, mediante la modulación de la liberación de energía, se bajan los niveles de grasas a expensas de promover resistencia a la insulina. Además, induce la síntesis de leptinas que en el hipotálamo influyen sobre la termogénesis, pérdida de apetito, inhiben la actividad LPL e inducen la lipólisis. Por tanto las altas concentraciones de TNF- α asociadas al SIDA, cáncer y otras enfermedades crónicas, podrían explicar el estado de hipertrigliceranemia que se da en estas patologías (Bulló-Bonet y cols., 1999).

Muy en relación con esto, los genes del TNF- α aparecen sobreexpresados en el músculo y en el tejido adiposo de personas obesas y diabéticas. En estas personas el TNFR-2 está sobreexpresado y el sTNFR-2 está elevado 6 veces respecto de los individuos control. La obesidad se explicaría debido a que la sobreexpresión de TNF- α , provoca resistencia a la insulina y al no llegar glucosa a las células estas acumulan grasas como combustible. Además, estas personas tienen cierta resistencia al efecto del TNF- α y por último, a que el control de la masa lipídica corporal depende también de otros factores (metabolismo lipídico, factores saciantes,...) (Bulló-Bonet y cols., 1999).

3.3.1. Participación del TNF- α en el desarrollo tumoral

El desarrollo y la progresión tumoral implican la expresión de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores, además de la expresión de múltiples características malignas. Las células del melanoma maligno expresan diferentes citocinas, factores de crecimiento y sus receptores en los respectivos estadios de la progresión tumoral. Los cuales mediante efectos paracrinos o autocrinos son capaces de incentivar el crecimiento y dar lugar a metástasis competentes (Nicolson, 1993; Nicolson, 1993(a); Lázár-Molnár y cols., 2000).

Los factores de crecimiento autocrinos como son, β FGF, IL-8 y a veces IL-6, PDGF e IL-10. Producidos por las células del melanoma, estimulan la proliferación de su propia síntesis. Mientras los factores de crecimiento paracrinos entre otros, EGF, TGF- β , IL-1, GM-CSF, NGF y VEGF. Modulan el microambiente para el beneficio del crecimiento y la invasión tumoral. Los efectos paracrinos incluyen: angiogénesis, formación de estroma, modulación de la respuesta inmune del huésped, activación de enzimas proteolíticas, adhesión, motilidad y formación de metástasis (Lázár-Molnár y cols., 2000).

El TNF- α como otras citocinas proinflamatorias (Dinarello, 2000) de la red de citocinas, puede dar lugar tanto a efectos protumorales (Orosz y cols., 1993; Suganuma y cols., 1999) que favorecen el avance de las metástasis. Y efectos antitumorales, que contribuirían a que las células se defiendan de las patologías tumorales. Esta dualidad de la respuesta del TNF- α al cáncer ha sido puesta de manifiesto en diversos trabajos (Belizario y Dinarello, 1991; Kuninaka y cols., 2000; Wang y cols., 2000; Mozellin y Nitti, 2008; Balkwill, 2009; Bertazza y Mozellin, 2010).

Una gran cantidad de datos tanto clínicos como epidemiológicos apoyan la hipótesis de que la inflamación crónica promueve el desarrollo de tumores además de su progresión (Aggarwal y cols., 2006; Sunday, 2008; Aggarwal y cols., 2009). El TNF- α como citocina proinflamatoria puede actuar como inductora de tumores. Estudios recientes han demostrado que el TNF- α está implicado en los siguientes aspectos de la carcinogénesis: transformación celular, supervivencia, proliferación, invasión, angiogénesis y metástasis.

En esta línea, existen trabajos que demuestran que existe una mayor expresión del TNF- α en el suero de pacientes que tienen cáncer. Además, esta concentración disminuye

en pacientes de cáncer de pulmón y próstata tratados con quimioterapia. La presencia del TNF- α en el suero puede ser un factor de riesgo para la neoplasia colorrectal, porque está asociado con varios factores de riesgo conocidos como pueden ser la edad, el tabaco y la obesidad. Estos hallazgos indican que el factor de necrosis tumoral podría estar involucrado en el desarrollo de los tumores y podría ser utilizado como indicador del riesgo de padecer cáncer y prognosis para pacientes que lo posean.

Los SNP o polimorfismos de un nucleótido en la región promotora del gen TNF- α han sido analizados por su susceptibilidad a numerosos cánceres. Algunos de estos SNP regulan la expresión de esta citocina. Así por ejemplo, el SNP que se encuentra en la posición -308 en el promotor de TNF (-308G/A) ha sido asociada con la susceptibilidad a padecer varios tipos de cáncer. Por el contrario, el alelo -238A en el promotor del TNF- α está asociado con un menor riesgo de padecer cáncer (Wang y col., 2008).

Existen datos recientes que indican que el TNF- α endógeno está implicado en la génesis de tumores e incluso en su crecimiento y metástasis. La hipótesis que postula que el TNF- α podría ser un promotor tumoral se sustenta en los experimentos realizados en varios modelos murinos por Moore y colaboradores (1999). Dichos autores mostraron que, ratones knock-out TNF- $\alpha^{-/-}$ presentaban una resistencia a la aparición de tumores de piel comparando con los ratones de fenotipo silvestres, tras haber sido sometidos a una dosis de un carcinógeno iniciador como es el DMBA y tras la repetida aplicación de un promotor tumoral como es el TPA. Aunque la participación del TNF- α resultó ser importante para la carcinogénesis “de novo”, los estados posteriores de progresión tumoral fueron similares tanto en los ratones TNF- $\alpha^{-/-}$ como en los ratones de fenotipo salvaje (Szlosarek y cols., 2006).

La producción de esta citocina a bajas dosis pero de manera crónica es una característica de algunas líneas celulares tumorales, que puede actuar mediante mecanismos diferentes para promover las neoplasias (Szlosarek y cols., 2006(a): Actuando como un factor de crecimiento en cierto tipo de tumores: en ellos incrementaría los niveles de reguladores positivos del ciclo; a su vez actuaría disminuyendo los inhibidores de ciclinas dependientes de kinasas (CDK) (reguladores negativos). También puede inducir quimioresistencia en ciertos tipos de cánceres, promoviendo entre otros, daños en el DNA o inhibir su reparación regulando las vías dependientes de NO (óxido nítrico). Además, la secreción paracrina de TNF- α por parte de macrófagos estimulados por IFN- γ incrementa la producción de óxido nítrico sintasa inducible en células epiteliales y como resultado su transformación tumoral.

Además, puede promover angiogénesis. Son varios los factores que median el efecto proangiogénico de esta citocina. Por ejemplo, el VEGF (Factor de Crecimiento Vascular Endotelial), su receptor VEGFR2, β FGF, IL-8, NO (óxido nítrico), selectina-E e ICAM-1 (Molécula de Adhesión Intercelular-1). El TNF Promueve la movilidad de las células del tumor y estimula la actividad tanto de fibroblastos como de macrófagos. Un trabajo reciente de Hangemann y colaboradores muestra que el co-cultivo de células cancerígenas de ovario y pulmón con macrófagos, incrementa la capacidad invasiva e las células malignas. A través de la activación de las vías JNK y NF- κ B dependientes del TNF- α e induce la producción de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) potenciando la capacidad invasiva del tumor y Modula la transición epitelial a mesenquimal, es decir, aumenta la capacidad invasiva de ciertos modelos de cáncer colorrectal, actuando como factor de supervivencia y crecimiento de las células malignas.

El TNF- α , en combinación con otras citocinas proinflamatorias como la IL-1 β y la IL-6, tiene un efecto paracrino directo sobre la expresión de antígenos de superficie y sobre la disminución de la tasa de proliferación de las células tumorales (Kuninaka y cols., 2000). La IL-6 contribuye al efecto antiproliferativo de la IL-1 y el TNF, inhibiendo la proliferación y la melanogénesis de melanocitos humanos y de líneas celulares tumorales (Morinaga y cols., 1989; Swope y cols., 1991).

Existen diversos trabajos que ligan la metástasis y el TNF- α mediante diversos mecanismos (Malik y cols., 1990; Orosz y cols., 1993; Mänel y cols., 1994). Las células del melanoma B16 detienen la liberación de óxido nítrico y la citotoxicidad sinusoidal hepática, como mecanismo natural de defensa contra el cáncer (Wang y cols., 2000). La IL-1, la IL-6, el TNF- α y el TGF β , incrementan la resistencia a la citotoxicidad del TNF- α mediante la detención del crecimiento en la fase G₁ del ciclo celular (Belizario y Dinarello, 1991). La sensibilidad "in vivo" del melanoma humano al TNF- α , es determinada por la producción tumoral de una nueva citocina denominada EMAP II (Wu y cols., 1999).

En el melanoma, el TNF- α exhibe un efecto antiproliferativo que comparte con la IL-1 α y el TGF- β , pero además, induce la producción de colagenasas de tipo IV. Estos resultados indican que las citocinas pleiotrópicas pueden tener efectos positivos y negativos simultáneamente en varios pasos de la progresión tumoral (Ladányi y cols., 1998).

En relación con la metástasis y el TNF- α , además del crecimiento, analizado como proliferación celular, la expresión de enzimas y moléculas de superficie, se ha estudiado las propiedades adhesivas de las células tumorales (Dejana y cols., 1988), su capacidad de

invasión (Malik y cols., 1990; Männel y cols., 1994; Yanase y cols., 1995; Okada y cols., 1999; Hofmann y cols., 2000), y la expresión de moléculas de adhesión (Higashiyama y cols., 1996; Okada y cols., 1999).

Debido a la implicación del TNF- α en el crecimiento del tumor bajo determinadas circunstancias, la terapia anti-TNF ha sido utilizada en algunos sistemas experimentales para la prevención del cáncer y su terapia. Así, el Factor de Necrosis Tumoral puede ser bloqueado por anticuerpos monoclonales anti-TNF, receptores solubles de TNF o la autovacunación con esta citocina (Wang y cols., 2008). Un ejemplo de ello lo constituye el uso de Infliximab, que no es más que un anticuerpo monoclonal que inhibe específicamente las funciones del TNF- α circulante y de membrana (Wang y cols., 2008; Zidi y cols., 2010).

El crecimiento tumoral depende entre otros procesos de la angiogénesis, la cual es promovida por los factores angiogénicos que son secretados por las células tumorales. Diversos trabajos han sugerido que el uso de agentes que sean capaces de destruir los vasos sanguíneos intratumorales puede constituir una nueva estrategia en la terapia antitumoral (Lejeune y Rüegg, 2006).

La angiogénesis o producción de nuevos vasos por parte del tumor, es esencial para que sus células obtengan a través del sistema circulatorio sanguíneo todo el oxígeno y los nutrientes necesarios para que puedan crecer y metastatizar. De hecho, un tumor que está creciendo activa los vasos que le rodean secretando factores angiogénicos. La angiogénesis tumoral se puede dividir en varios estadios (Van Horssen y cols., 2006). **Estadio 1:** Las agrupaciones de células tumorales que constituyen los nuevos focos tumorales en crecimiento, activan la capacidad angiogénica mediante la síntesis y secreción de factores pro-angiogénicos para garantizar en un primer momento su crecimiento exponencial. **Estadio 2:** El tumor secreta factores de crecimiento que activan las células endoteliales de los vasos circundantes. Estas migran y proliferan alrededor del tumor. **Estadio 3:** Una sola célula endotelial, es capaz de ser el origen del desarrollo de la capacidad de migrar a través de la matriz extracelular, y de ser guía de la migración del resto de células endoteliales. **Estadio 4:** El tumor finalmente se conecta a los vasos sanguíneos.

Una característica importante de estos vasos de nueva formación es que poseen una estructura diferente a los vasos normales. Así, presentan un endotelio no continuo, una membrana basal ampliada y una cobertura pericítica aberrante. Además, se pierde la jerarquía entre arteriolas, capilares y vénulas. Estas diferencias hacen que los vasos

sanguíneos asociados al tumor presenten una serie de huecos o discontinuidades a lo largo de su estructura. Van Horssen y colaboradores, proponen que los vasos asociados al tumor debido a su arquitectura especial y a que sus células endoteliales poseen receptores para el TNF- α (concretamente las células endoteliales poseen TNFR-1), podrían ser una diana específica para el tratamiento con TNF- α .

De hecho, se ha utilizado esta citocina en el tratamiento de tumores sólidos mediante perfusión de miembros aislados. (ILP) obteniéndose como resultado la necrosis hemorrágica del tumor (Lejeune y cols., 1998; Lejeune y cols., 2006). Según estos autores, el efecto observado podría deberse a que el TNF- α suministrado para tratar este tipo de tumores localizados, se une a sus receptores solubles dando como resultado una sobresaturación de los mismos debido a la alta dosis administrada. Esta unión hace que se incremente la permeabilidad de los vasos tumorales de manera que, tanto los eritrocitos como otras células sanguíneas se extravasan masivamente, originando una necrosis hemorrágica masiva del tumor. (Van Horssen y cols., 2006).

El efecto antitumoral del TNF- α podría incluir también respuestas inmunes que inhibirían la formación del tumor, sería el caso por ejemplo de la destrucción del estroma tumoral mediante linfocitos T citotóxicos.

Aunque esta citocina posee efectos citotóxicos, citostáticos e inmunomoduladores sobre las células malignas del tumor, su uso como agente quimioterapéutico ha sido obstaculizado por sus graves efectos secundarios como son el shock sistémico y una respuesta inflamatoria generalizada. Por tanto, uno de los objetivos principales en las terapias antineoplásicas es maximizar la citotoxicidad selectiva del tumor, minimizando al máximo posible los efectos secundarios del TNF- α .

Para ello, se han desarrollado distintas estrategias terapéuticas, una de las cuales se describe a continuación. El tratamiento mediante perfusión a miembros aislados (ILP) anteriormente citado es utilizado en el tratamiento de la metástasis de melanomas en tránsito y sarcomas de tejidos blandos inoperables. En estos casos, es un tratamiento seguro y eficaz a ciertas dosis, debido a que es un tratamiento localizado que no induce shock sistémico ni otros efectos secundarios debidos a la elevada toxicidad del TNF- α (Lejeune y cols., 1998).

La combinación del factor de necrosis tumoral con otros agentes quimioterapéuticos ha demostrado ser una eficaz estrategia terapéutica para algunos tipos de tumores debido al incremento de la sensibilidad de tumor al tratamiento (Daniel y

Wilson, 2008; Gerspach y cols., 2009). Así, la combinación de esta citocina con agentes que induzcan la apoptosis de las células tumorales gracias a la inhibición de la vía NF- κ B (que conduce a la supervivencia, la proliferación celular y es la principal vía de escape de la toxicidad inducida por el TNF- α) y/o con dianas de la vía BRAF está siendo una terapia con resultados esperanzadores (Balkwill, 2006; Gray-Schopfer y cols., 2007(a); Wang y Lin, 2008).

La actividad sinérgica del TNF- α junto con drogas quimioterapéuticas es una consecuencia de la hiperpermeabilidad inducida por el primero, explicada anteriormente tiene como consecuencia un aumento de la permeabilidad a lo largo del tumor, facilitando la distribución y acumulación de la droga en el mismo, lo que provoca una mejor exposición de las células malignas al fármaco en cuestión (Van Horssen y cols., 2006).

Una nueva estrategia para la administración del TNF- α es la terapia génica usando un adenovirus. Este contiene el cDNA del TNF humano bajo el control del promotor de EGR-1 (factor de crecimiento); puede ser activado por radiación o por diversos agentes anticancerígenos como son la ciclofosfamida, la doxorubicina, el 5-fluorouracilo, etc. Permitiendo un control tanto temporal como espacial de la liberación del TNF. En este caso, se ha observado una potente actividad anticancerígena sin efectos tóxicos sistémicos.

Otra vía para que el tratamiento con TNF- α actúe exclusivamente sobre las células tumorales es el uso de anticuerpos monoclonales. Para ello, se genera una proteína recombinante que fusiona el TNF- α a un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un antígeno tumoral (Scott y cols., 2012). Debido a que el TNF- α es capaz de destruir los vasos sanguíneos asociados al tumor se pueden fusionarle una serie de péptidos como el CNGRCG, que se unen específicamente a los vasos sanguíneos del tumor; para que destruya selectivamente los vasos del mismo. Por último, existe la estrategia de potenciar la capacidad del TNF- α de inducir la respuesta inmune en contra de las células tumorales (Wang y Lin, 2008).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Antecedentes e hipótesis

La metástasis es un proceso durante el cual, células que provienen de un tumor localizado a distancia logran asentarse y comienzan a proliferar, dando lugar a focos tumorales secundarios. Para dar lugar a metástasis las células tumorales han tenido que superar con éxito las distintas etapas que componen el proceso metastático y esto va a depender fundamentalmente de dos aspectos: por un lado, de las propias características de las células tumorales y por otro, de la interacción continua que se establece entre las células tumorales y las células normales del organismo. No siempre se produce la eliminación efectiva de las células tumorales y a veces, éstas escapan a la inmunovigilancia y producen metástasis, dependiendo de la inmunogenicidad del tumor. En algunos casos se ha descrito que el sistema inmune no sólo resulta ineficaz sino que además, el establecimiento de una respuesta inmune puede favorecer el desarrollo tumoral.

El melanoma es una enfermedad tumoral que se caracteriza por su alto potencial de agresividad y capacidad metastática (Denninghoff y cols., 2006). Su evolución con frecuencia es imprevisible y además, su incidencia está aumentando más rápidamente que la de cualquier otra neoplasia. En algunas poblaciones, como es el caso de Australia, tienen tasas anuales próximas a 50 casos por 100.000 habitantes (Manola y cols., 2000). Esta alta incidencia del melanoma se explica porque es una patología ligada a la exposición a la luz solar. Además, del hecho de la mayor prolongación de la esperanza de vida en los países con cultura occidental. Una de las características fundamentales de esta patología tumoral es su localización superficial, lo que nos permite observar y estudiar directamente la progresión tumoral del melanoma. Además, a nivel diagnóstico en base a características y criterios morfológicos definidos, se han establecido unas etapas del estadio tumoral de esta patología.

Los tratamientos habituales contra el cáncer no son efectivos en la terapia contra el melanoma, debido a que es resistente a la quimioterapia y a la radioterapia. En las últimas décadas se está tratando de introducir la Bioterapia del cáncer, que se basa en el uso de sustancias que pueden ser sintetizadas por el propio sistema inmune del paciente, que se denominan agentes inmunomoduladores con objeto de luchar contra los tumores. Las citocinas son agentes inmunomoduladores. Los primeros ensayos clínicos con agentes inmunomoduladores en pacientes con melanoma que han dado resultados alentadores, se están realizando con IL-2, con IFNs y TNF- α (Rosenberg, 1990; Lejeune y cols., 1998;

Joseph y cols., 1999; Aggarwal y cols., 2001; Wang y Ling, 2008; Zidi y cols., 2010; Chu y cols., 2013).

La línea de investigación de este grupo se inició con el estudio sobre la biología de la metástasis y se ha centrado en la modulación por la red de citocinas de la actividad metastática de las células tumorales. Fruto de estos trabajos entre otros, se obtuvieron una serie de resultados en los que hemos basado la hipótesis de esta tesis. Dichos resultados se pueden resumir en los siguientes puntos:

1) Las células del melanoma B16F10 expresan la IL-2 y el receptor funcional de la IL-2 (García de Galdeano y col., 1996).

2) El tratamiento "in vitro" de células B1610 con IL-2, da lugar a un incremento de la colonización metastática en el hígado (Boyano y col., 1997).

3) Las células del melanoma B16F10 cultivadas "in vitro" con IL-6 dan lugar a un incremento de la capacidad metastática tanto en hígado como en pulmón, además de un aumento de la expresión de VLA-4, que es una integrina asociada con la mayor capacidad metastática en células B16 (García de Galdeano y col., 1998).

El TNF- α es un factor proinflamatorio que media en las respuestas normales inmunes e infecciosas. Además, se considera un potente inmunomodulador y en base a esta propiedad se utiliza en el tratamiento biológico del cáncer como agente con actividad antitumoral. En el caso de las metástasis de melanomas en tránsito (son metástasis localizadas a menos de 2 cm del tumor primario) y algunos tipos de sarcomas, la utilización de TNF- α como agente terapéutico está obteniendo resultados esperanzadores.

Además, fruto de la investigación del TNF- α por otros autores, se ha obtenido datos que se recogen en los siguientes puntos:

1) El TNF- α es un potente inductor de la expresión de IL-6 en células (Jirik y cols., 1989; Norris y cols., 1994).

2) El TNF- α y la IL-6 son citocinas proinflamatorias que comparten diversas actividades en común (Hirano, 1998).

3) El TNF- α induce un incremento de la expresión de VLA-4 en células B16 (Okahara y cols., 1994).

4) El TNF- α “in vivo” da lugar a un efecto prometastático en células B16.

5) El TNF- α tiene un efecto antitumoral en el melanoma humano (Bani y cols., 1996; Rüegg y cols., 1998).

6) La compleja red de citocinas, como factores reguladores de la función celular, en la actividad de las células del melanoma (Rodek y Herlyn, 1991; Mattei y cols., 1994).

2. Objetivos

Para poder analizar el efecto de la IL-2, la IL-6 y el TNF- α en las células del melanoma B16 y estudiar su implicación en la biología y actividad metastática de estas células tumorales, en la presente Tesis Doctoral nos propusimos:

1) Evaluar si la IL-2, la IL-6 o el TNF- α son capaces de modificar la expresión de las moléculas de superficie: RIL-2 α , RIL-2 β , ICAM-1, VLA-4 y CD44, el patrón de distribución de filamentos del citoesqueleto y la capacidad de adhesión e invasión de las células tumorales.

2) Estudiar la actividad proliferativa de las células del melanoma B16 tratadas con IL-2, IL-6 y TNF- α evaluando tanto el potencial proliferativo como la capacidad clonogénica de las células tumorales.

3) Determinar si la IL-2, la IL-6 o el TNF- α son producidos por estas células tumorales. Además, determinar si la síntesis de la IL-2 o la IL-6 puede ser inducida en las células del melanoma B16 utilizando entre otros el TNF- α como inductor.

4) Tratar de estudiar el ciclo celular y moléculas que estén implicadas en la respuesta de las células del melanoma B16 al tratamiento con TNF- α .

5) Establecer si la susceptibilidad al efecto del TNF- α depende del grado de malignidad de las células y analizar la posible interacción de la red de citocinas (IL-2, IL-6 y TNF- α) en las células del melanoma B16.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

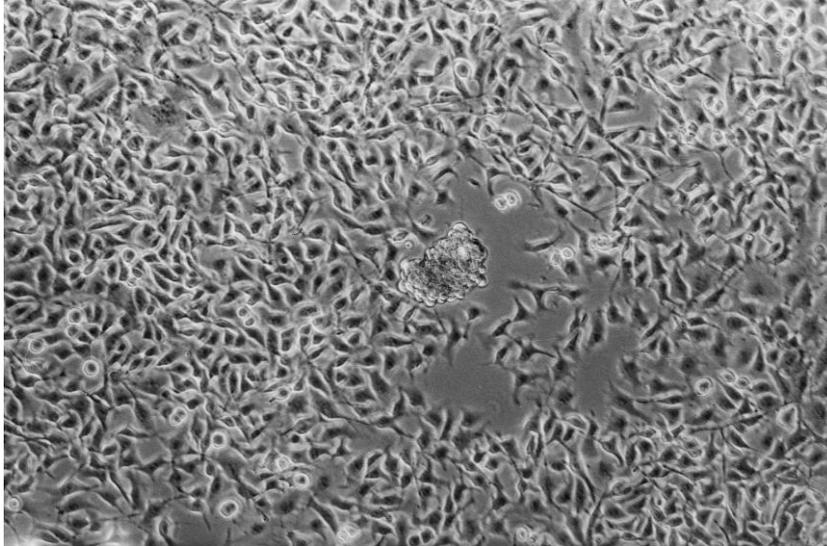
1.1. Líneas celulares

Melanoma B16. El melanoma B16 es un tumor productor de melanina. La línea celular se estableció en 1954 en los laboratorios Jackson (Maine, USA) a partir de un tumor espontáneo que se desarrolló en ratones C57BL/6J y se ha mantenido en cultivo continuo desde entonces. De la línea primitiva se obtuvo variantes con distinta capacidad metastática (Fidler, 1973). Entre ellas están las sublíneas denominadas B16F1 y B16F10 (Figura 3), siendo esta última la que posee un mayor poder metastático. Aprovechando esta cualidad, ambas sublíneas celulares se emplearon en la mayor parte de este trabajo. Las sublíneas celulares fueron adquiridas a través de la ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, USA). B16F1 (ATCC CRL-6323) y B16F10 (ATCC CRL-6475).

Línea de fibroblastos L929. Esta línea de fibroblastos se estableció en cultivo continuo (Earle, 1940) a partir de tejido conectivo subcutáneo de ratón C3H/An adulto. Estas células tratadas con 20-metilcolantreno producen sarcomas, cuando se inoculan en los ratones C3H/An. Esta línea celular fue cedida amablemente por la Dra. Begoña Díez Azpiri. Profesora del Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la UPV/EHU. Estas células se utilizaron como control en diversos tipos de ensayos.

Línea de linfocitos T citotóxicos CTLL-2. Es una línea celular derivada de linfocitos T citotóxicos específicos, inducidos por la inoculación a ratones de la cepa C57BL/6J (H-2^b) de células alogénicas de eritroleucemia F4-5, de haplotipo H-2^d (Gillis y Smith, 1977; Baker y cols., 1979). Estas células tienen como requisito imprescindible para su mantenimiento un aporte exógeno de IL-2 al medio de cultivo. La carencia de este factor determina la muerte de todas las células del cultivo en un período de 24 h.

A



B

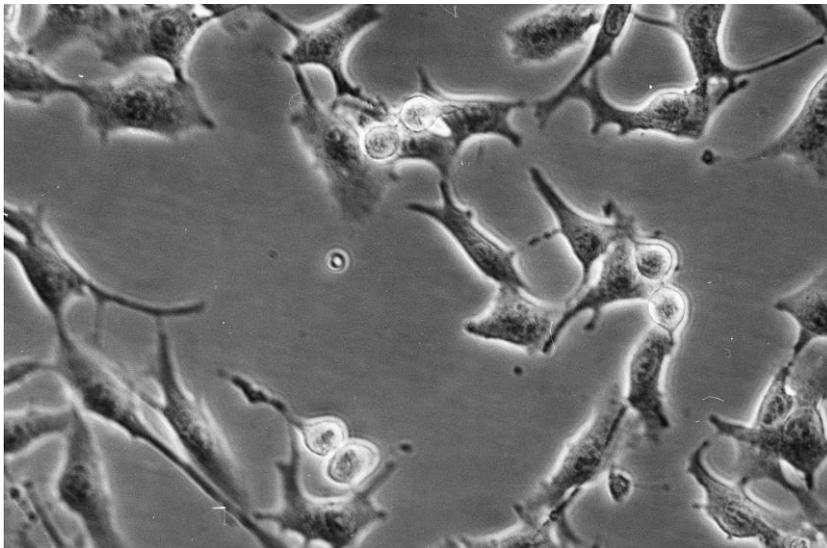


Figura 3. Línea celular en cultivo.

(A) Melanoma B16F10 (10x). **(B)** Melanoma B16F10 (32x). Imágenes obtenidas mediante un microscopio invertido ZEISS Axiovert 25.

1.2. Materiales empleados en cultivos celulares

- **Frascos de cultivo.** Para realizar el cultivo continuo de las líneas celulares se utilizaron frascos desechables de poliestireno de 25 y 75 cm² de superficie (Costar).

- **Otros recipientes de cultivo.**

- Las experiencias de proliferación celular se realizaron en microplacas de 96 pocillos de fondo plano (Falcon). En las experiencias de colonias se utilizaron macroplacas de 24 pocillos de fondo plano (Falcon).

- En las experiencias de invasión se utilizaron insertos con membrana de polyethylen terephthalato (PET) de un tamaño de poro de 8,0 μm (Cell Culture Inserts, Falcon) así como macroplacas de 24 pocillos adaptadas para usar con insertos (Tissue Culture Plate for use with 9 mm Cell Culture Inserts, Falcon).

- Las valoraciones mediante microscopía de fluorescencia se llevaron a cabo en cámaras de cultivos celulares asociadas a portaobjetos (portaobjetos provistos de camarillas desechables (Tissue Culture Chambers Slide, Nunc).

1.3. Medios, reactivos y soluciones

1.3.1. Medios de cultivo

Para el mantenimiento de las líneas celulares se utilizó el medio de cultivo **DMEM** (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con bicarbonato, con antibióticos; Penicilina G (Instituto de Farmacología Española): 33 μl/100 ml de DMEM o Gentamicina (Laboratorios Schering-Plough): 250 μl/100 ml de DMEM y con 10% de suero bovino fetal (SEROMED).

El medio de cultivo DMEN se preparó disolviendo la solución del medio liofilizado en agua desionizada, se ajustó el pH a 7,2 y se filtró por presión negativa con filtros de 0,22 μm. Antes de ser utilizado se incubó durante al menos 72 h para testar su esterilidad. Este medio se utilizó para el mantenimiento y cultivo continuo de la línea de fibroblastos L929. Las líneas tumorales B16F1 y F10 se cultivaron con este mismo medio pero sin la adición de antibióticos.

Para el mantenimiento de la línea CTLL-2 hemos utilizado medio de cultivo **RPMI-1640** (Sigma Cell Culture) suplementado con los siguientes compuestos:

- Bicarbonato 0,855 gr/l.
- HEPES 10 mM (Boehringer-Mannheim).
- 2-Mercaptoetanol 5×10^{-5} M (Invitrogen).
- L-glutamina 2mM (Sigma 200 mM).
- Aminoácidos no esenciales 10 ml/l.
- Antibióticos: penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml).
- 5% de SBF (Sigma).
- IL-2 recombinante humana (10-20 U/ml) o 15% (v/v) de sobrenadante de esplenocitos de rata con actividad IL-2.

El medio de cultivo RPMI-1640 se suplementa inmediatamente antes de ser utilizado y los compuestos como el bicarbonato, HEPES y 2-ME son disueltos en una pequeña cantidad de medio y filtrados, antes de ser añadidos.

- **SBF** (Suero Bovino Fetal) (SEROMED). Se utilizó para suplementar los medios de cultivo. Antes de hacer las alícuotas hay que descomplementarlo. Para ello, se descongeló de forma gradual de -20°C a temperatura ambiente con objeto de evitar en la medida de lo posible, la formación de grumos o acúmulos de fibras. Una vez descongelado, se precalentó el baño termostataado a 56°C . A esta temperatura se descomplementó durante 45 minutos y se alicuotó en frascos de vidrio estériles, que se almacenaron a -20°C hasta su uso.

1.3.2. Reactivos y soluciones tamponadas

- **EDTA** (ácido etilen-diamino-tetra-acético) (Sigma). Para disgregar los tapices al realizar los subcultivos de las células adherentes de la línea B16 se utilizó una solución de EDTA 2 mM en PBS (pH=7,2) (PBS-EDTA).

- **BSA** (Albúmina sérica bovina) (Sigma). Se conservó a 4°C .

- **DMSO** (Dimetilsulfóxido) (Merck). Se almacenó a temperatura ambiente y se utilizó en el protocolo de congelación celular.

- **HEPES** (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Boehringer-Mannheim). El tampón HEPES se utilizó a una concentración de 10mM para suplementar el medio RPMI-1640. Se almacenó a temperatura ambiente.

- **PBS** (Tampón fosfato en solución salina) (pH=7,2). Se preparó una solución 10X en agua desionizada, que se esterilizó por autoclavado.

Solución 10X: (para 1 litro)

- Clk	2 g.
- ClNa	80 g.
- PO ₄ HNa ₂ x (2H ₂ O)	14,4 g.
- PO ₄ H ₂ K	2 g.

La solución de uso se obtuvo a partir del stock 10X, diluyendo en agua desionizada 1/10. Se ajustó el pH de nuevo a 7,2 y se volvió a autoclavar. Por último, se almacenó a 4°C hasta su uso.

- **PBS-BSA** (Sigma). Solución de albúmina sérica bovina al 1%, 0,5% y 0,1% en PBS (pH=7,2). Se empleó para hacer lavados.

- **PBS-0,5%BSA-0,1% azida sódica** (Sigma). Solución de albúmina sérica bovina y de azida sódica en PBS (pH=7,2). Se empleó para hacer la dilución de los anticuerpos en los inmunoensayos.

1.3.3. Soluciones fijadoras

- **Etanol (alcohol etílico) 96°: 30%, 50%, 70%, 90% y 100%** en agua desionizada (Probus).

- **Formaldehído 2% y 4% en PBS** (Sigma).

- **Glutaraldehído 3% en PBS** (Boehringer Ingelheim, Serva).

- **Tritón X-100 (Sigma) 0,1% y 0,5% en PBS**. Es un detergente que se empleó para permeabilizar las células en los inmunoensayos. Se almacenó a temperatura ambiente.

- **Xilol** (Panreac).

1.3.4. Colorantes

- **Azul tripán** (CARLO ERBA). Solución concentrada de azul tripán liofilizado, disuelto al 0,1% en agua desionizada. Solución de uso: dilución al 0,001% en PBS.

- **Cristal violeta** (Sigma). Se preparó como sigue.

a) Solución madre: (para 1 litro)

- Cristal violeta	20 g.
- etanol	200 ml.
- formol	100 ml.
- agua desionizada	700 ml.

Se disolvió primero el cristal violeta en el etanol.

b) Solución de uso: (para 10 ml)

- solución madre	1 ml.
- formol	1 ml.
- agua desionizada	8 ml.

Concentración de trabajo: Cristal violeta al 0,2% en etanol al 2% y en formol al 4%.

- **DAPI** (4',6-Diamidino-2-phenylindole (dihydrochloride) (Sigma). Es una tinción de contraste del núcleo, que se almacenó a 4°C, siendo la concentración de uso de 2 mg/ml.

- **Giemsa** (Azur-eosina-azul de metileno, según Giemsa en solución para microscopía) (Merck, N° catálogo 9204). Se empleó una dilución 1:20, en agua desionizada.

1.3.5. Medios de montaje

- **DPX** (Mountant for histology) (FLUKA). Se almacenó a temperatura ambiente.

- **Fluoromount-G** (Southern Biotechnology Associates Inc, Birmingham). Se conservó a 4°C.

1.4. Productos de origen biológico

- **Actinomicina-D** (Sigma). Esta sustancia obtenida de Streptomyces species es un inhibidor de la síntesis proteica. El liofilizado comercial se disolvió en DMSO y se alicuotó en viales tipo Eppendorf que se mantuvieron a -20°C, evitando que entraran en contacto con la luz. La concentración de uso fue: 1-8 µg/ml.

- **Anticuerpos monoclonales:**

- **Anti CD44** (CHEMICON). MAB2212. Rat x Mouse, lote: 64297051. Envase de 100 µg (1 mg/ml). Se une selectivamente al CD44 que es un receptor de membrana para el ácido hialurónico. Se empleó una dilución 1:20 que se mantuvo almacenada a -20°C.

- **Anti ICAM-1** (R. D. Systems). La molécula de adhesión intercelular-1, pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y ha sido relacionada con la alta malignidad del melanoma (Johnson y cols., 1989; Natali y cols., 1990). Además, ha sido asociada con la regulación de la IL-2 en linfocitos (Buckle y cols., 1990; Triozzi y cols., 1992) y está asociada con el receptor de la IL-2 (Burton y cols., 1990). La solución comercial liofilizada se disolvió en 1 ml de agua bidestilada estéril y se almacenó a 4°C. Se empleó una dilución 1:10.

- **Anti Ig G-FITC** (DAKO). Este anticuerpo pone de manifiesto el anticuerpo que se está testando, se utiliza como segundo anticuerpo Inmunoglobinas de conejo conjugadas con Isotiocianato de fluoresceína y dirigidas contra inmunoglobinas de rata. Se almacenó protegido de la luz a 4°C. Se empleó una dilución 1:30.

- **Anti Phalloidin-TRITC** (Isotiocianato de tetrametil rodamina conjugado con Faloidina) (Sigma). La Faloidina es un alcaloide extraído de la Amanita phalloides, que se une a la actina F filamentosa estabilizándola. El anticuerpo se almacenó a -20°C, siendo la concentración de uso de 0,2 µg/ml.

- **Anti p21^{WAF1/CIP1}** (PharMingen). El p21^{WAF1/CIP1} es un inhibidor del ciclo celular. Se utilizó el anticuerpo monoclonal p21^{WAF1/CIP1} purificado de ratón y específico para su uso en citometría de flujo. Se empleó una dilución 1:25 y se conservó a 4°C.

- **Anti RIL-2α** (Endogen) (CD25). Específico para el receptor alpha de la IL-2 de ratón. La molécula de 55 KDa se une a la IL-2 con baja afinidad. La solución comercial

lío-filizada se disolvió en 1 ml de agua bidestilada estéril y se almacenó a 4°C. Se empleó una dilución 1:10.

- **Anti RIL-2 β** (Endogen) (CD122). Específico para el receptor beta de la IL-2 de ratón. La molécula de 75 KDa se une a la IL-2 con afinidad intermedia. La solución comercial lío-filizada se disolvió en 1 ml de agua bidestilada estéril y se almacenó a 4°C. Se empleó una dilución 1:10.

- **Anti VLA-4** (CHEMICON). El VLA-4 es uno de los receptores de membrana de la fibronectina, presenta dos cadenas denominadas α 4 y β 1, respectivamente. Para nuestros ensayos se empleó VLA-4 (α 4), conjugado ratón anti-rata. Se almacenó a -20°C y se utilizó a una dilución 1:10, siendo la concentración de uso 20 μ g/ml.

• **Ceramida** (Calbiochem). La ceramida es un segundo mensajero, que media entre otras, en la señalización de las respuestas inflamatorias e inmunes y también en el proceso de apoptosis. Se empleó un análogo sintético denominado C₂-ceramida (N-Acetyl-D-erythro-Sphingosine). El lío-filizado se disolvió en DMSO y los viales obtenidos de 250 μ g/vial se almacenaron a -20°C. La concentración de uso fue 1-100 μ M.

• **Ciclosporina** (Calbiochem). Esta sustancia con potente actividad inmunosupresora consiste en un decapeptido producido por el hongo Trichoderma polysporum. Es un potente inhibidor de la actividad protein fosfatasa. Además, inhibe la síntesis de óxido nítrico inducida por la IL-1, lipopolisacáridos y el TNF- α . El producto se resuspendió en etanol y se alícuotó en viales de 5.000 μ g/100 μ l que se almacenaron a -20°C. Siendo la concentración de uso de 0,1-10 μ g/ml.

• **Citocinas:**

- **Interleucina 2 (IL-2)** (Boehringer Mannheim). En todos los tratamientos con IL-2 se ha utilizado IL-2 recombinante humana E. coli con una actividad específica de más de 2 x 10⁶ U/mg. A partir del vial comercial con IL-2 a una concentración de 10.000 U/ml se hicieron alícuotas de 1.000 U/vial y se mantuvieron a -20°C hasta su utilización.

- **Interleucina 6 (IL-6)** (Boehringer Mannheim). Como fuente de IL-6 se ha empleado IL-6 recombinante humana E. coli de actividad específica 2 x 10⁸ U/mg de proteína, presentada en viales de 200.000 U/ml. Se hicieron alícuotas de 10.000 U/ml que se conservaron a -20°C hasta su utilización.

- **Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α)** (Sigma). Se utilizó TNF- α recombinante de ratón. El producto liofilizado se disolvió en DMEM y se alicuotó en viales de 5×10^5 pg/500 μ l que se almacenaron a -20°C hasta su uso.

- **Enzimas:**

- **Tripsina** (Sigma). Esta enzima se utiliza para disgregar la línea celular L929 para subcultivarla. En nuestros ensayos se utilizó una solución de Tripsina-EDTA 2 mM en PBS (pH=7,2) (PBS-Trip EDTA).

- **RNasa** (Boehringer Mannheim). El liofilizado comercial de la RNasa de páncreas bovino se almacenó a 4°C . Se reconstituyó en agua desionizada estéril, y se hicieron alícuotas de 500 U/vial que se congelaron a -20°C hasta su uso.

• **Ioduro de Propidio** (Sigma). Es un derivado del fenantreno que se une específicamente a la estructura polinucleotídica de los ácidos nucleicos, intercalándose entre sus pares de bases. Debido a su estructura iónica, no puede penetrar en las células vivas pero si en las muertas, por lo que marca su ARN y ADN. El ioduro de propidio se solubilizó en agua desionizada a una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$, siendo la concentración de uso de 50 $\mu\text{g/ml}$. Se almacenó protegido de la luz a 4°C .

- **Kits comerciales utilizados:**

- **Kit de ELISA IL-6** (Quantikine™ M mouse IL-6 Immunoassay Kit) (R. D. Systems). Inmunoensayo enzimático fotométrico para la determinación cuantitativa “in vitro” de la interleucina-6 de ratón (IL-6), en microplacas listas para usar. Se utilizó en la determinación de la IL-6 en los sobrenadantes de los medios donde se habían cultivado las células. Se almacenó a 4°C .

- **Cell Proliferation Kit II (XTT)** (Boehringer Mannheim). Ensayo colorimétrico basado en el XTT, para la cuantificación no radiactiva de la proliferación y la viabilidad celular. El reactivo XTT (XTT labeling reagent) se alicuotó en tubos roscados cónicos de poliestireno de 10 ml (BEORTEK). Mientras que el reactivo de acoplamiento electrónico (Electron-coupling reagent) se alicuotó a parte, en tubos tipo Eppendorf. Ambas alícuotas se mezclaron en el momento de añadirse a la microplaca de 96 pocillos. Hasta su uso, es importante mantenerlas almacenadas en oscuridad y a -20°C . La concentración óptima para su uso en nuestros ensayos fue 50 $\mu\text{l/pocillo}$.

- **MATRIGEL[®]** (Basement Membrane Matrix) (Becton and Dickinson). Esta matriz, es un extracto del tumor de ratón Engelbreth-Holm-Swarm, el cual es rico en proteínas de la membrana basal. Los principales componentes de la matriz son laminina, colágeno IV, entactina y proteoglican-heparan-sulfato. También contiene factores de crecimiento, otras proteinasas además de otros componentes no definidos. A temperatura ambiente el gel de MATRIGEL se polimeriza formando una membrana basal con estructura, composición, propiedades físicas y habilidad para adquirir características funcionales típicas de las membranas basales.

El vial de MATRIGEL liofilizado se reconstituyó en DMEM, manteniendo en todo momento el producto a 4°C para que no polimerizase. Se alicuotó en viales de 2.100 µg/vial y además, uno de los viales anteriores se diluyó a la concentración de uso: 200 µg/vial. Para conseguir dicha concentración, el contenido de un vial se disolvió en DMEM. Por último, se almacenaron los viales de la concentración de uso y stock, a -20°C. Para utilizarlo se atemperó el MATRIGEL de -20°C a 4°C durante toda una noche. Para ello, se colocó en hielo picado a 4°C y se mantuvo en todo momento en hielo picado hasta su utilización.

- **PMA** (Phorbol-12-myristate-13-acetate) (Sigma). Esta sustancia activa al linfocito T y estimula la producción de IL-2 en las células Jurkat (Weiss y cols. 1984). El liofilizado se reconstituyó en 1 ml de DMSO o en etanol. Se alicuotó en viales de 50 µl/vial que se almacenaron a -20°C. La concentración de uso fue 1 µM-10 nM.

2. Métodos

2.1. Cultivos celulares

Los cultivos de líneas celulares se realizaron en condiciones de esterilidad en un laboratorio destinado exclusivamente para tal fin, en el cual las condiciones de esterilidad están controladas al máximo. En dicho laboratorio se dispone del siguiente equipamiento: incubadora que mantiene los cultivos a una temperatura constante de 37°C y en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ (JOUAN IG 150), campana de flujo laminar vertical en la que se realiza la manipulación de las células (TELSTAR PV-100), centrífuga (JOUAN CR 312), centrífuga de mesa (HEIDOLPH ZENTR.280E), vortex (HEIDOLPH REAX Top), baño termostático (SELECTA P UNITRONIC 320 OR), espectrofotómetro (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC ELx800), microscopios invertidos (ZEISS y ZEISS Axiovert 25), microscopio de fluorescencia Leica (LEITZ DMRB) y citómetro de flujo EPICS ELITE ESP (Coulter Electronics Inc.).

2.1.1. Mantenimiento de las líneas tumorales

Todas las líneas tumorales adherentes (B16F1, B16F10) utilizadas se cultivaron en frascos de cultivo en posición horizontal en DMEM suplementado al 10% con SBF como medio de cultivo. Al proliferar, éstas células adherentes van ocupando toda la superficie del frasco y cuando los tapices celulares alcanzan la confluencia se realiza el subcultivo. Para ello, se retiró el medio de los frascos de cultivo y se disoció las monocapas celulares adicionando una solución de PBS-EDTA 2 mM (pH=7,2) con la que se incubaron los frascos en la estufa de cultivos. La solución celular obtenida se centrifugó y se hizo un recuento mediante la tinción vital con azul tripán. Seguidamente se hizo una resiembra, bajando la concentración de células y empleando medio de cultivo nuevo. El número de células que se sembró para cada tipo celular se ajustó para conseguir un tapiz confluyente cada 2-3 días.

2.1.2. Mantenimiento de la línea L929

Esta línea de fibroblastos murinos presenta también crecimiento adherente, por lo que se cultivaron en frascos de cultivo en posición horizontal en DMEM con antibióticos (penicilina G: 33 μ l/100 ml DMEM o gentamicina 250 μ l/100 ml DMEM) y suplementado con 10% de SBF como medio de cultivo. Los fibroblastos proliferan y ocuparon toda la superficie del frasco. Cuando el tapiz celular llegó al estado de confluencia, se realizó el subcultivo. Para esto, las células se incubaron en la estufa con una solución enzimática de tripsina-EDTA 2 mM (pH=7,2) durante 5 minutos para disgregar la monocapa celular. La solución celular obtenida se centrifuga y recuenta usando azul tripán y se resiembrando bajando la concentración de células con medio de cultivo nuevo. El número de células que se resiembrando se ajusta para conseguir un tapiz confluyente cada 2-3 días.

2.1.3. Mantenimiento de la línea CTLL-2

Las células CTLL-2 se cultivan en suspensión en frascos de 25 cm², en posición vertical y en medio RPMI-1640 suplementado como se indica en el apdo. 1.3.1. al que además, se añade una fuente de IL-2. Para subcultivar se siembran 5 x 10⁴ células/ml, las cuales en 48 h proliferan hasta alcanzar una concentración de 4-5 x 10⁵ células/ml. Cuando el crecimiento llega a este punto, se centrifugan las células en un tubo de 50 ml, a 2.500 rpm 15 min a 4°C para eliminar los restos celulares. Se cuentan y se resiembrando en medio de cultivo nuevo.

2.1.4. Congelación y descongelación de células

Para evitar problemas derivados del cultivo ininterrumpido de las líneas celulares (alteraciones, contaminaciones, etc.), éstas se mantienen en cultivo durante un número determinado de pases (aproximadamente 12 pases) tras lo cual, se retiran y sustituyen por células nuevas. Por ello se mantiene un stock de células congeladas que nos permite reponer la línea en cualquier momento que lo necesitemos.

a) Congelación. Las células en crecimiento exponencial se centrifugan a 1.500 rpm, 5 min a 4°C y la pastilla celular se resuspende en SBF con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% preparados con anterioridad ya que la reacción es fuertemente exotérmica, a una concentración de 2-5 x 10⁶ células/ml. Esta suspensión celular se dispensa en viales de congelación estériles de 2 ml de polipropileno (External Thread Cryogenic Vials (CORNING)). En cada vial se dispensa 1 ml de medio de congelación y se congelan los

viales de forma gradual para evitar al máximo el daño celular: primero a -20°C (durante 4-6 h), luego se llevan al congelador de -80°C y por último, algunos viales se almacenan en nitrógeno líquido donde se mantienen a -196°C .

b) Descongelación. Las ampollas de congelación se llevan lo más rápido posible a un baño termostático a 37°C y tras la descongelación se siembra el contenido del vial en un frasco de cultivo con medio nuevo. En el caso de las células adherentes, 1-2 h después de la siembra se observa el grado de adherencia al fondo del frasco y si este es el adecuado, se cambia el medio de cultivo para eliminar el contenido de DMSO (tóxico para las células) y restos de células muertas.

2.1.5. Viabilidad y recuento celular

En todos los experimentos realizados con células fue necesario realizar un recuento y una determinación de la proporción de células vivas y muertas contenidas en una suspensión dada, previos a su utilización. Para determinar la concentración y viabilidad celular se utiliza una cámara de recuento Bürker (Blaubrand) que presenta una retícula de área conocida y la tinción con azul tripán. El azul tripán es un colorante vital que sólo tiñe las células muertas, de modo que sólo éstas aparecerán azules, mientras que las células vivas permanecen incoloras. El dato obtenido corresponde a número de células/ml.

2.2. Ensayo de invasión celular

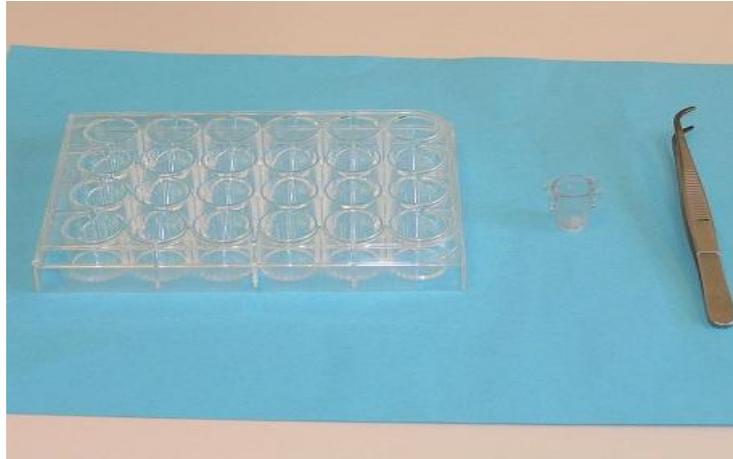
El ensayo se inicia abriendo en la campana de flujo laminar una macroplaca de 24 pocillos adaptada para usar con insertos (Tissue Culture Plate for use with 9 mm Cell Culture Inserts, Falcon) e insertos con membrana de polyethylen terephthalato (PET) de un tamaño de poro de 8,0 μm (Cell Culture Inserts, Falcon) (Figura 4A). Se dispensa en los pocillos que serán el lugar definitivo de los insertos 1 ml de DMEM-BSA 0,1% para que el pH sea adecuado al de las células. También puede ser medio conteniendo un factor (TNF- α , IL-2, IL-6, etc.), o medio condicionado obtenido a partir de otras células (L929). En otros pocillos se colocan los insertos que previamente se lavan con PBS estéril usando pinzas estériles, se retira el PBS y se añade el MATRIGEL 50 μl /filtro; 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (10 $\mu\text{g}/\text{filtro}$). Todo el material que esté en contacto con el MATRIGEL debe estar a 0°C antes de usarse ya que si no, se polimeriza el MATRIGEL antes de tiempo.

A continuación, se deja polimerizar la placa en la estufa 2 h a 37°C. Tras esto, se lavan los insertos con cuidado con PBS estéril. Con unas pinzas estériles se pasan los insertos a su lugar definitivo, que ya contiene el medio adecuado (Figura 4B) y se siembran las células B16 o L929 en el compartimento superior: 2 x 10⁵ céls/inserto en un volumen de 200 μl de DMEM-BSA al 0,1%. Las células pueden estar previamente sometidas a tratamiento. Las macroplacas se incuban a 37°C en la estufa durante 4-24 h. Finalizado el periodo de incubación se observan los insertos al microscopio, se sacan con unas pinzas estériles a otros pocillos. En el pocillo donde se encontraban los insertos, se cambia el medio y se añade DMEM suplementado con 10% de SBF. Se vuelve a incubar la macroplaca en la estufa una semana. Para revelar el fondo de la macroplaca, se tiñen y cuentan las colonias que aparezcan como se indica en el apdo. 2.6. de Materiales y Métodos.

Por otro lado, los insertos se lavan con PBS por dentro y además, con un bastoncillo se retira todas las células de dentro del inserto. Tras la eliminación de las células del interior del filtro, éste se sumerge en glutaraldehído 3% en PBS, durante 30 min a temperatura ambiente. Finalizada la fijación, se retira el glutaraldehído y se lava 2 veces con PBS. Tras los lavados, se retira el PBS y se añade Giemsa 30 min. Para retirar el exceso de colorante, se lava 3 veces los insertos con agua. Una vez limpios, se retira la membrana del inserto con ayuda de un bisturí y se procede a deshidratar las membranas de los insertos con alcoholes (etanol): 30, 50, 70, 90, 100% se debe tener cada filtro en todos los alcoholes 1 min. Luego, se aclaran en xileno (breve inmersión) y se proceder al

montaje con DPX, colocando las células hacia arriba y poniendo un cubreobjetos. Se evalúan 5 campos a 200 aumentos en el microscopio Leica (LEITZ DMRB).

A



B

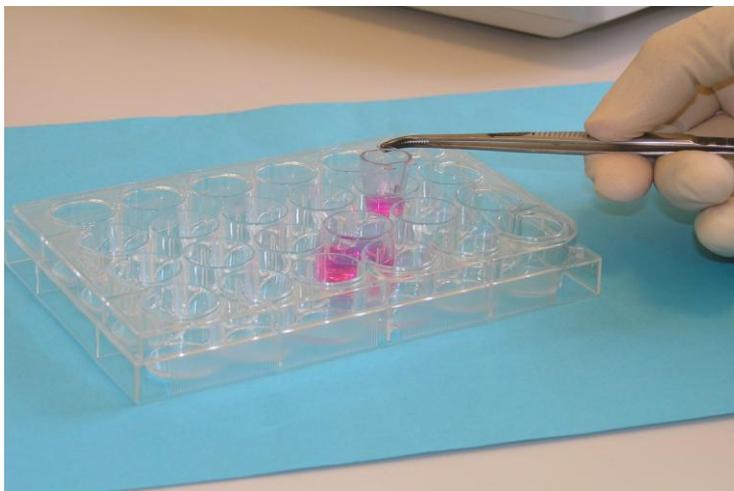


Figura 4. Ensayo de invasión celular en macroplaca.

(A) Materiales utilizados: insertos, macroplacas de 24 pocillos adaptadas para usar con insertos y pinzas. (B) Recubriendo el pocillo con MATRIGEL y añadiendo el medio de cultivo.

2.3. Cámaras de cultivos celulares asociadas a portaobjetos

Las células B16 o L929 se siembran en cámaras de cultivos celulares asociadas a portaobjetos (portaobjetos provistos de camarillas desechables (Tissue Culture Chambers Slide, Nunc) (Figura 5) a una concentración de 2×10^4 - 4×10^4 cél/pocillo, en un volumen de 500 μ l de medio suplementados con 10% de SBF. Estas células previamente se han disgregado del tapiz celular, centrifugado y contado a partir de cultivos en fase exponencial del modo habitual.

Una vez sembradas las cámaras, se incuban en la estufa. A las 2-4 h de incubación, se puede hacer un tratamiento a las células consistente en hacer que crezcan deprivadas de SBF o realizar tratamientos con factores diversos (TNF- α , IL-2, IL-6, CsA, C₂-ceramida, etc.). Para ello, se retira el volumen de medio equivalente al volumen que va a contener el tratamiento. Una vez tratadas las células, las camarillas se dejan incubar durante 24 h en la estufa.

Por último, se desmonta la carcasa de las camarillas con ayuda de un punzón. Se deja secar el portaobjetos y se hace el montaje para microscopía añadiendo medio de montaje (Fluomount-G). Tras lo cual, se coloca un cubre bien limpio sobre el portaobjetos, que se sella añadiendo en los extremos unas gotas de esmalte de uñas. A continuación, se estudian al microscopio de fluorescencia Leica (LEITZ DMRB).

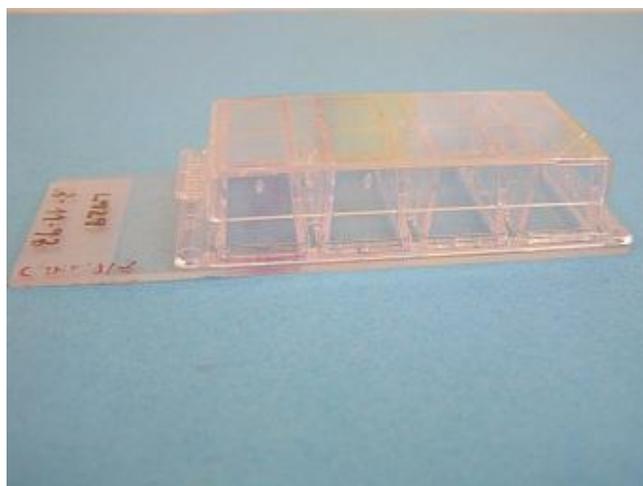


Figura 5. Cámara de cultivos celulares asociada a portaobjetos (Tissue Culture Chambers Slide, Nunc).

2.3.1. Tinción de los filamentos de F-Actina con TRITC-Faloidina

Para llevar a cabo la tinción se sigue el siguiente protocolo. Primero, las células B16 o L929 se siembran en cámaras de cultivos celulares asociadas a portaobjetos (portaobjetos provistos de camarillas desechables) (Tissue Culture Chambers Slide, Nunc) (Figura 5) a una concentración de: 2×10^4 cél/pocillo en un volumen de 500 μ l suplementados con 10% de SBF. A las 2-4 h de cultivo en la estufa, se retiran 250 μ l de medio y se añaden los tratamientos (TNF- α , IL-2, IL-6, CsA, C₂-ceramida, etc.) o se depriva totalmente de SBF a algunos pocillos. Las camarillas se vuelven a incubar en la estufa durante 24 h. Tras la incubación, se lavan 2 veces las camarillas con 500 μ l/pocillo de PBS, para eliminar el medio de cultivo. Tras el último lavado, se fijan con formaldehído al 2% en PBS, 5 min. Para eliminar el exceso de fijador, se lavan las camarillas con 1 ml/pocillo de PBS durante 5 min. Los portaobjetos se estudiaron con el microscopio invertido (ZEISS Axiovert 25).

Una vez concluido el lavado, las camarillas se tiñen con 200 μ l/pocillo de TRITC-Faloidina (0,2 μ l/pocillo), durante 40 min en oscuridad. Para retirar el exceso de colorante, se lavan 5 min en PBS. En este momento, puede hacerse una tinción de contraste, consistente en teñir con DAPI: 2 mg/ml (200 μ l/pocillo), durante 10 min (o con bromuro de etidio). Se vuelve a lavar para eliminar el exceso de la tinción 5 min en PBS y luego, se retira el PBS.

Por último, se desmonta la carcasa de las camarillas con ayuda de un punzón. Se deja secar el portaobjetos y se hace el montaje para microscopía añadiendo medio de montaje (Fluomount-G). Tras lo cual, se coloca un cubre bien limpio sobre el portaobjetos, que se sella añadiendo en los extremos unas gotas de esmalte de uñas. A continuación, se estudian las imágenes mediante un microscopio de fluorescencia Leica (LEITZ DMRB).

2.4. Ensayo de adhesión celular

El ensayo de adhesión comienza recubriendo el fondo de los pocillos de una microplaca de 96 pocillos con MATRIGEL: 1 μg /pocillo en un volumen de 50 μl /pocillo. Previamente, para las líneas celulares en estudio se ensayaron diversos tiempos de adhesión (Figura 6). Se estableció 1 h. como tiempo de adhesión suficiente del MATRIGEL a la microplaca incubada en la estufa a 37°C. Luego, se retira el medio y se añade una solución de PBS al 1% de BSA para bloquear durante 30-60 min y se introduce la microplaca de nuevo en la estufa. Tras la incubación, se retira el medio y se lava con PBS los pocillos. Una vez concluida la preparación de la placa recubierta con MATRIGEL, se siembran las células B16F1 o B16F10 en DMEM-BSA 0,1%. Para el ensayo de adhesión se siembra 2×10^4 cél/100 μl en cada pocillo y a continuación, la microplaca se incuba en la estufa entre 30 min- 4 h.

Finalizada la incubación, se procede a lavar 2 veces los cultivos con 200 μl /pocillo de PBS a 37°C, para eliminar las células no adheridas. Esto debe hacerse con extremo cuidado y muy despacio, para evitar que con la punta de la micropipeta se rompa el tapiz y se desprendan fragmentos que nos darían lugar a resultados erróneos por esta causa. Para revelar el ensayo, se tiñen los pocillos con 1 gota de cristal violeta al 0,2% en etanol 2% y formol 4%, durante 30 min. Para eliminar el exceso de colorante, se lava la microplaca con cuidado con agua del grifo y dejar escurrir toda la noche boca abajo sobre un papel de filtro. Para cuantificar el resultado, se lisa las células añadiendo a cada pocillo 100 μl de etanol 100%. Por último, se lleva la microplaca al espectrofotómetro (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC ELx800) y se mide a 540 nm.

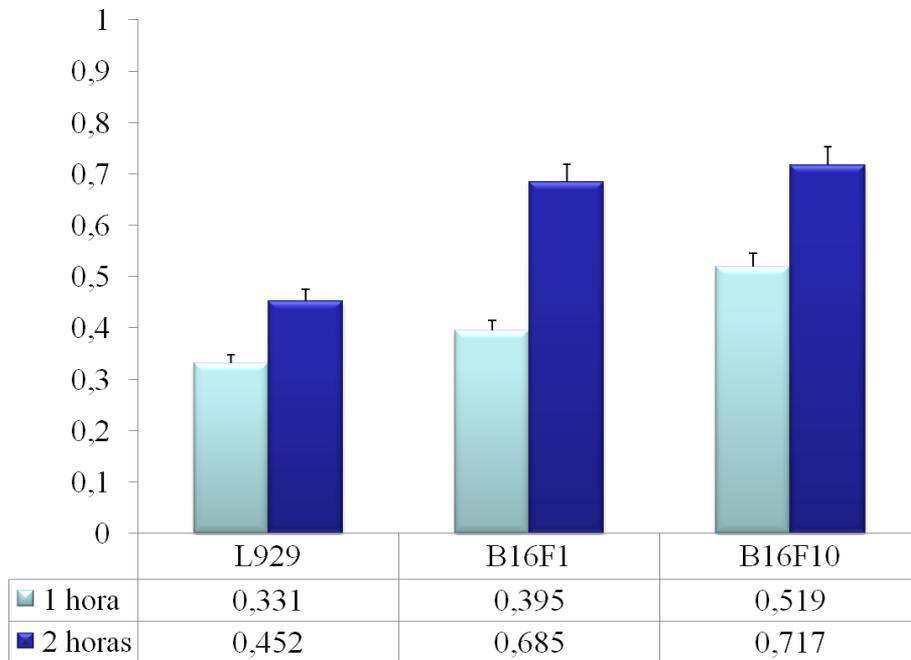


Figura 6. Ensayo de adhesión celular “in situ”. Histogramas de adhesión celular “in situ” de las líneas de melanoma B16F1, B16F10 y de la línea de fibroblastos L929 a MATRIGEL durante 1 o 2 horas de cultivo.

2.5. Determinación de moléculas de superficie: CD44, ICAM-1, RIL-2 α , RIL-2 β y VLA-4

2.5.1. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta

Para realizar el inmunoensayo se emplean células del melanoma murino B16F1 o B16F10 control y además, otras que han recibido tratamientos con IL-2, IL-6, CsA, TNF- α . Este tratamiento previo se puede hacer bien en macroplacas de 24 pocillos, o bien en frascos de cultivo de 25 cm³. En ambos casos, se siembran las células y se dejan incubar en la estufa un tiempo para que se adhieran. Tras lo cual (2-4 h), se retira un volumen de medio, que es equivalente al volumen que vamos a añadir conteniendo los tratamientos. Se vuelven a dejar incubar en la estufa el tiempo que dure el tratamiento (24, 48 o 72 h.). Hay que tener en cuenta que, por cada muestra se necesitan para realizar el inmunoensayo 2,5 x 10⁵ céls y que cada muestra se compone de un positivo por cada uno de los anticuerpos que se testan y de su correspondiente negativo. Antes de empezar con el inmunoensayo se puede recoger los sobrenadantes de los cultivos que se centrifugan 10 min a 2.500 rpm a 4°C y se almacenan en tubos tipo Eppendorf a -20°C para otros estudios.

Los tapices de células confluentes en fase de crecimiento exponencial obtenidos se disgregan con PBS-EDTA de la forma habitual. Las células así obtenidas se centrifugan y se resuspenden en PBS-BSA (0,5%). Las células resuspendidas, se cuentan usando la tinción del azul tripán. Del número total de células obtenidas, se dispensan las células a la concentración adecuada (2,5 x 10⁵ céls) en tantos tubos de vidrio de fondo cónico de 10 ml, como sea necesario para incluir en el inmunoensayo el número de muestras requerido (un tubo positivo y uno negativo por cada variable en estudio). Los tubos se centrifugan 5 min a 1.500 rpm a 4°C y se deja las pastillas secas. A partir de ahora, los tubos se mantienen en hielo picado y además, la centrifuga permanecerá cerrada para mantenerse a 4°C.

Mientras se está haciendo los lavados de las células, se preparan las diluciones de los anticuerpos: CD44 (1 : 20), ICAM-1, RIL-2 α , RIL-2 β y VLA-4 (1 : 10). Es necesario disponer de 50 μ l de cada anticuerpo para cada tubo de muestra positivo. Tras el lavado, se procede a la incubación con el primer anticuerpo. Para ello, se añaden 50 μ l del anticuerpo a cada pastilla celular de los tubos positivos, que se resuspenden muy suavemente y se dejan incubar durante 30 min. a 4°C. Al mismo tiempo, se añaden 50 μ l de PBS-BSA a los tubos negativos. Transcurrido el tiempo de incubación, se hacen 2 lavados a todos los tubos, añadiendo 1 ml de PBS-BSA, a 1.500 rpm a 4°C durante 5 min.

Mientras se hacen los lavados se prepara el 2° anticuerpo. Se preparan 50 µl/muestra, (1 : 30) en PBS-BSA, se protege el tubo tipo Eppendorf de la luz con papel de aluminio.

Tras el último lavado, se procede a la incubación con el 2° anticuerpo (Ig G-FITC). Se añaden 50 µl del anticuerpo a todos los tubos, que se resuspenden muy suavemente y se incuban durante 30 min a 4°C en oscuridad (se tapa con papel de aluminio). Tras finalizar el tiempo de incubación, se hacen 3 lavados de todos los tubos con 1 ml de PBS-BSA, a 1.500 rpm a 4°C durante 5 min. Tras el último lavado, se hace la fijación resuspendiendo cada muestra en 500 µl de formol al 1% en tubos tipo Eppendorf. Se guardan a 4°C, rotulados y cubiertos con papel de aluminio hasta que se lleven al citómetro de flujo. Para analizar las muestras en dicho equipo, el contenido de cada tubo tipo Eppendorf se depositó en un tubo EPICS (Disposable Test Tubes PS 12 mm diameter) (AFORA) que se agitaran de nuevo muy bien para evitar la presencia de acúmulos o grumos indeseados. Por último, se pasaron todas las muestras por el citómetro de flujo.

2.5.2. Análisis mediante citometría de flujo

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo EPICS ELITE ESP (Coulter Electronics Inc.) provisto de un cañón laser INNOVA COHERENT de Argón, ajustado a 250 mW y 488 nm. De cada muestra se tomaron datos de un total de 10.000 células. Los resultados se analizaron mediante el paquete informático Win MDI 2.8 (Scripps Research Institute). La fluorescencia verde emitida por FITC se recogió a 525 nm. La señal fue objeto de amplificación logarítmica para poder ser procesada correctamente y se ajustaron las “ventanas” de análisis para discriminar células muertas o artefactos.

Los parámetros que se escogieron para todas las muestras son FALS (Forward Angle Light Scatter) para determinar el índice de tamaño celular y la intensidad de fluorescencia verde, tanto en escala lineal como logarítmica e ISS (Integrated Side Scatter) para la dispersión lateral. Los resultados se expresan como intensidad de fluorescencia en presencia del anticuerpo menos la intensidad en su ausencia (fluorescencia inespecífica).

Los resultados obtenidos del paquete informático Win MDI 2.8 se expresan como porcentaje de positividad celular, que se determina fijando el valor mínimo por encima de la fluorescencia inespecífica.

2.5.3. Microscopía de inmunofluorescencia

Para llevar a cabo el ensayo de inmunofluorescencia las células se cultivan en cámaras de cultivos celulares asociadas a portaobjetos (portaobjetos provistos de camarillas desechables (Tissue Culture Chambers Slide, Nunc) (Figura 5). En este caso, se siembran células B16 o L929 a una concentración de 2×10^4 cél/pocillo en un volumen de 500 μ l de medio de cultivo suplementados con 10% SBF. Seguidamente, se deja incubar en la estufa los portaobjetos 24 h para obtener tapices celulares confluentes.

Para comenzar el inmunoensayo con las células obtenidas, se lava los cultivos 2 veces con 500 μ l de PBS templado y se fija las células en etanol 70%, a -20°C durante 30 min. A continuación, se retira el fijador lavando tres veces con 1 ml/pocillo de PBS y se procede a la incubación con el anticuerpo; VLA-4 (1 : 10) o CD44 (1 : 20) preparados en PBS 0,5% BSA-0,1% azida sódica, en un volumen de 200 μ l/pocillo y se incuba 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación, se retira el exceso de anticuerpo lavando los pocillos 3 veces con 1 ml de PBS-BSA-0,5%-0,1% azida sódica.

Por último, se desmonta la carcasa de las camarillas con ayuda de un punzón. Se deja secar el portaobjetos y se hace el montaje para microscopía añadiendo medio de montaje (Fluomount-G). Tras lo cual, se coloca un cubre bien limpio sobre el portaobjetos, que se sella añadiendo en los extremos unas gotas de esmalte de uñas. A continuación, se estudian al microscopio de fluorescencia Leica (LEITZ DMRB).

2.6. Capacidad clonogénica: formación de colonias

La formación de colonias, se basa en la siembra de células a diluciones límite y la formación de colonias a partir de una sola célula. Se realiza utilizando las células de frascos de cultivo en crecimiento exponencial o de frascos de cultivo con pretratamientos realizados como se describe en el apdo. 2.7. de Materiales y Métodos. Es muy importante que el tapiz se disgregue muy bien, para obtener células aisladas y evitar la formación de grumos de células.

En una primera aproximación, se sembró el mismo número de células B16F1 y B16F10 en placas Petri (Nunc) y se dejaron crecer en la estufa durante 1 semana. Para cuantificar el número de colonias generadas, se realizó una tinción violeta 0,2% en etanol 2% y formol 4%. En la Figura 7 se observa que este sistema no resultó viable, debido a que las células B16F10 (Figura 7A) proliferan a mayor velocidad que las células B16F1 (Figura 7B) y las colonias confluyen, imposibilitando la cuantificación del número de colonias e impidiendo la realización de estudios simultáneos de capacidad de formación de colonias en las células del melanoma B16F1 y B16F10. A continuación, se intentó emplear otros tipos de recipientes de cultivo. Se eligió utilizar microplacas de 96 pocillos (Falcon) y macroplacas de 24 pocillos (Falcon). Se sembró células B16F10 y se realizó el ensayo de formación de colonias. En la Figura 7C se observa que las dimensiones de las microplacas de 96 pocillos no son adecuadas para realizar este ensayo. Por ello, se decidió utilizar macroplacas de 24 pocillos de fondo plano (Falcon) en todos los ensayos de formación de colonias (Figura 7D).

Una vez elegido el recipiente de cultivo adecuado, se realizó el ensayo utilizando tapices celulares confluentes de células en fase de crecimiento exponencial. Para disgregar las células se emplea PBS-EDTA o EDTA-Tripsina (según se trate de la línea celular B16 o L929 respectivamente) que se incuba 5 min en la estufa. A continuación, las células se resuspenden en medio y se centrifugan 5 min a 1.500 rpm a 4°C. La pastilla celular obtenida se resuspende de nuevo en medio y se cuentan las células empleando azul Tripán. Para sembrar la macroplaca de 24 pocillos se necesita una concentración de 1×10^6 células y con una alícuota de esta concentración, se prepara una solución celular de una concentración intermedia y a partir de ésta, se prepara la solución celular definitiva con DMEM suplementado con SBF y se agita mucho. Es muy importante agitar muy bien todas las soluciones celulares que se realicen, para que las células queden individualizadas y distribuidas lo más homogéneamente posible.

A continuación, se siembran las células en una macroplaca de 24 pocillos en un volumen de 1 ml (100 células B16F10 por pocillo o 200 células B16F1 por pocillo). Una vez sembrada la macroplaca se agita toda ella con cuidado sobre una superficie lisa y se incuba 7 días en la estufa en las condiciones habituales. Para realizar tratamientos con TNF- α y C₂-ceramida, a las 4-6 h de sembrar la macroplaca, se retira el volumen de medio equivalente, al volumen que va a contener el TNF- α en las diluciones siguientes: 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 pg/ml o la ceramida (C₂): 50, 40, 25, 10, 5 μ M. Se añaden los tratamientos y se agita sobre una superficie plana. Por último, se deja incubar las placas una semana en la estufa.

Para finalizar el ensayo, se tiñen las colonias que han crecido para lo cual se lavan los pocillos 2 veces con PBS templado y se retira el contenido de los mismos de un golpe seco de muñeca. La macroplaca se deja secar un poco sobre un papel de filtro, tras lo cual se añade a cada pocillo 4 gotas de cristal violeta 0,2% en etanol 2% y formol 4% y se deja teñir a temperatura ambiente 15 minutos. Para lavar se decanta la macroplaca de un golpe seco y se elimina el exceso de colorante, lavando con agua del grifo con cuidado. Luego, se deja secar la macroplaca toda la noche boca abajo sobre un papel de filtro. Por último, se cuantifican las colonias que hay en todos los pocillos (Figura 7E). Para ello, se cuentan las colonias que presentan un número de células mayor que 50 utilizando un microscopio invertido (ZEISS Axiovert 25) (Figura 7F).

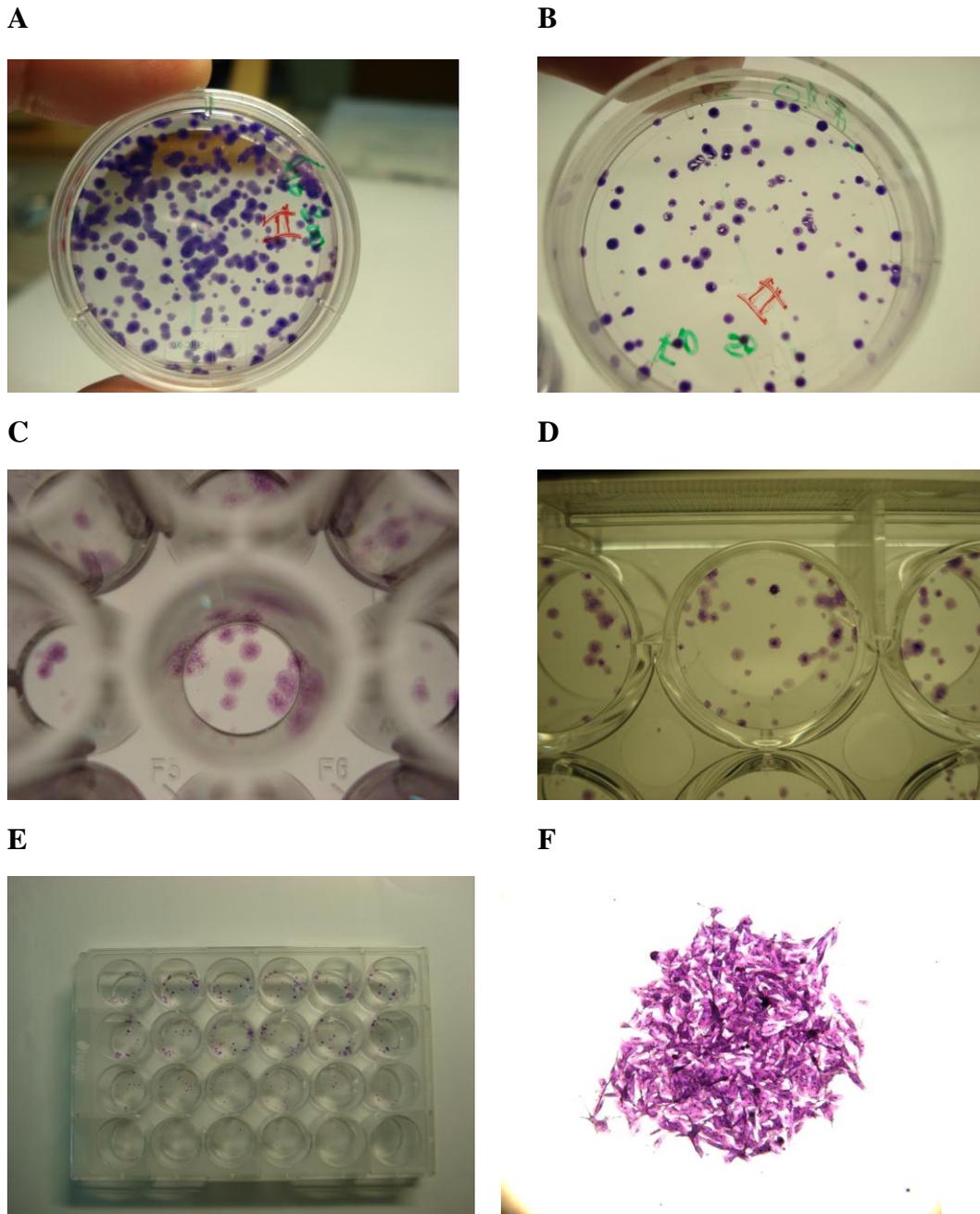


Figura 7. Ensayo de capacidad clonogénica en distintos recipientes de cultivo.

(A) Colonias de células del melanoma B16F10 en placas Petri. (B) Colonias de células del melanoma B16F1 en placas Petri. (C) Colonias de células del melanoma B16F10 en microplacas de 96 pocillos. (D) Colonias de células del melanoma B16F10 en macroplacas de 24 pocillos. (E) Placa de 24 pocillos de un ensayo de formación de colonias con células B16F10. (F) Detalle de una colonia 40x. Imagen obtenida mediante un microscopio invertido ZEISS Axiovert 25. Las colonias se visualizaron con una tinción de cristal violeta.

2.7. Estudio de la actividad proliferativa celular: ensayo de XTT

Para analizar la capacidad de proliferación se siembra una microplaca de 96 pocillos con células del melanoma B16F1 o células B16F10 en fase de crecimiento exponencial, o con células que proceden de pretratamientos. En este caso, previamente se cultivan células B16F1 o B16F10 en crecimiento exponencial en frascos de cultivo de 25 cm³, con DMEM y 10% de SBF como medio de cultivo. A las 4 h se retira el medio y se sustituye por medio nuevo que contiene uno de los tratamientos IL-2 (500 U/ml) o IL-6 (1.000 U/ml). Se dejan incubar los frascos en la estufa 24 h si el tratamiento se hace con IL-2 y 48 h si el tratamiento se realiza para la IL-6, que son los tiempos en los que experimentalmente se ha observado un claro efecto de estos factores.

Para realizar una proliferación de entre 1-5 días, en ambas sublíneas celulares, el número de células a sembrar oscila entre 1×10^3 - 2×10^4 céls/pocillo en un volumen de 100 µl de medio, suplementado con SBF al 1% y al 10% para la otra solución celular. A las 4 h de la siembra, se trata la placa con TNF- α a varias concentraciones (5×10^5 pg/ml, 5×10^4 pg/ml, 5×10^3 pg/ml) o con C₂-ceramida: 50, 40, 25, 10, 5 µM, en un volumen de 100 µl, que en todos los casos están preparados con DMEM al 1% de SBF. En los pocillos control se añade 100 µl de DMEM al 1% de SBF. Para evitar la evaporación de la placa durante la incubación en la estufa, se añade a todos los pocillos del borde de la placa 200 µl de medio. Se deja incubar la placa en la estufa el tiempo de tratamiento (1-5 días).

Por último, se revela la placa. Para ello, se retira 50 µl de todos los pocillos y se añade en todos los pocillos 50 µl de solución de XTT, preparada mezclando los reactivos A (reactivo XTT) y B (reactivo de acoplamiento electrónico) del Kit comercial de XTT justo antes de añadirse. El método se basa en el cambio o transformación de la sal tetrazolium XTT (de color amarillo) a formazan (de color naranja) ligada a la actividad mitocondrial de las células vivas. Fruto de ésta reacción se obtiene un color naranja intenso que nos cuantifica el espectrofotómetro. Para ello, se incuba la placa con el XTT durante 4 h en la estufa. Finalizado el tiempo de la incubación, se mide la absorbancia a 490 nm y a 620 nm en el espectrofotómetro (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC ELx800).

2.8. Ciclo celular: marcaje con yoduro de propidio

Para llevar a cabo el estudio del ciclo celular, las células cultivadas en estado de confluencia se disgregan con PBS-EDTA o con EDTA-Tripsina según la línea celular, tras ello se centrifugan y se cuentan usando la tinción del Azul Tripán. Es importante que las células queden bien disgregadas sin formar grumos. Se separa 1×10^6 células y se lavan en 5 ml de PBS, 5 min, 1.500 rpm a 4°C. A continuación, se permeabilizan las membranas. Para ello, se retira el medio y sin resuspender se agita en el vortex la pastilla celular durante 10 segundos. A continuación, se sigue agitando a la vez que se va añadiendo 1 ml de etanol 70% frío (-20°C) gota a gota. Tras hacer esto, se debe mantener las muestras a 4°C en oscuridad hasta que las células se tiñan. Es recomendable un tiempo mínimo de fijación de 24 h.

Transcurrido el periodo de fijación, para realizar la tinción se agitan las células en etanol en el vortex y se centrifugan a 3.000 rpm, 5 min a 4°C. Seguidamente, se retira el etanol y se vuelve a agitar en el vortex. Al finalizar la agitación, se hace el marcaje de las muestras con yoduro de propidio (IP). La tinción consiste en añadir a cada muestra 1 ml de PBS conteniendo 100 U de RNasa y 50 µg de yoduro de propidio. Las células así teñidas se incuban durante 24 h como mínimo, manteniendo las muestras a 4°C y protegidas de la luz hasta el momento de su análisis en el citómetro de flujo. Para realizar la medida, las muestras se colocan en tubos EPICS (Disposable Test Tubes PS 12 mm diameter) (AFORA) que se agitaran de nuevo muy bien para evitar la presencia de acúmulos o grumos indeseados. Por último, se pasaron todas las muestras por el citómetro de flujo.

2.8.1. Análisis mediante citometría de flujo

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo EPICS ELITE ESP (Coulter Electronics Inc.) provisto de un cañón laser INNOVA COHERENT de Argón, ajustado a 250 mW y 488 nm. De cada muestra se tomaron datos de un total de 10.000 células. Los resultados se analizaron mediante el paquete informático Win MDI 2.8 (Scripps Research Institute) (Figura 8). La fluorescencia roja emitida por yoduro de propidio se recogió a una señal de >600 nm, en escala lineal (IRFL) que es proporcional a la cantidad de DNA. Para poder ser procesadas correctamente se ajustó las “ventanas” de análisis para discriminar células muertas o artefactos.

Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de positividad celular, que se determina fijando el valor mínimo por encima de la fluorescencia inespecífica. Como ejemplo, en la Tabla 2 se recogen los porcentajes de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular.

Tabla 2. Ciclo celular de las células del melanoma B16.

Tipo células	Tiempo de cultivo	Ciclo celular			
		Apoptosis	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M
B16F1 (10% SBF)	4 días	0,6	70	16	12
	5 días	2	90	3	5
B16F10 (10% SBF)	3 días	0,6	62	21	15
	4 días	0,8	74	10	14
	5 días	1,4	81	8,4	8,1
B16F10 (1% SBF)	3 días	6	66	18	8
	4 días	3	62	19	14
	5 días	2	69	14	12

Las células del melanoma B16 se cultivaron al 1% SBF y 10% de SBF. Se fijaron en etanol y se realizó la tinción con yoduro de propidio. La cuantificación se determinó mediante análisis por citometría de flujo. Los resultados se expresan como porcentaje de células que se encontrarían en cada fase del ciclo celular.

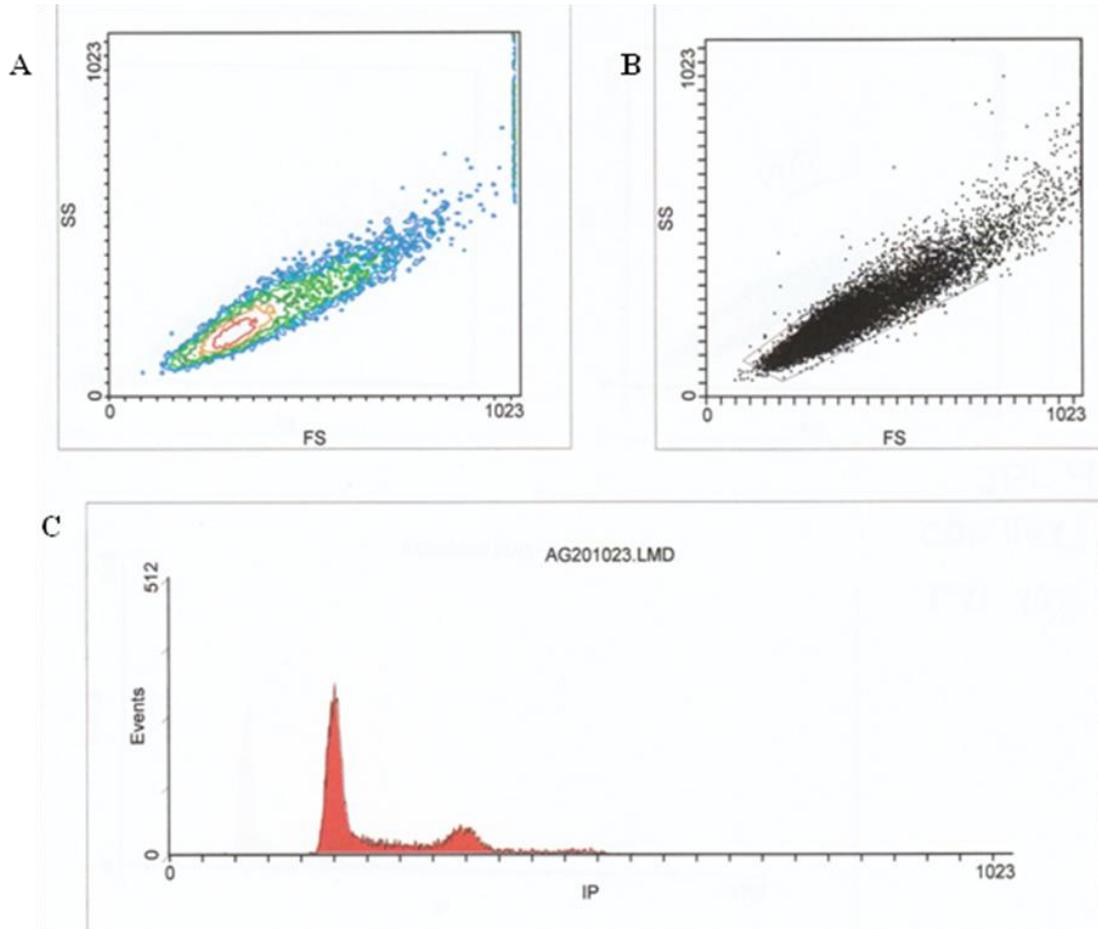


Figura 8. Citometría de flujo de células del melanoma B16F10 marcadas con yoduro de propidio (IP).

(A) Histograma biparamétrico de contornos de nivel. (B) Histograma biparamétrico de nube de puntos. (C) Histograma monoparamétrico de intensidad de fluorescencia en escala logarítmica. Las imágenes se obtuvieron mediante análisis de los datos con el paquete informático Win MDI 2.8 (Scripps Research Institute) y digitalización a tamaño real mediante un escáner.

2.9. Producción de IL-2: ensayo biológico con las células CTLL-2

El ensayo biológico se utiliza habitualmente para cuantificar la IL-2 activa, presente en un sobrenadante obtenido a partir de un cultivo celular. Se basa en la dependencia exclusiva de la presencia de IL-2, que presentan ciertas líneas tumorales de linfocitos T citotóxicos (CTLL-2) (Figura 9A) para su proliferación (Gillis y cols., 1977). Estas células tienen como requisito imprescindible para su mantenimiento un aporte exógeno de IL-2 al medio de cultivo. La carencia de este factor determina la muerte de todas las células del cultivo en un período de 24 h. Además, hasta llegar a un cierto umbral de concentración, la tasa de proliferación celular es proporcional a la cantidad de IL-2 presente en el medio.

Previamente a realizar el ensayo biológico con las células CTLL-2, se prepara la recta patrón de producción de IL-2. Para ello, se preparan una serie de pocillos con concentraciones conocidas de rhIL-2 y sin rhIL-2. Por triplicado, se añade a cada pocillo 100 μ l de DMEN-10% SBF con 25/ 12,5/ 6,2/ 3,1/ 1,5/ 0,75/0,3/ 0 U/ml de rhIL-2. Se deja un par de pocillos como blanco, añadiendo a cada uno 100 μ l de DMEN al 10% de SBF + 100 μ l de RPMI 10% SBF, Glutamina 2mM, 2-mercaptoetanol (5×10^5 M). Con el blanco se elimina la inespecificidad del medio de cultivo sin células. Con los valores obtenidos, se construye la recta patrón de producción de IL-2 (Figura 9B).

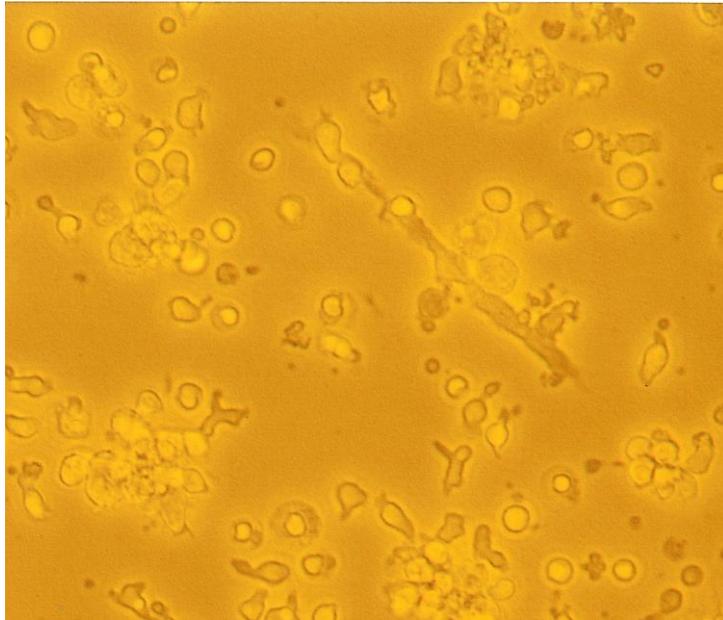
Para realizar el ensayo biológico, se disgrega un cultivo de células B16 (células diana) con EDTA del modo habitual, se centrifugar las células en DMEM y se resuspende la pastilla celular en 1 ml de medio RPMI-1640 (suplementado con HEPES, Glutamina y 2-ME). Se cuentan las células y se ajusta la concentración celular. Se debe preparar tantas soluciones celulares, como número de variables distintas se posea. En este caso 2: células control y células tratadas con TNF- α (5×10^4 pg/ml). Se siembra una microplaca de 96 pocillos con 5×10^3 cél/poc en medio RPMI, suplementado con SBF y se deja incubar en la estufa 24 h.

Se debe sembrar una microplaca de 96 pocillos para cada tiempo que se vaya a testar (4, 24, 48 h). Al día siguiente, se lava 3 veces con RPMI un cultivo de células CTLL-2 que se han disgregado y centrifugado a 1.500 rpm, durante 5 min, 4°C. La pastilla celular obtenida, se resuspende en medio de cultivo RPMI suplementado con SBF. Se preparan las diluciones celulares de células CTLL-2 (células efectoras) siguientes 50 : 1, 25 : 1, 10 : 1 con respecto a las células diana. Tras preparar todas las diluciones

celulares que cubran todas las proporciones anteriores, se procede a la siembra como sigue: se retira 50 μ l de medio a todos los pocillos empleando una micropipeta múltiple. Seguidamente, se añaden las células CTLL-2 en 100 μ l/poc. de medio RPMI a los pocillos correspondientes. Por último, se añade la IL-2 a una concentración de 100 U/ml (20 U/poc.) o 50 μ l de medio y se deja incubar la microplaca a los tiempos determinados.

Para revelar el ensayo, se realiza una tinción con cristal violeta. Para ello, se lava la microplaca de 96 pocillos con PBS templado 2 veces. Se vuelca de un golpe seco de muñeca y se deja secar un poco sobre un papel de filtro. Una vez seca, se añade a cada pocillo con una pipeta Pasteur de plástico, 4 gotas de cristal violeta 0,2% en etanol 2% y formol 4% y se deja teñir a temperatura ambiente 15 minutos. Para lavar, se decanta la microplaca de un golpe seco y se elimina el exceso de colorante, lavando con agua del grifo con cuidado. Luego, se deja secar la microplaca toda la noche boca abajo sobre un papel de filtro. Al día siguiente, para realizar la medida en el espectrofotómetro, se solubiliza la placa añadiendo a cada pocillo 100 μ l de etanol 100%. A continuación, se efectúa la lectura en el espectrofotómetro a 540 nm (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC ELx800). Para cuantificar, se comparan los datos de absorbancia con la recta patrón de producción de IL-2.

A



B

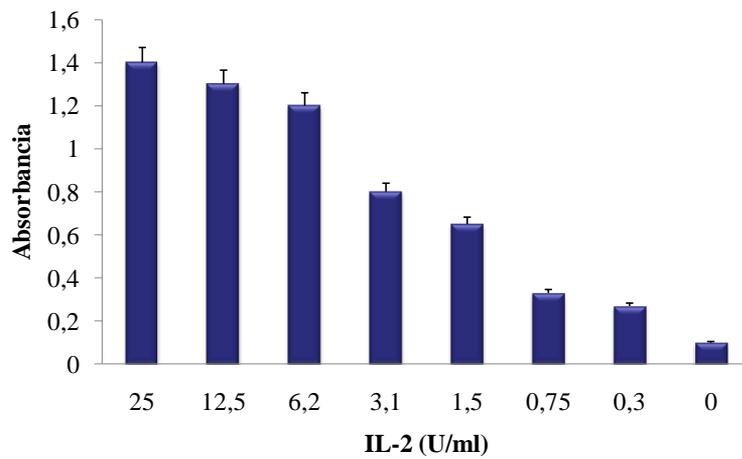


Figura 9. Bioensayo para la determinación de IL-2.

(A) Cultivo de células CTLL-2. (B) Curva patrón de la producción de IL-2. Imagen obtenida mediante un microscopio invertido ZEISS Axiovert 25.

2.10. Producción de IL-6: inmunoensayo enzimático (kit comercial de la IL-6)

Para realizar el inmunoensayo se parte de una muestra amplia de sobrenadantes, los cuales, proceden de líneas celulares distintas que han sido sometidas a tratamientos diversos y a condiciones de cultivo diferentes (apdo. 2.11.1). El objetivo de este inmunoensayo enzimático es detectar si alguna de estas muestras es capaz por sí misma, o inducida por algún factor de provocar la síntesis de IL-6 en líneas que previamente carecían de esta capacidad.

En primer lugar, se procede a descongelar los sobrenadantes, se rotulan y se ordenan convenientemente. Seguidamente, se prepara el Standard y las diluciones. En la microplaca que contiene el Kit (Figura 10A) se montan las tiras de pocillos necesarias para alojar el número de muestras que se desea testar. A continuación, se añade 50 μ l de Assay Diluent a todos los pocillos. Tras esto, se añade 50 μ l del sobrenadante en los pocillos correspondientes (por duplicado) y 50 μ l de la dilución correspondiente de IL-6 preparadas en el Standard. Todo este proceso previo viene a durar aproximadamente 1 h 30 min.

Una vez finalizada la fase previa, se incuba 2 h. a temperatura ambiente, protegiendo la microplaca con un film para evitar la evaporación. A continuación se retira 100 μ l de medio de todos los pocillos y se lavan 5 veces con 380 μ l/pocillo con tampón de lavado. El tampón de lavado se prepara con 25 ml de solución comercial y 600 ml de agua destilada. Mientras se hacen los lavados, se prepara el conjugado añadiendo 11 ml diluido más 0,5 ml de conjugado. Tras los lavados, se añade 100 μ l de conjugado a todos los pocillos y se deja incubar la placa 2 horas protegida de nuevo con un film, para evitar la evaporación.

Tras la incubación, se vuelve a hacer 5 lavados con tampón de lavado (380 μ l/pocillo) del mismo modo que los anteriores. Mientras se hacen los lavados, se prepara el sustrato mezclando 5 ml de solución A y 5 ml de solución B. Una vez preparado, se añade 100 μ l de sustrato a los pocillos y se deja incubar 30 min. Para finalizar la reacción, se añade 100 μ l de solución Stop (ácido sulfúrico) a todos los pocillos. La lectura de la microplaca se realiza en el espectrofotómetro (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC ELx800) a 450 nm de longitud de onda. Antes de esto, ya podemos determinar “de visu” el resultado del test. Así, los pocillos que presenten un color azul claro, son los positivos del test. Los demás pocillos exhiben un color amarillo, son los negativos del test de la IL-6.

La cuantificación de los datos, se hace por comparación con la curva de producción de IL-6 (Figura 10B).

A



B

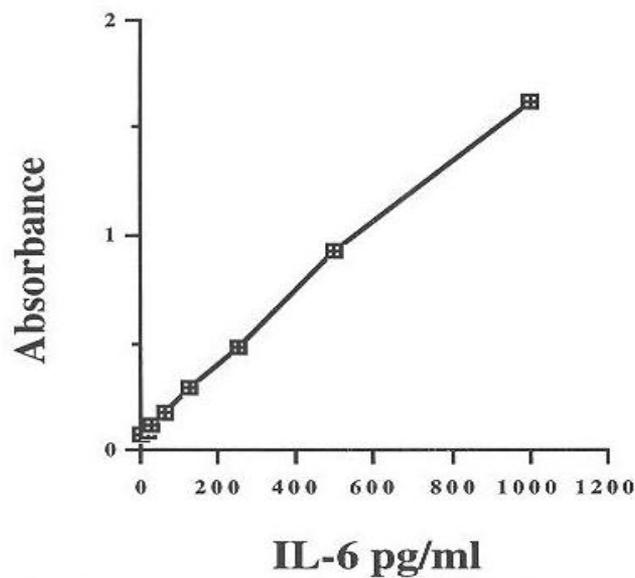


Figura 10. Inmunoensayo enzimático para la determinación de IL-6.
(A) Kit comercial de IL-6. (B) Curva patrón de la producción de IL-6.

2.11. Producción de TNF- α

2.11.1. Obtención de sobrenadantes

Para llevar a cabo el estudio de la producción de dicha citocina, se cultivan las células del modo habitual, en medio: DMEM, suplementado con SBF para las células del melanoma murino B16 y con DMEM-Penicilina, suplementado con SBF para la línea de fibroblastos L929 (Figura 11A). Las células pueden así mismo provenir de tratamientos con diversos factores (IL-2, IL-6, CsA, TNF- α , etc.) a diversos tiempos de exposición al tratamiento, pero también de otras experiencias, como deprivaciones de SBF o cultivos sobrecrecidos entre otras.

Para la obtención de los sobrenadantes (SB) se debe recoger de los frascos de cultivo o de las macroplacas, el medio que contienen y seguidamente se procede a centrifugarlo a 2.500 rpm, 10 min, a 4°C. Una vez centrifugados se recoge la fracción líquida en tubos tipo Eppendorf rotulados a razón de 1 ml/vial y tantos viales como se desee para cada muestra. Los viales se almacenan a -20°C, hasta que se utilicen.

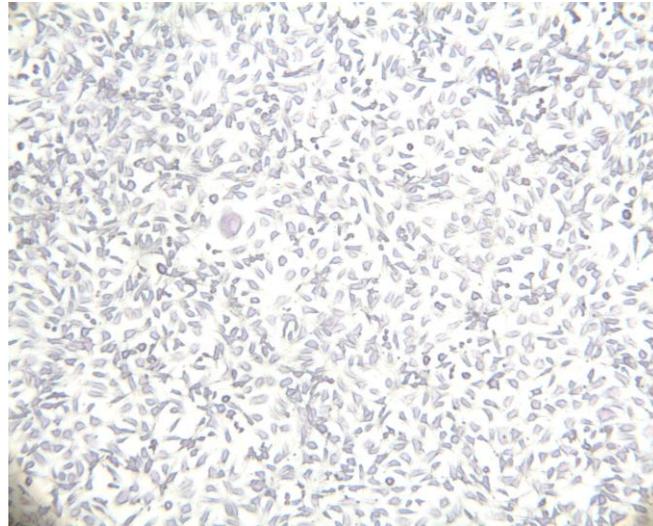
2.11.2. Determinación del contenido en TNF- α : Bioensayo con células L929

Para llevar a cabo el bioensayo, en una microplaca de 96 pocillos se cultivan fibroblastos L929 en 100 μ l de DMEM suplementados con 10% de SBF. Se siembra 40.000 cél/pocillo y se dejan incubando hasta el día siguiente para que alcancen la confluencia. Una vez alcanzada la monocapa homogénea en todos los pocillos, se añade a todos los pocillos la actinomicina-D a una dilución de entre 1-8 μ g/ml, se suele hacer cada muestra por duplicado y se añaden los sobrenadantes que se desea testar. Se dejan varios pocillos controles. Unos sólo llevan actinomicina-D y células (control -) y en otros se añade TNF- α a varias concentraciones (control +). Tras esto se incuba la placa 24 h en la estufa a 37°C y con 5% de CO₂ en atmósfera húmeda.

Al día siguiente de la siembra, se observa la microplaca con un microscopio invertido. Luego, se lava dos veces con PBS templado, se vuelca de un golpe y se deja secar. Para finalizar, se tiñen todos los pocillos con Cristal Violeta al 0,2% en etanol 2% y formol 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de colorante, se lava con cuidado con agua del grifo. Tras el lavado, se vuelca la placa de un sólo golpe de muñeca, tras lo cual se deja escurrir toda la noche boca abajo sobre un papel

de filtro (Figura 11B). Para realizar la medida en el espectrofotómetro, se solubiliza la placa añadiendo a cada pocillo 100 μ l de etanol 100%. A continuación, se efectúa la lectura en el espectrofotómetro a 595 nm (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC ELx800) y se compara con la curva patrón de producción de TNF- α realizada previamente con las células L929.

A



B

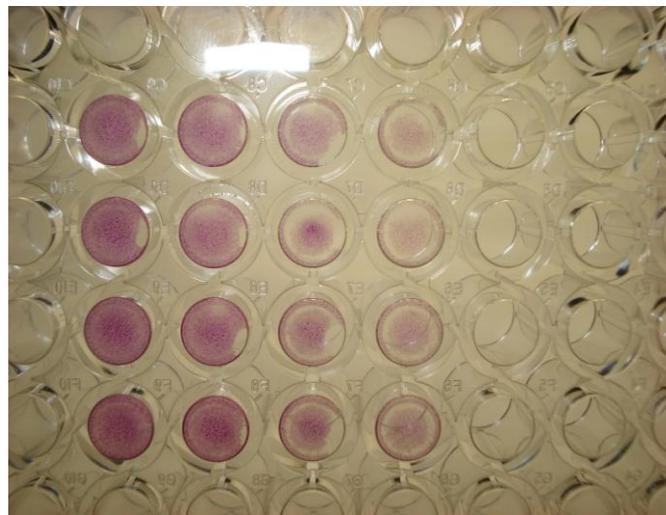


Figura 11. Bioensayo para la determinación de TNF- α .

(A) Cultivo de fibroblastos L929. (B) Placa de 96 pocillos con células B16F10 de un ensayo de producción de TNF- α . Imagen obtenida mediante tinción de cristal violeta con un microscopio invertido ZEISS Axiovert 25.

2.12. Determinación de niveles de expresión de p21^{WAF1/CIP1} mediante inmunoensayo

El inmunoensayo se inicia con 1×10^6 de células de melanoma murino B16 o L929 que pueden estar fijadas en formol-tritón previamente (o en etanol), pero es mejor hacer la fijación el día que se hace el inmunoensayo. Por cada muestra necesito disponer de un positivo y de un negativo. En primer lugar, se procede a fijar las células que no lo estén. Para ello, se mantienen en formol al 4%, 15 min, a temperatura ambiente. Tras la fijación, se lavan 3 veces en PBS a 2000 rpm, 5 min, 4°C. En el último lavado, se pasa las células desde el tubo cónico roscado de 50 ml de polipropileno (Falcon) a tubos de vidrio de fondo cónico de 10 ml, uno para el positivo y otro para el negativo para cada una de las muestras (a razón de 5×10^5 cél/muestra).

A continuación, se añade 0,5 ml de tritón X-100 al 0,1%, 5 min a temperatura ambiente. El tritón X-100 es un detergente que se emplea para permeabilizar las células. Posteriormente, se hacen 2 lavados con PBS a todas las muestras, incluidas ya las que estaban prefijadas; el último lavado se hace en PBS-BSA. Tras los lavados, se añade el p21^{WAF1/CIP1}: 40 µg/ml (2 µg/muestra), por lo cual se añade a cada tubo positivo 50 µl de solución de p21^{WAF1/CIP1} y 50 µl de PBS-BSA a los negativos. Tras hacer esto, los tubos se incuban 2 h en oscuridad.

Finalizada la fase de incubación, los tubos se lavan 2 veces con PBS-BSA. Tras la fase de lavado, se hace la incubación con el 2º anticuerpo añadiendo a todas las muestras 50 µl de Ig G-FITC (1 : 30) en PBS-BSA, durante 30 min a temperatura ambiente, pero protegidos de la luz. Una vez concluida la incubación, se lavan los tubos 3 veces con PBS-BSA. Tras ello, se depositan todas las muestras en tubos EPICS rotulados (Disposable Test Tubes PS 12 mm diameter (AFORA) con 500 µl de PBS y se llevan al citómetro de flujo EPICS ELITE ESP (Coulter Electronics Inc.) protegiendo las muestras de la luz. Es sumamente importante, agitar muy bien todas las muestras para evitar la presencia de acúmulos o grumos indeseados. Los resultados se analizan mediante el paquete informático Win MDI 2.8 (Scripps Research Institute) de modo análogo al apdo. de Materiales y Métodos 2.5.2. (Figura 12).

.

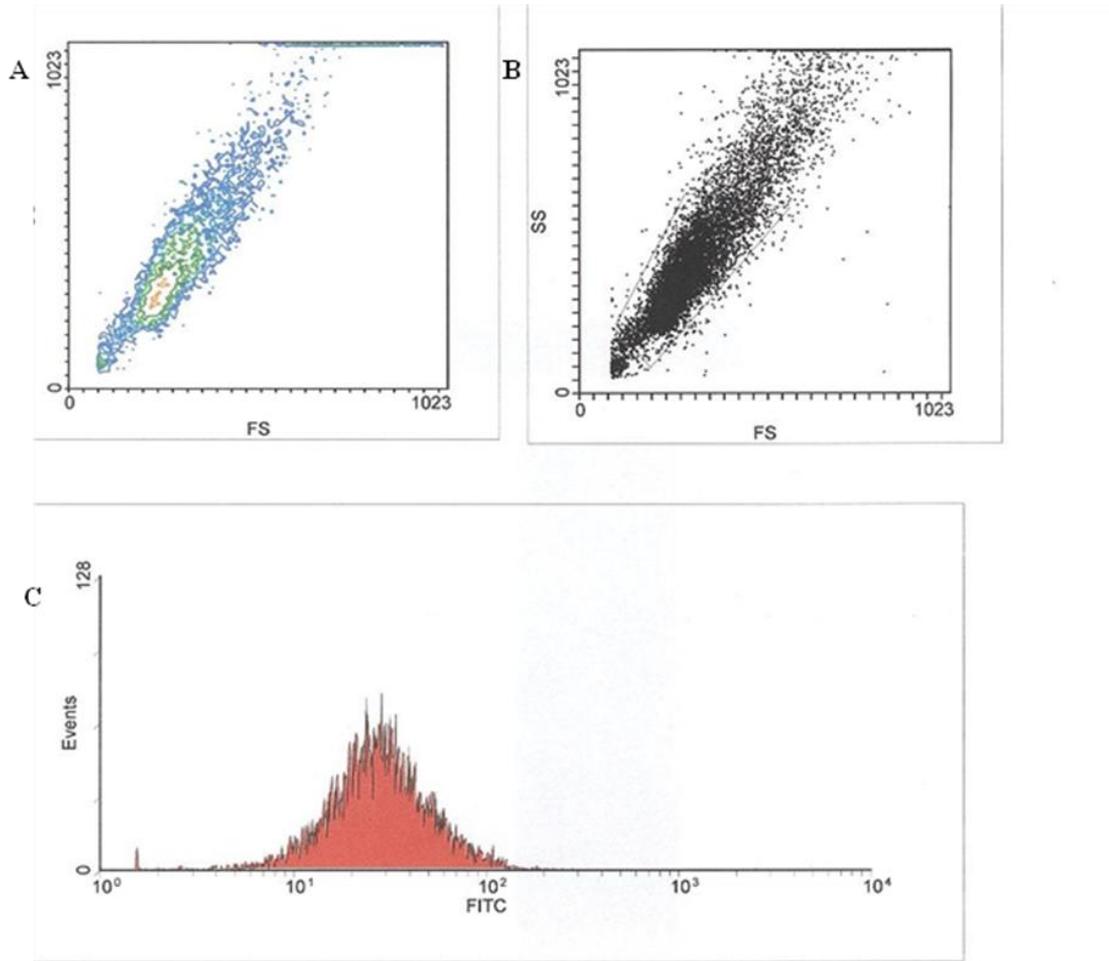


Figura 12. Citometría de flujo de células del melanoma B16F10 marcadas con p21WAF1/CIP1. (A) Histograma biparamétrico de contornos de nivel. (B) Histograma biparamétrico de nube de puntos. (C) Histograma monoparamétrico de intensidad de fluorescencia en escala logarítmica. Las imágenes se obtuvieron mediante análisis de los datos con el paquete informático Win MDI 2.8 (Scripps Research Institute) y digitalización a tamaño real mediante un escáner.

IV. RESULTADOS

1. Estudio del efecto de la IL-2 y de la IL-6 en las células del melanoma B16

Continuar con el estudio del efecto de las citocinas IL-2 e IL-6 sobre las células del melanoma B16 nos pareció interesante, debido a que el tratamiento con ambas citocinas induce un incremento de la capacidad metastática in vivo de las células B16F10. Para intentar profundizar en los mecanismos que subyacen a este efecto, se analizó la actividad de las células del melanoma B16 tratadas con la IL-2 y con la IL-6 y además, si las células del melanoma B16 eran capaces de producir dichas citocinas.

1.1. Determinación de la capacidad de invasión de las células del melanoma B16 tratadas con IL-2 e IL-6

El estudio de la capacidad invasiva de las células del melanoma murino B16 se realizó mediante un ensayo estándar de invasión utilizando matrices artificiales de matrigel, que es uno de los modelos más habituales para testar in vitro la capacidad de invasión (Ghajar y cols., 2007). A modo de ilustración, en la Figura 13A se observan células del melanoma B16 teñidas con Giemsa, que han sido capaces de invadir la capa de MATRIGEL y han atravesado los insertos de 8 μm de diámetro de poro (círculos de la imagen). Además, se observa con claridad el núcleo y la morfología elongada de las células que están en movimiento. Dicha morfología se corresponde con un movimiento invasivo de tipo mesenquimal (Yilmaz y Christofori, 2010). Por el contrario, en la Figura 13B se observan células del melanoma B16 que exhiben la morfología y la vesiculación típica de movimiento invasivo de tipo ameboide (Sahai y Marshall, 2003; Pinner y Sahai, 2008). Ambos tipos de imágenes se obtuvieron simultáneamente tanto para las células B16F1 como B16F10 (Figuras 13C y 13D). Cabe destacar que en la línea celular B16F1, predominan mucho más las imágenes de movimiento de tipo ameboide.

A continuación, se analizó el efecto del tratamiento con IL-2 e IL-6 sobre la capacidad invasiva de las células del melanoma B16. Para ello, se trataron las células B16F1 y B16F10 con 500 U/ml de IL-2 durante 24 h y 200 U/ml de IL-6 durante 48 h. Posteriormente, se realizó el ensayo de invasión y los resultados obtenidos fueron los siguientes. El tratamiento con IL-2 e IL-6 disminuye de modo significativo la capacidad de invasión de las células del melanoma B16 (Figura 14). Este efecto se observa tanto en las células del melanoma B16F1, como en las células del melanoma B16F10, siendo el tratamiento con la IL-6 el que induce una inhibición mayor en ambas líneas celulares.

Las células del melanoma B16 durante un ensayo de invasión.

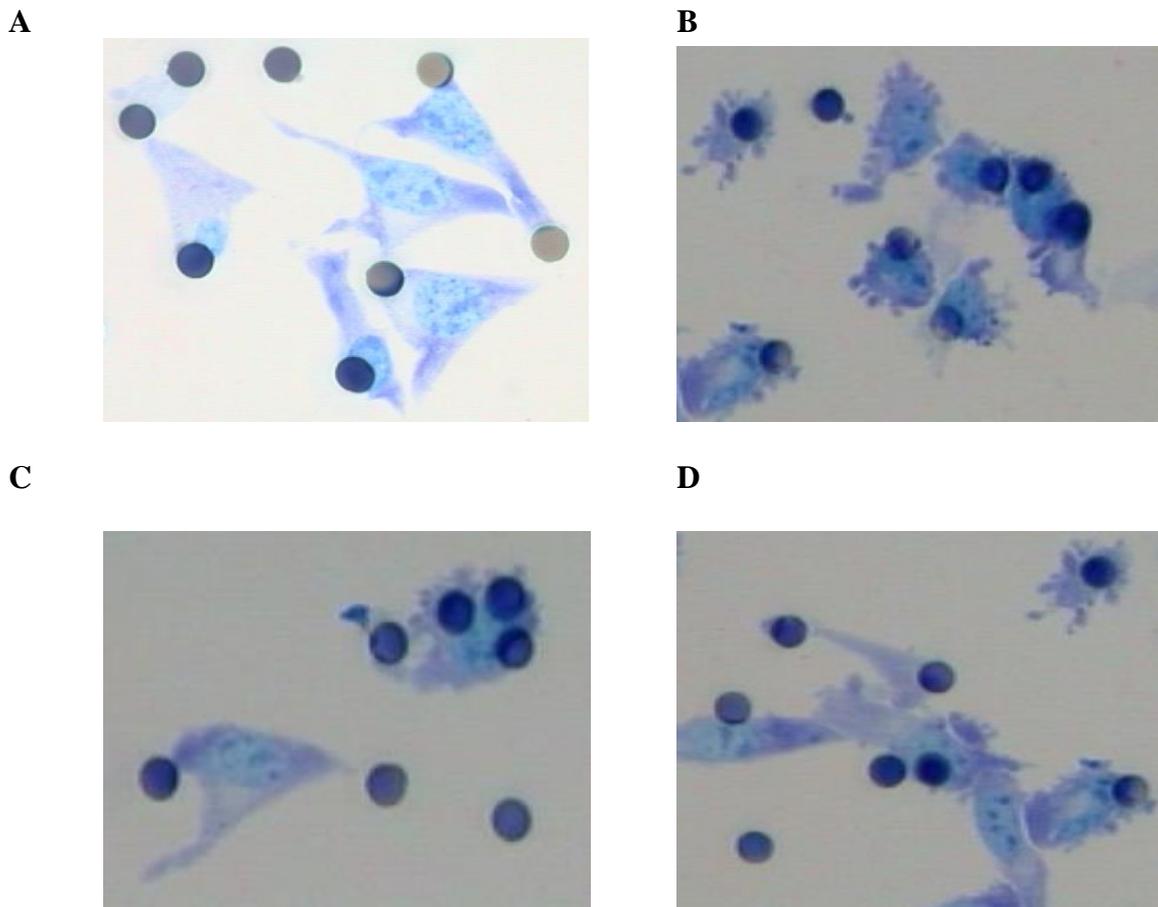


Figura 13. Ensayo de capacidad de invasión de las células del melanoma B16.
(A) Células B16 con un movimiento invasivo predominantemente de tipo mesenquimal.
(B) Células B16 con un movimiento invasivo predominantemente de tipo ameboide.
(C) y (D) Células B16 que exhiben un movimiento invasivo tanto mesenquimático como ameboide. Imágenes 200X obtenidas mediante una tinción Giemsa y visualización en un microscopio Leica (LEITZ DMRB).

IL-2 e IL-6 disminuyen la capacidad de invasión de células del melanoma B16.

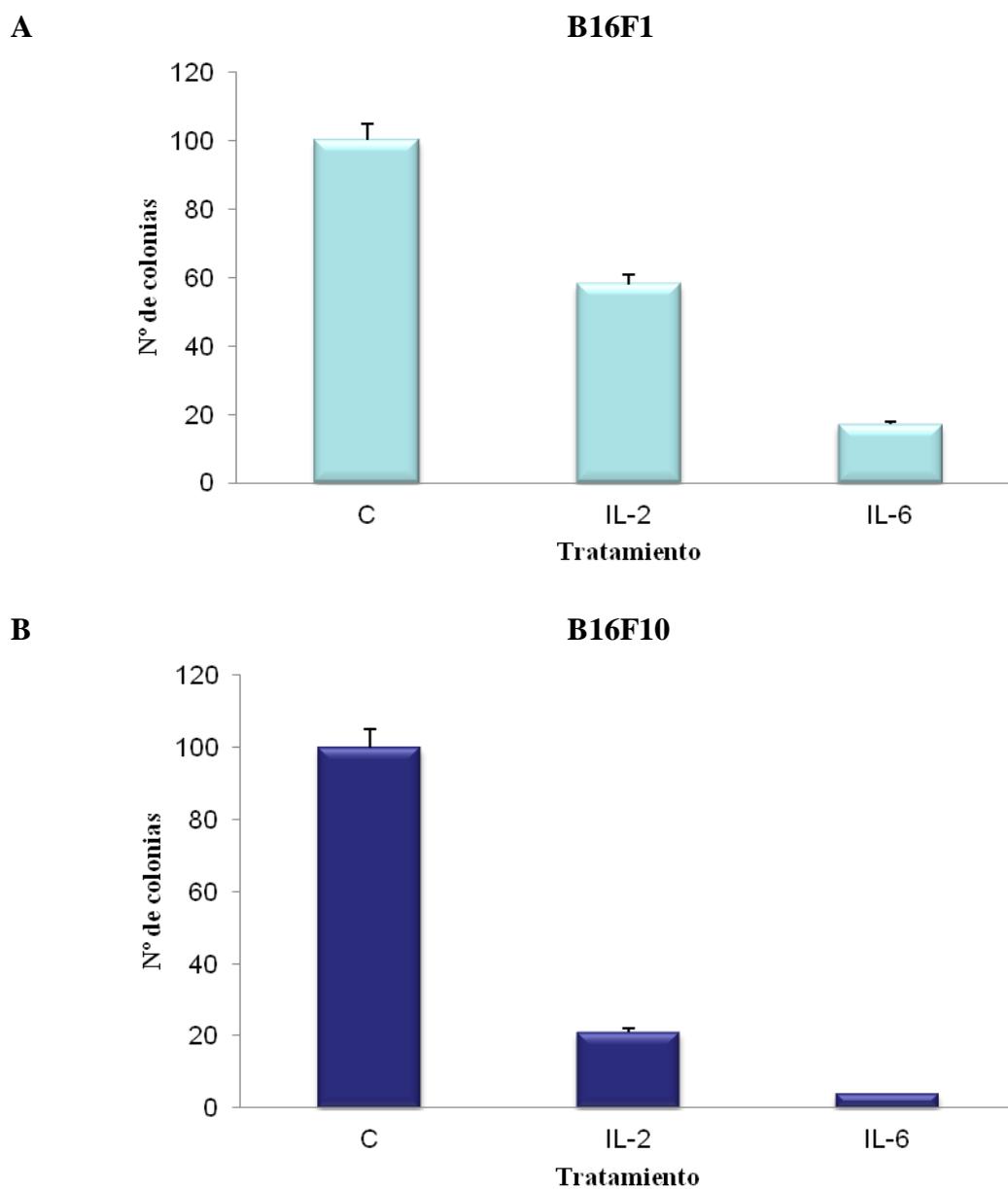


Figura 14. Capacidad de invasión de las células del melanoma B16 tratadas con IL-2 e IL-6. (A) Células B16F1. (B) Células B16F10. Las células se trataron con la IL-2 durante 24 h. y con la IL-6 durante 48 h. Posteriormente, se realizó el ensayo de capacidad de invasión.

1.2. Determinación de la capacidad de adhesión “in vitro” de las células del melanoma B16 tratadas con IL-2 e IL-6

Para realizar el estudio de adhesión, se analizó el efecto de la IL-2 y la IL-6 sobre la capacidad de adhesión de las células del melanoma murino B16. Para lo cual, se realizó el ensayo de adhesión celular en microplacas recubiertas de una capa de MATRIGEL.

El análisis de la adhesión se llevó a cabo mediante dos tipos de ensayos. Por un lado, se realizaron ensayos de adhesión a MATRIGEL “in situ” con los tratamientos de IL-2 e IL-6. En este caso, no se observan cambios significativos en la capacidad de adhesión de las células del melanoma B16 control y tratadas (Figura 15A). Por otro lado, se realizaron tratamientos de las células de melanoma B16 con 500 U/ml de IL-2 durante 24 h. y con 200 U/ml de IL-6 durante 48 h. Posteriormente, con las células así pretratadas se realizó el ensayo de adhesión a MATRIGEL. En este caso, se observa que el pretratamiento con IL-2 e IL-6 aumenta ligeramente la capacidad de adhesión de las células del melanoma B16 (Figura 15B). Ambos tipos de ensayos se realizaron con las células del melanoma B16F1 y con las células B16F10.

IL-2 e IL-6 aumentan de modo no significativo la capacidad de adhesión de las células del melanoma B16.

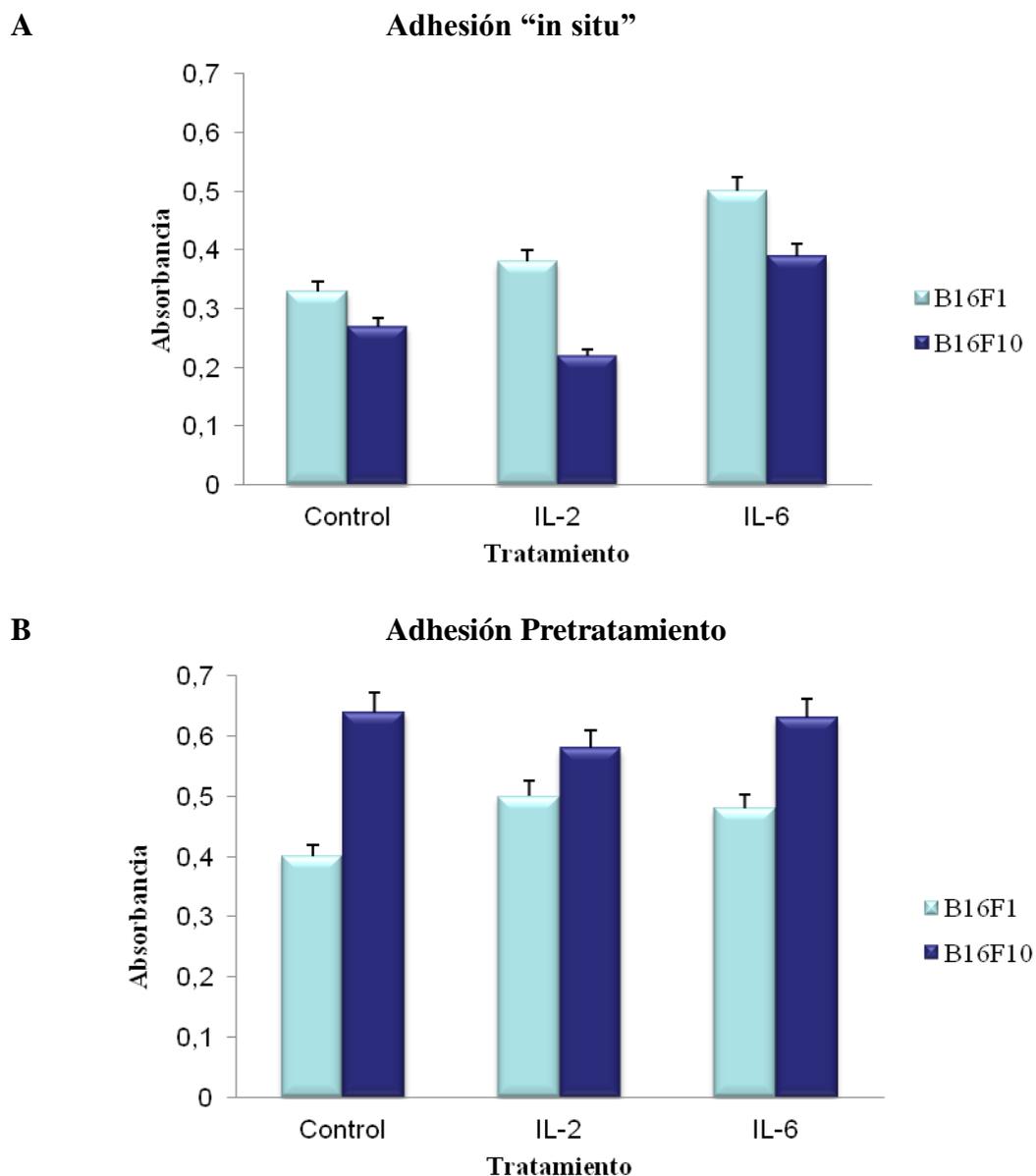


Figura 15. Capacidad de adhesión a MATRIGEL de las células del melanoma B16F1 y B16F10 tratadas con IL-2 e IL-6. (A) Tratamiento “in situ”.

(B) Pretratamiento. Las células se trataron con 500 U/ml de IL-2 durante 24 h. y 200 U/ml de IL-6 durante 48 h.

1.3. Estudio de la modulación por IL-2 de los niveles de expresión del receptor de la IL-2 (RIL-2 α , RIL-2 β) y de ICAM-1 en las células del melanoma B16

Los niveles de expresión de las moléculas de superficie se llevaron a cabo mediante ensayos de inmunofluorencencia y la cuantificación de los mismos, mediante análisis por citometría de flujo.

Para llevar a cabo este ensayo, se realizó un tratamiento con la IL-2 durante 24 h de los cultivos de las células del melanoma B16. En la Figura 16 se muestran los niveles de expresión de los receptores de la IL-2: RIL-2 α , RIL-2 β e ICAM-1 en las células CTLL-2 (control positivo de este ensayo) y en las células del melanoma B16F1. Las células CTLL-2 expresan las tres moléculas de superficie analizadas, mientras que en las células del melanoma B16F1 los niveles de expresión son mucho más bajos.

Además, se analizó el efecto del tratamiento con la IL-2 en las células del melanoma B16F1. En el caso del RIL-2 α , no se observó cambios en los niveles de expresión (datos no mostrados). También se analizó los niveles de expresión del receptor de la IL-2 (RIL-2 β) y de ICAM-1 en las células del melanoma B16F1. Se observa un pequeño porcentaje de células positivas para ambos antígenos (14% para la ICAM-1 y 8% para el RIL-2 β) en comparación con las células CTLL-2 usadas como control, que muestran unos niveles de expresión del 93% para la ICAM-1 y 22% para el RIL-2 β . Además, cuando se trata las células del melanoma B16F1 con IL-2, no se observan diferencias significativas respecto al potencial metastático de las células. Así, la expresión del RIL-2 β se incrementa ligeramente. Sin embargo, no se observan cambios significativos en los niveles de expresión de ICAM-1 (Figura 17). En las células B16F10 los resultados fueron los siguientes. El RIL-2 β aumenta de 7,5% en las células B16F10 al 13% en las células B16F10 tratadas con IL-2. En el caso de ICAM-1 no se obtuvo resultados (datos no mostrados).

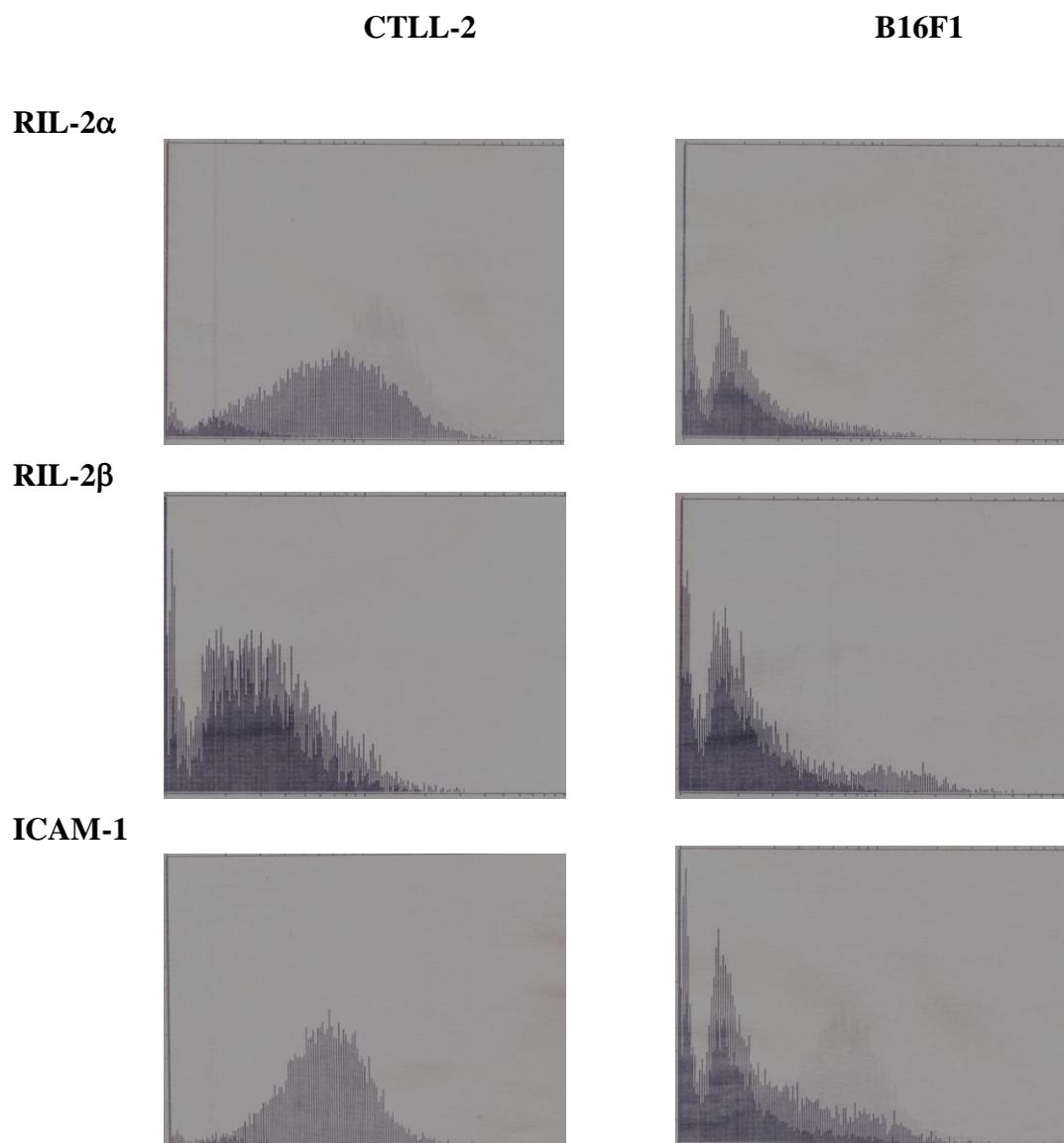
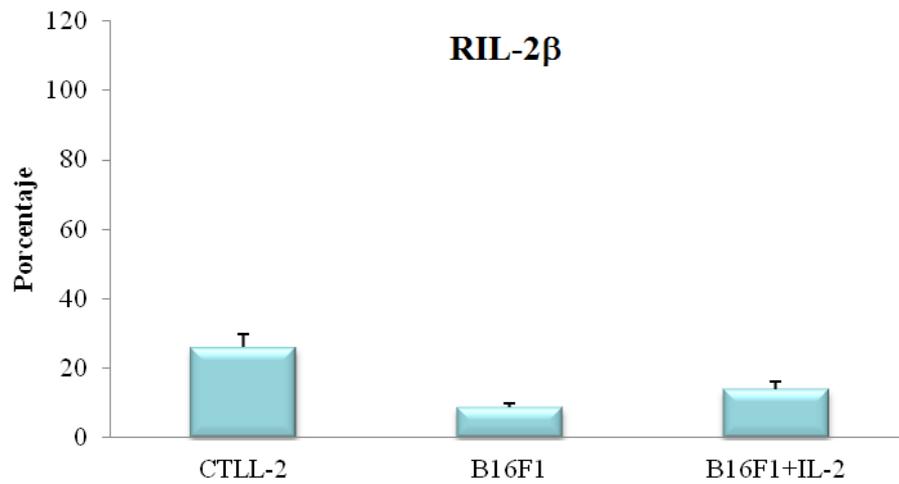
Niveles de expresión de RIL-2 α , RIL-2 β e ICAM-1.

Figura 16. Análisis de la expresión de los receptores de la IL-2: RIL-2 α , RIL-2 β e ICAM-1 en las células CTLL-2 y en las células del melanoma B16F1. Imágenes obtenidas mediante citometría de flujo y digitalización mediante un escáner.

El tratamiento con IL-2 induce un ligero incremento en los niveles de expresión del receptor de la IL-2 (RIL-2 β) pero no induce cambios significativos de ICAM-1 en las células del melanoma B16F1.

A



B

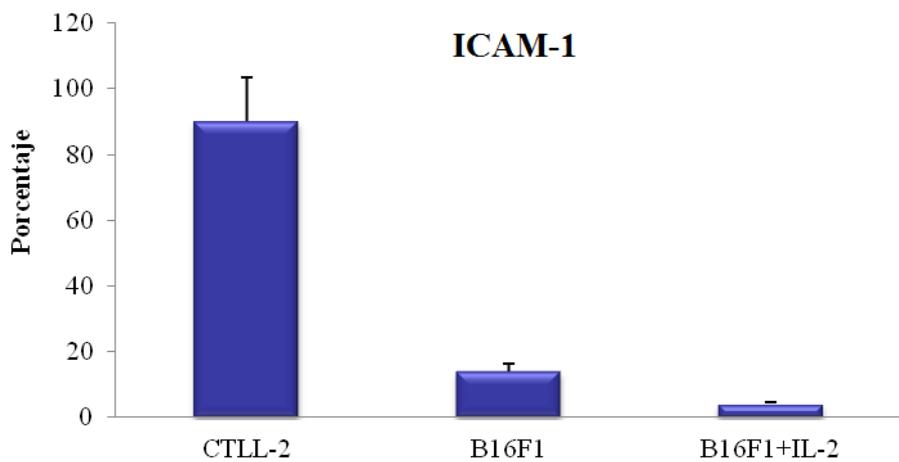


Figura 17. Análisis de la expresión de las moléculas de superficie de las células del melanoma B16F1 tratadas con IL-2 y las células CTLL-2. (A) Receptor de la IL-2 (RIL-2 β). (B) Receptor de la ICAM-1. Datos obtenidos mediante citometría de flujo.

1.4. Estudio de la modulación por IL-6 de los niveles de expresión de VLA-4 en las células del melanoma B16

Los niveles de expresión de las moléculas de superficie se llevaron a cabo mediante ensayos de inmunofluorescencia y la cuantificación de los mismos, mediante análisis por citometría de flujo.

Se realizó un estudio de los niveles de expresión de dos moléculas implicadas en la adhesión en el melanoma B16: VLA-4 cuya expresión ya se había analizado en estudios previos (García de Galdeano y cols., 1998). Para llevar a cabo este ensayo, se realizó un tratamiento con la IL-6 durante 48 h de los cultivos de las células del melanoma B16.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes, el tratamiento con la IL-6 induce un incremento de los niveles de expresión de la molécula de adhesión VLA-4 en las células del melanoma B16F1 y B16F10 (Tabla 3).

Tabla 3. Niveles de expresión de la molécula de adhesión VLA-4 en las células del melanoma B16 tratadas con diferentes dosis de IL-6.

IL-6 (U/ml)	B16F1		B16F10	
0	93,90 ¹	30,1 ²	99,88	35,2
200	98,70	42,2	99,99	49,3
2.000	97,70	48,0	99,99	54,6

Las células del melanoma B16 se trataron 48 h. con IL-6 y posteriormente, se realizó el ensayo de inmunofluorescencia.

¹ Porcentaje de células positivas para VLA-4.

² La intensidad de fluorescencia se determinó mediante citometría de flujo.

1.5. Determinación de la capacidad clonogénica de las células del melanoma B16 tratadas con IL-2 e IL-6

Para realizar este estudio, se mantuvieron en cultivo células del melanoma B16 en presencia del factor (IL-2 o IL-6) durante un período de 7 días. El número de colonias crecidas se visualizó mediante una tinción con cristal violeta.

Se estudió el efecto de la IL-2 y la IL-6 sobre la capacidad clonogénica de las células del melanoma B16. En la Tabla 4, se recogen los datos del número de colonias crecidas con distintas dosis de IL-2 (0, 500 U/ml) durante 24 h. de tratamiento e IL-6 (0, 200, 2.000 U/ml) durante 48 h. de tratamiento, en las células del melanoma B16F1 y B16F10. Los resultados obtenidos muestran que los tratamientos con la IL-2 y la IL-6 no inducen diferencias significativas en la capacidad clonogénica de las células del melanoma B16.

Tabla 4. Capacidad clonogénica de las células del melanoma B16F1 y B16F10 tratadas con IL-2 durante 24 h. y tratadas con IL-6 durante 48 h.

Tratamiento, (U/ml)		B16F1	B16F10
IL-2	0	30 (21-32) ¹	47 (34-61)
		39 (33-42) ²	51(40-56)
	500	24 (18-27)	53 (38-56)
		28 (22-39)	55 (45-59)
IL-6	0	23 (21-25) ¹	43 (40-47)
	200	25,3 (23-26)	37 (36-39)
	2.000	22 (20-25)	36,6 (32-39)

¹ Se sembró 200 cél/poc. y se incubaron en la estufa. A los 7 días, se cuantificó el número de colonias mediante una tinción de cristal violeta 0,2% en etanol 2%, formol 4%.

² Se trató las células con IL-2 durante 24 h. o IL-6 durante 48 h. Posteriormente, se realizó el ensayo de formación de colonias con las células tratadas.

1.6. Estudio de la capacidad de producción de IL-2 e IL-6 en las células del melanoma B16

Para determinar si las células del melanoma murino B16 son capaces de sintetizar la IL-2, se analizó los sobrenadantes de las células B16 mediante un ensayo biológico con las células CTLL-2, que necesitan de un aporte exógeno de IL-2 para su supervivencia.

Previamente a realizar el ensayo biológico con las células CTLL-2, se prepara la recta patrón de producción de IL-2, como se explica en detalle en el Apdo. de Materiales y Métodos 2.9. (Figura 9B).

Se realizó el bioensayo y se observó que las células del melanoma B16 no producen la IL-2.

Debido al efecto inductor del PMA en las células CTLL-2 (Figura 18). Se intentó inducir la producción de IL-2 en las células del melanoma B16. Sin embargo, el tratamiento con PMA no induce la producción de IL-2 en las células del melanoma B16F1 ni en las células B16F10 (Figura 19).

La determinación de la producción de IL-6 en los sobrenadantes de las células B16 se realizó mediante un ensayo inmunoenzimático.

Los histogramas de la Figura 20 corresponden a las dos líneas del melanoma B16 estudiadas B16F1 y B16F10, que no producen IL-6. Esto se observó, tanto para las células cultivadas al 1%, como para las células suplementadas con 10% de SBF y en todos los tiempos de cultivo (24, 48, 72 y 96 h) testados.

Además, se intento inducir la producción de IL-6 en las células de melanoma B16 empleando PMA. Sin embargo, los tratamientos con PMA de 24 y 48 h. no son capaces de inducir la producción de IL-6 en las células del melanoma B16F1 y B16F10 (Figura 21).

Efecto del PMA sobre la proliferación de las células CTLL-2.

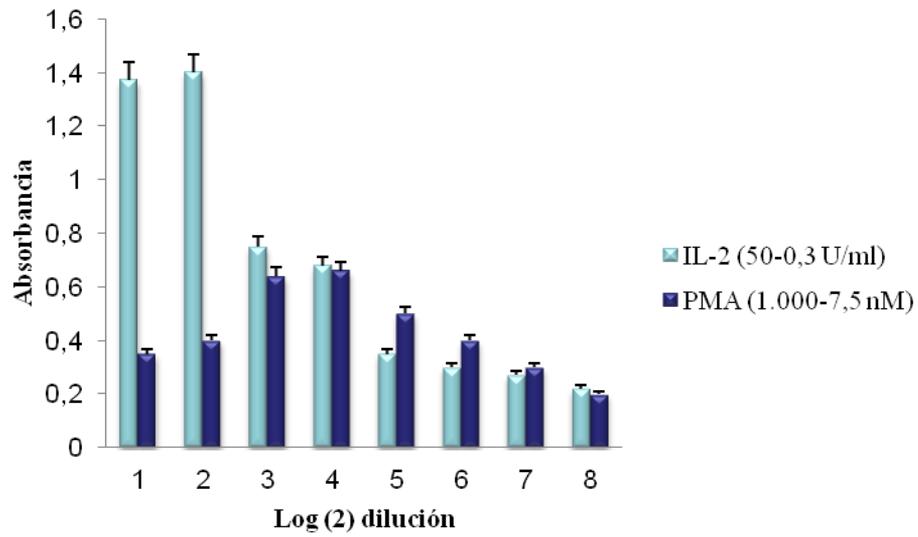


Figura 18. Capacidad de proliferación de las células CTLL-2 tratadas con PMA. Datos obtenidos mediante el bioensayo de las células CTLL-2.

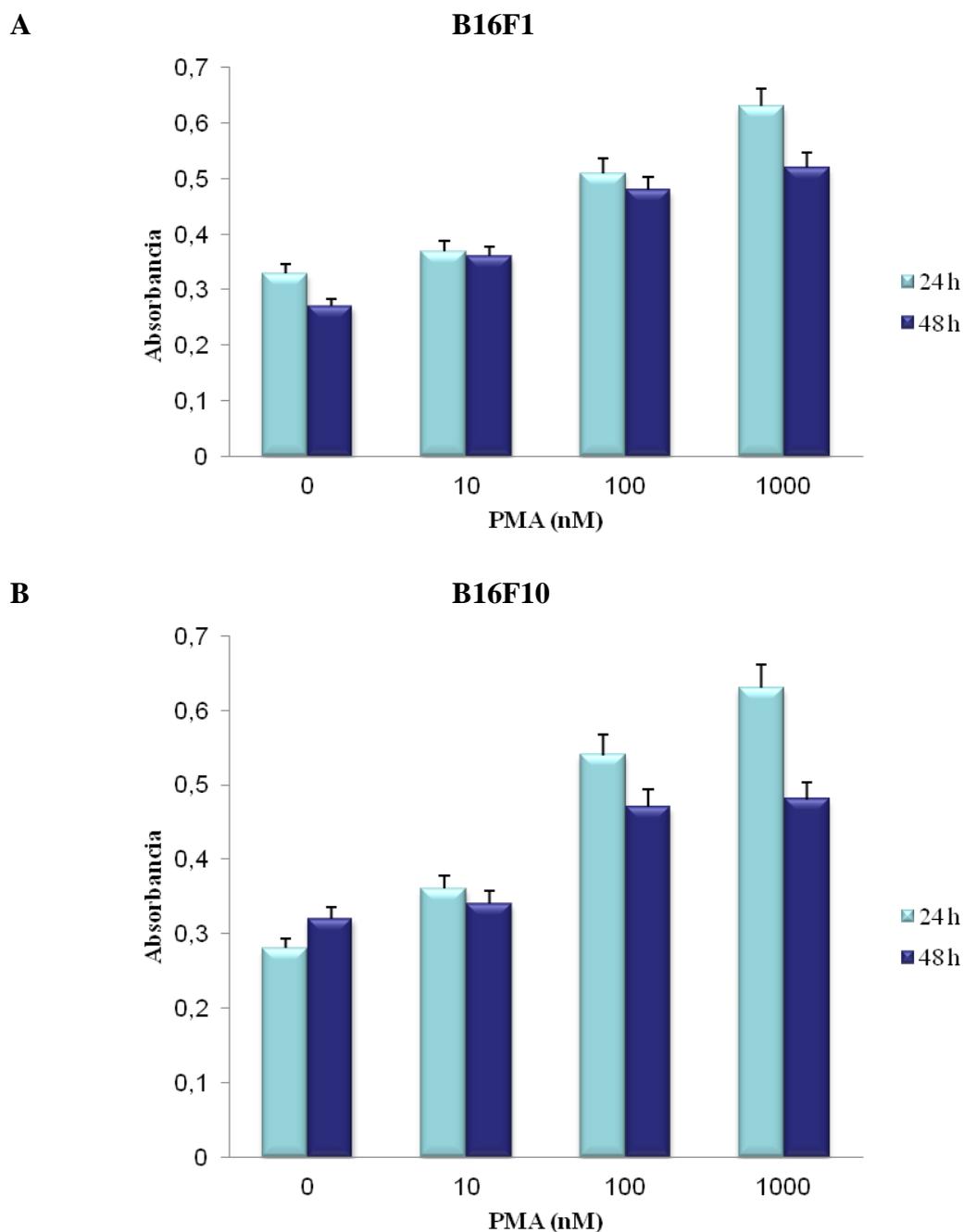
PMA no induce la producción de IL-2 en las células del melanoma B16.

Figura 19. Efecto del PMA en los cultivos de las células del melanoma B16. (A) Células B16F1. **(B)** Células B16F10. Datos obtenidos mediante el bioensayo de las células CTLL-2.

Las células del melanoma B16 no producen IL-6.

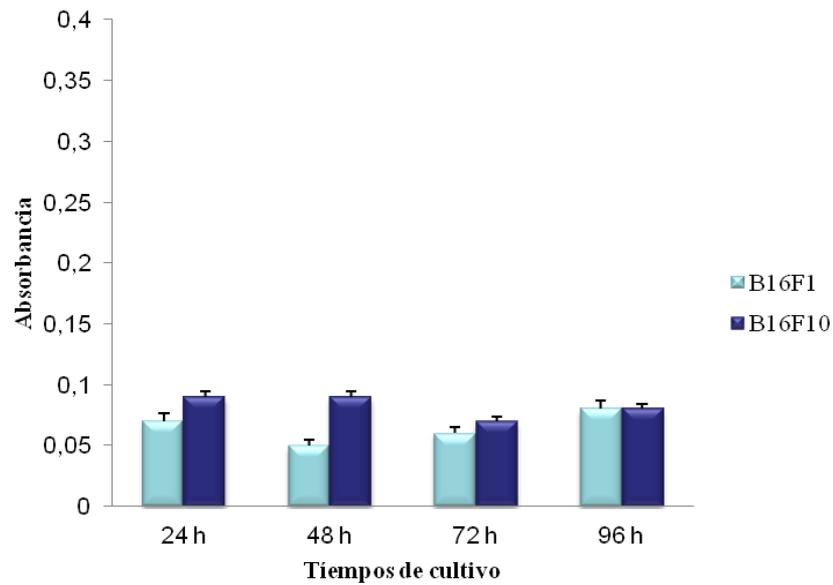


Figura 20. Estudio de la producción de IL-6 en las células del melanoma B16. Sobrenadantes de las células del melanoma B16F1 y B16F10. Los datos se obtuvieron mediante el bioensayo de citotoxicidad de las células L929.

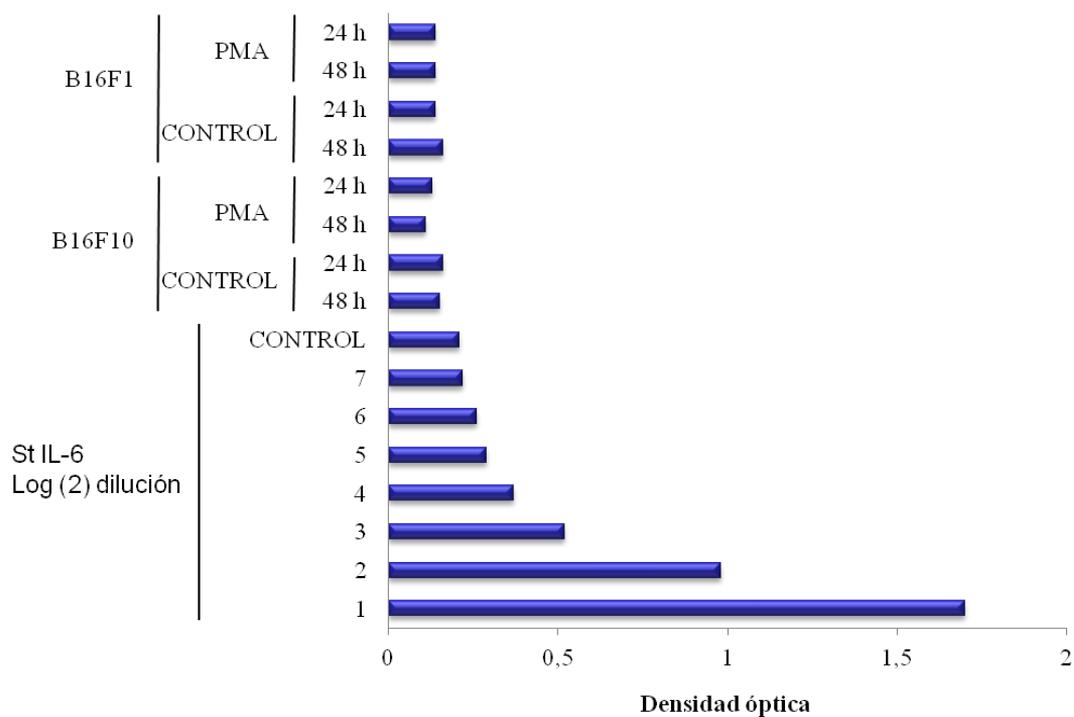
PMA no induce la producción de IL-6 en las células del melanoma B16.

Figura 21. Curva patrón de la inducción por PMA de la producción de IL-6 en las células del melanoma B16F1 y B16F10. Datos obtenidos mediante el bioensayo de citotoxicidad de las células L929.

1.7. Determinación de la capacidad proliferativa en las células del melanoma B16 tratadas con IL-2 e IL-6

El estudio de proliferación celular consistió en realizar el test colorimétrico del XTT, con las células del melanoma B16 tratadas con las citocinas (IL-2 e IL-6).

Se inició el estudio de la proliferación celular analizando el efecto de la IL-2 y la IL-6 en las células del melanoma B16. En las Figuras 22 y 23 se muestran los resultados de los ensayos de proliferación durante 24, 48 y 72 h. de células B16F1 y B16F10 tratadas con IL-2 (5, 50, 500 y 1.000 U/ml) e IL-6 (200, 1.000, 5.000 U/ml). Se observó que la IL-2 y la IL-6 inducen un incremento de la proliferación de las células del melanoma B16. En el caso de la IL-2, el tratamiento que indujo un claro efecto fue 500 U/ml en cultivos de 24 h. En el caso de la IL-6, el tratamiento más eficaz es 200 U/ml en cultivos de 48 horas.

Para estudiar el efecto de la actinomicina-D, que es un inhibidor de la síntesis proteica sobre las células del melanoma B16, se realizó un estudio de proliferación de células en cultivo. Se observó que el tratamiento con actinomicina-D induce una disminución de la tasa de proliferación de las células B16 (Figura 24A). Sin embargo, los tratamientos con IL-2 e IL-6 revertieron el efecto antiproliferativo de la actinomicina-D (Figura 24B).

IL-2 no induce incremento de la proliferación de las células del melanoma B16.

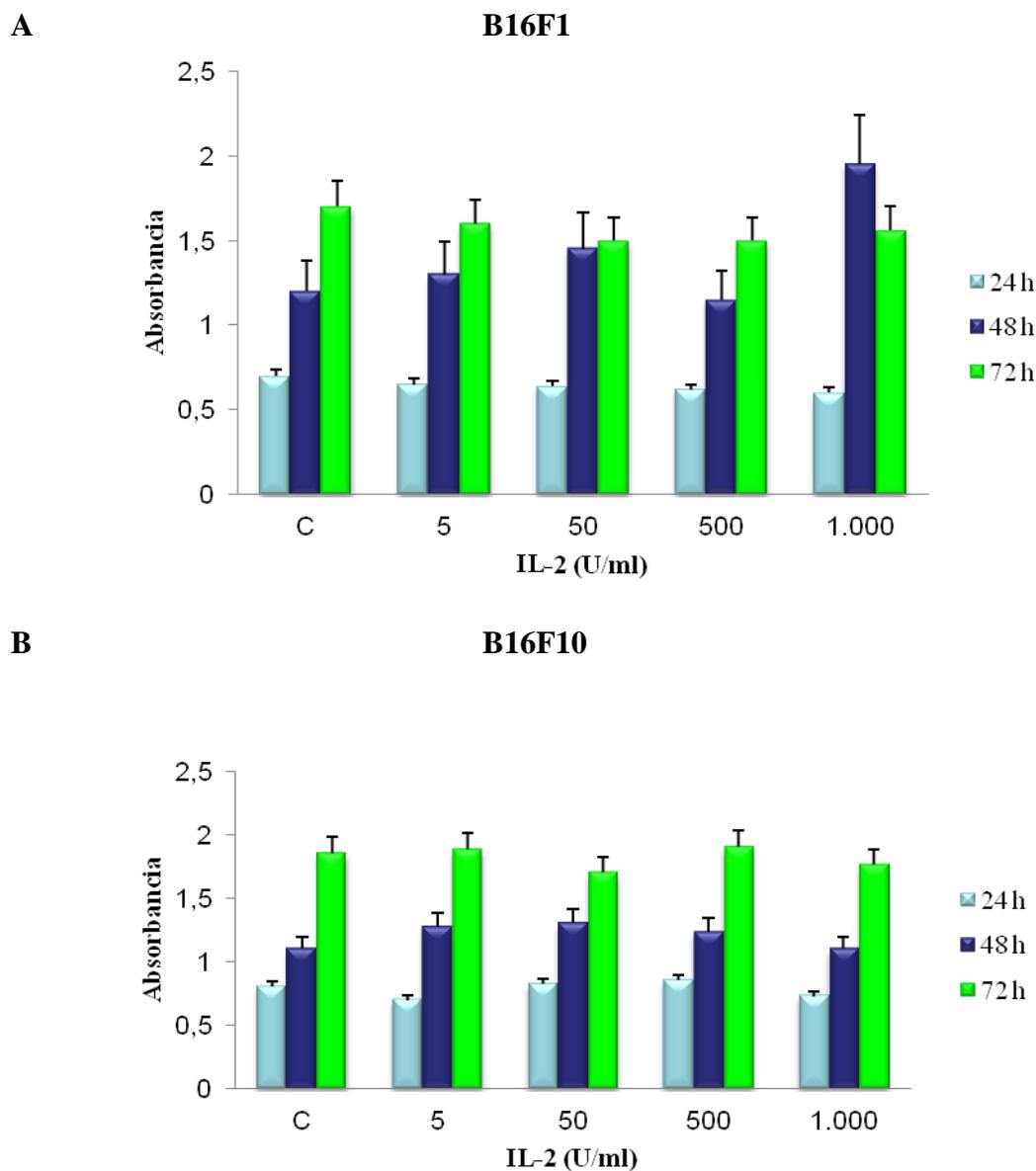


Figura 22. Proliferación de las células del melanoma B16 tratadas con IL-2 durante 24, 48 y 72 h. de cultivo. (A) Células B16F1. (B) Células B16F10. La proliferación celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico del XTT.

IL-6 no induce incremento de la proliferación de las células del melanoma B16.

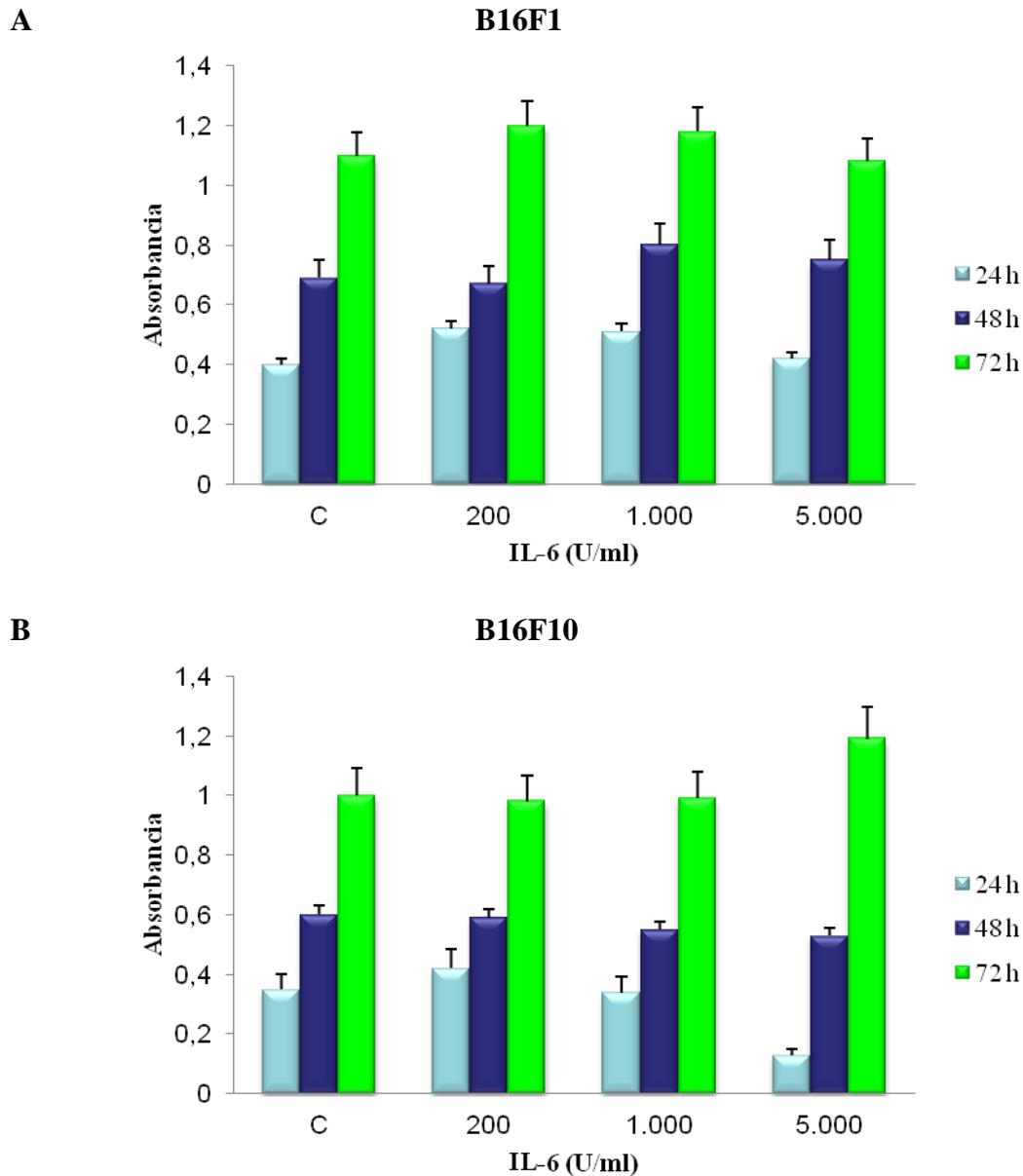
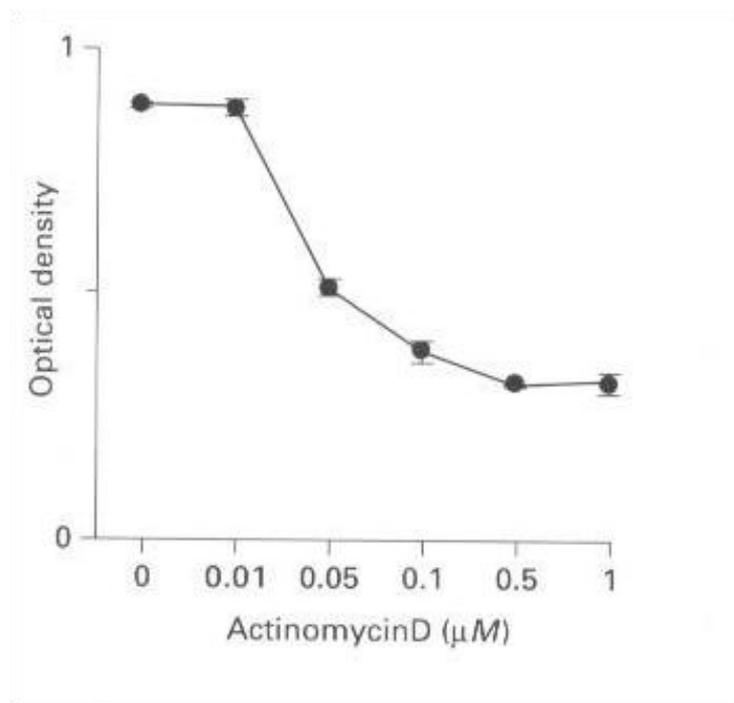


Figura 23. Proliferación de las células del melanoma B16 tratadas con IL-6 durante 24, 48 y 72 h. de cultivo. (A) Células B16F1. (B) Células B16F10. La proliferación celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico del XTT.

IL-2 e IL-6 revierten el efecto antiproliferativo de la Actinomicina-D.

A



B

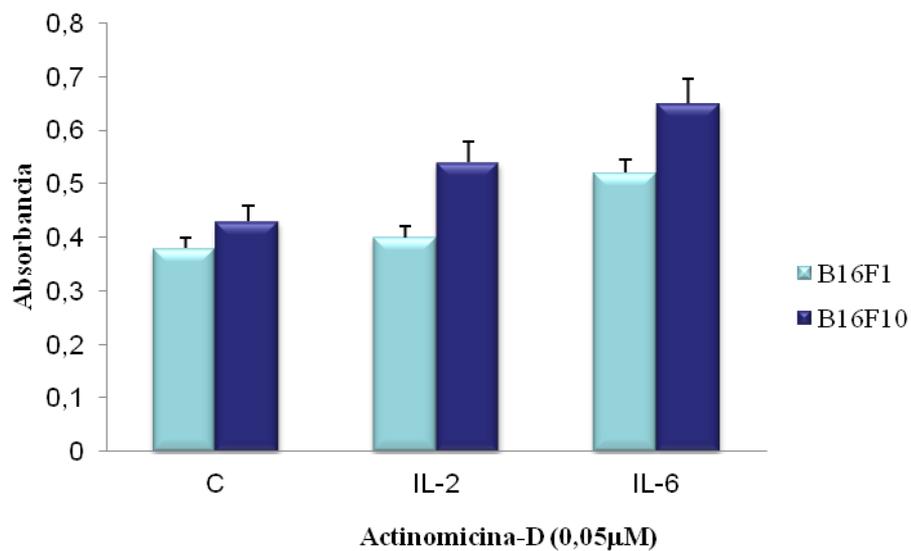


Figura 24. (A) Curva patrón del efecto antiproliferativo de la actinomicina-D sobre las células del melanoma B16. (B) Proliferación de las células del melanoma B16F1 y B16F10 tratadas con IL-2 e IL-6. La proliferación celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico del XTT.

2. Estudio del efecto del TNF- α en las células del melanoma B16

Uno de los factores que se han descrito como potente inductor de la producción de la IL-6 es el TNF- α (Jirik y cols., 1989; Norris y cols., 1994). Por eso, decidimos iniciar el estudio de la implicación del TNF- α en el melanoma B16.

Para llevar a cabo el estudio del efecto de este factor sobre el fenotipo de las células del melanoma, se analizó los efectos del TNF- α sobre la actividad de las células del melanoma B16. Además, se intentó dilucidar cuales pueden ser las moléculas implicadas en las vías de señalización del efecto del TNF- α en las células del melanoma murino B16. Por último, se estudió si las células del melanoma B16 eran capaces de producir TNF- α y se analizó si existía alguna interacción de la red de citocinas (IL-2, IL-6 y TNF- α) en el melanoma B16.

2.1. Determinación de la capacidad de invasión de las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α

El estudio de la capacidad invasiva de las células del melanoma murino B16 tratadas con TNF- α se realizó mediante un ensayo estándar de invasión, utilizando matrices artificiales de matrigel, que es uno de los modelos más habituales para testar *in vitro* la capacidad de invasión (Ghajar y cols., 2007).

Para realizar este ensayo, se trataron células del melanoma B16 con 50 ng/ml de TNF- α durante 72 h. Posteriormente, se realizó el ensayo de invasión y se obtuvieron los siguientes resultados. El TNF- α inhibe la capacidad de invasión de las células de melanoma B16F1, expresada como una pérdida de capacidad clonogénica de en torno al 10% (Figura 25A). En el caso de las células B16F10 se realizó un pretratamiento con TNF- α durante 24 h. y posteriormente se realizó el ensayo de invasión. Los resultados en este caso muestran una disminución de la capacidad clonogénica de en torno al 55% (Figura 25B).

TNF- α inhibe la capacidad de invasión de las células del melanoma B16.

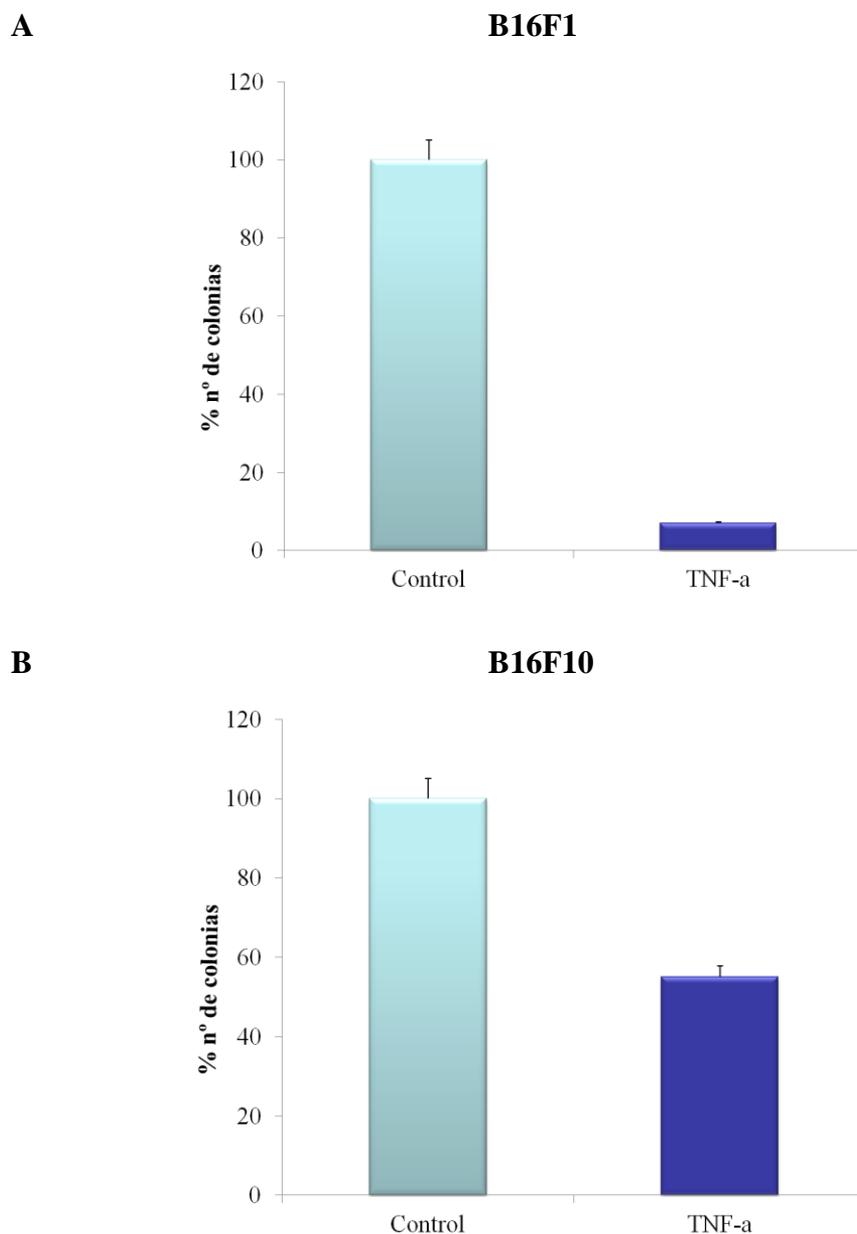


Figura 25. Efecto del TNF- α sobre la capacidad de invasión de las células del melanoma B16. (A) Número de colonias obtenidas en las células B16F1 pretratadas con TNF- α durante 72 h. (B) Número de colonias obtenidas en las células B16F10 pretratadas con TNF- α durante 24 h.

2.2. Efecto del TNF- α sobre el patrón de distribución de filamentos de F-actina en las células del melanoma B16

Se estudió el efecto del TNF- α sobre el citoesqueleto de las células del melanoma B16. Concretamente, se decidió analizar si el tratamiento con TNF- α induce cambios en el patrón de distribución de los filamentos de F-actina del citoesqueleto celular, mediante microscopía de fluorescencia.

La imagen de la Figura 26A muestra el patrón de distribución de los filamentos de F-actina de las células Control del melanoma murino B16F1 teñidas con TRICT-phaloidina. Las imágenes obtenidas para estas mismas células B16F1 tratadas con 1×10^5 pg/ml y con 5×10^5 pg/ml de TNF- α durante 24 y 48 h, son similares en cuanto al patrón de distribución de los filamentos de F-actina como se observa en la Figura 26B. En la Figura 26C se muestran dos células en división celular y en la Figura 26D se observa al detalle todo el citoesqueleto de una de las células del melanoma B16, en la que se aprecia las fibras de actina marginales. Resultados similares se obtuvieron con las células del melanoma B16F10 (imágenes no mostradas).

TNF- α no induce cambios en el patrón de distribución de filamentos de F-actina en el citoesqueleto de las células del melanoma B16.

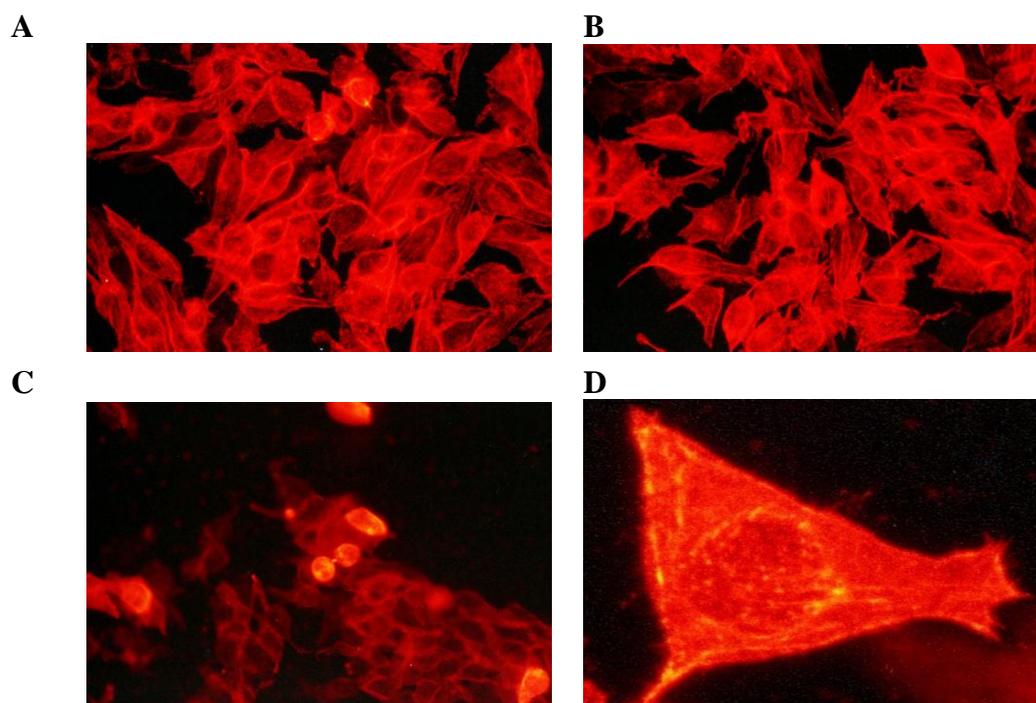


Figura 26. Patrón de distribución de filamentos de F-actina en el citoesqueleto de las células del melanoma B16 teñidas con TRICT-faloidina. (A) Células B16F1 Control. (B) Células B16F1 tratadas con TNF- α . (C) Células del melanoma B16F1 en división celular. (D) Detalle del citoesqueleto de una de estas células. Imágenes obtenidas mediante microscopio de fluorescencia Leica (LEITZ DMRB).

2.3. Determinación de la capacidad de adhesión “in vitro” de las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α

Para realizar el estudio de adhesión, en primer lugar se trató de observar cual es el efecto del TNF- α sobre la capacidad de adhesión de las células del melanoma murino B16. Estas células fueron tratadas con TNF- α y a continuación, se realizó el ensayo de adhesión celular.

Para iniciar el análisis del efecto del TNF- α en las células del melanoma B16, se realizaron ensayos de adhesión celular con células de melanoma B16F1 y B16F10 tratadas con 50 ng/ml de TNF- α “in situ”. Los resultados de este ensayo se pueden observar en la Figura 27A. El tratamiento con TNF- α no induce cambios significativos en la capacidad de adhesión “in situ” de las células del melanoma B16. También se realizó ensayos de adhesión de las células de melanoma B16 tratadas con 50 ng/ml de TNF- α durante 1 h. Los datos obtenidos indican que en este caso, tampoco existen diferencias significativas entre la capacidad de adhesión de las células control y de las células tratadas con el factor durante 1 h. (datos no mostrados).

Por último, se realizaron tratamientos con 50 ng/ml de TNF- α durante 24 h. y seguidamente, se realizó el ensayo de adhesión celular. En este caso, se observó que el TNF- α modula las propiedades de adhesión de las células del melanoma B16. Las células del melanoma B16F10 tratadas con TNF- α muestran una cierta pérdida significativa de capacidad de adhesión con respecto al control (Figura 27B). Por el contrario, las células de melanoma B16F1 tratadas con TNF- α tienen una capacidad de adhesión ligeramente superior al control (resultados no mostrados).

TNF- α no induce cambios significativos en la capacidad de adhesión de las células del melanoma B16.

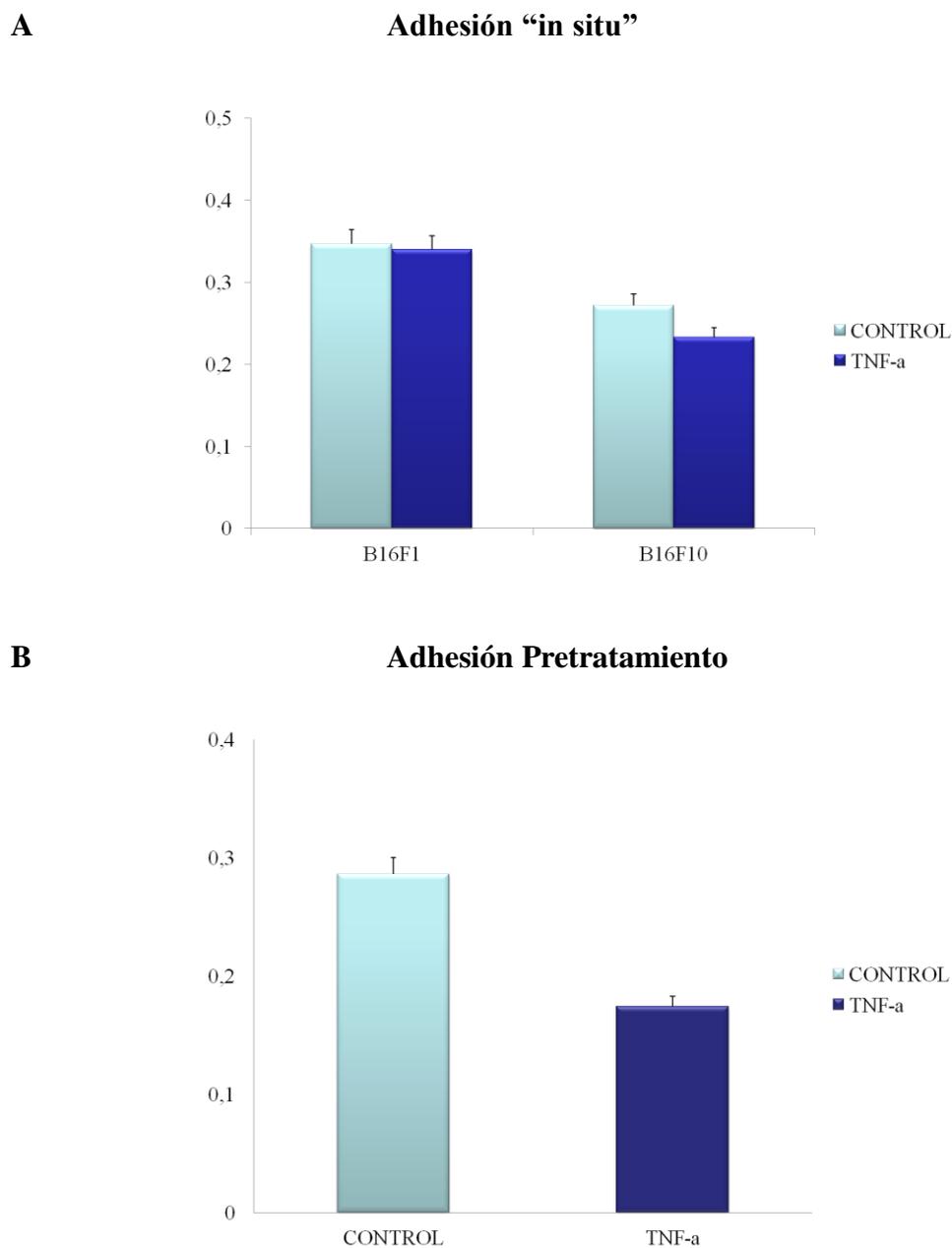


Figura 27. Capacidad de adhesión de las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α . (A) Tratamiento “in situ”. (B) Pretratamiento. Células B16F10 se cultivaron al 10% de SBF y trataron con 50 ng/ml de TNF- α durante 24 h. Posteriormente, se realizó el ensayo de adhesión en la placa recubierta con MATRIGEL.

2.4. Estudio de los niveles de expresión de las moléculas de adhesión: CD44 y VLA-4 en las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α

Se realizó además, un estudio de los niveles de expresión de dos moléculas, implicadas en la adhesión: VLA-4 y CD44 en el melanoma B16, cuya expresión ya se había analizado en estudios previos (García de Galdeano y cols., 1998).

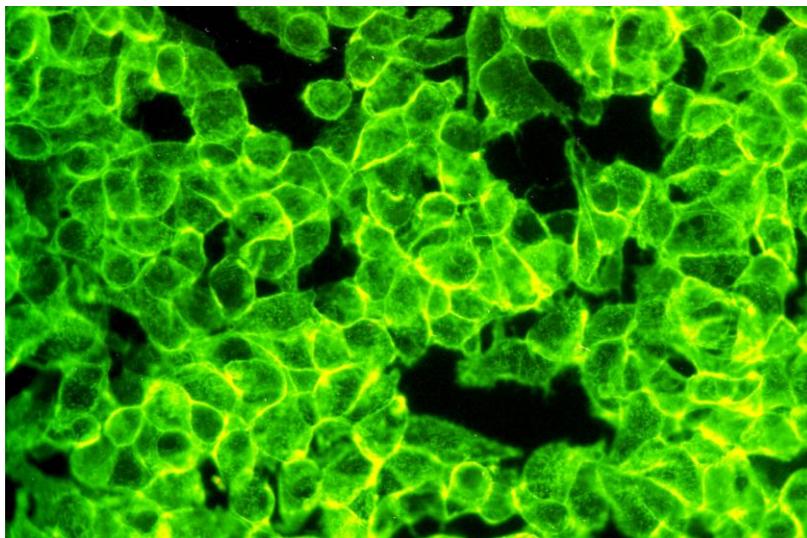
El estudio de la expresión para ambas moléculas se llevó a cabo, cultivando las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α durante 24, 48 y 72 h. Con estas células se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta que se cuantificó mediante análisis por citometría de flujo.

El estudio del efecto del TNF- α en los niveles de expresión las moléculas de adhesión CD44 y VLA-4 da lugar a la obtención de los siguientes resultados. El tratamiento con TNF- α induce un ligero incremento de los niveles de expresión de la molécula de adhesión CD44 en las células de melanoma B16F1 que se observa en la Figura 28A. Para ello, se testó dos diluciones de CD44 como se observa en la Figura 28B, pero para hacer los tratamientos de las células de melanoma B16F1 se eligió utilizar la concentración 1: 20. Además, mediante análisis por citometría de flujo se observa que el tratamiento con TNF- α aumentó los niveles de expresión de la molécula de adhesión CD44 (Figura 29). Resultados análogos se obtuvieron con las células del melanoma B16F10 (datos no mostrados).

Por otro lado, el tratamiento con TNF- α durante 24 h. de las células del melanoma B16F1 induce una disminución en los niveles de expresión de la integrina VLA-4 del 91% al 74% (Figura 30). Se decidió observar este efecto con más detalle en las células del melanoma B16F1 y B16F10. Para ello, se plantearon tratamientos de 24 y 48 h. con 50 ng/ml de TNF- α . Se observa que ambas líneas celulares tratadas con el factor sufren una disminución transitoria de los niveles de la molécula de adhesión VLA-4 que se empiezan a recuperar a las 48 h del tratamiento con TNF- α (Figura 31A). Para confirmar este resultado, se llevaron a cabo nuevos ensayos con células B16F1 tratadas con 50 ng/ml de TNF- α durante 24 y 72 h. que confirmaron que el efecto del TNF- α revierte totalmente a las 72 h. de tratamiento (Figura 31B).

TNF- α induce un incremento no significativo de la expresión de la molécula de adhesión CD44 en las células del melanoma B16.

A



B

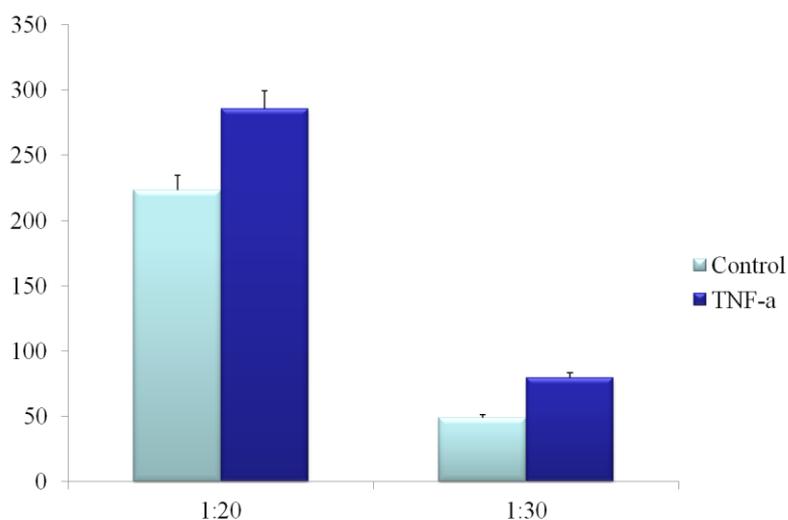


Figura. 28. (A) Inmunofluorescencia de las células del melanoma B16F1 tratadas con TNF- α para la detección de la molécula de adhesión CD44. Imagen obtenida mediante microscopio de fluorescencia Leica (LEITZ DMRB). (B) Niveles de expresión de la molécula de adhesión CD44 en las células del melanoma B16F1 tratadas con TNF- α en las dos concentraciones testadas.

TNF- α aumenta los niveles de expresión de la molécula de adhesión CD44.

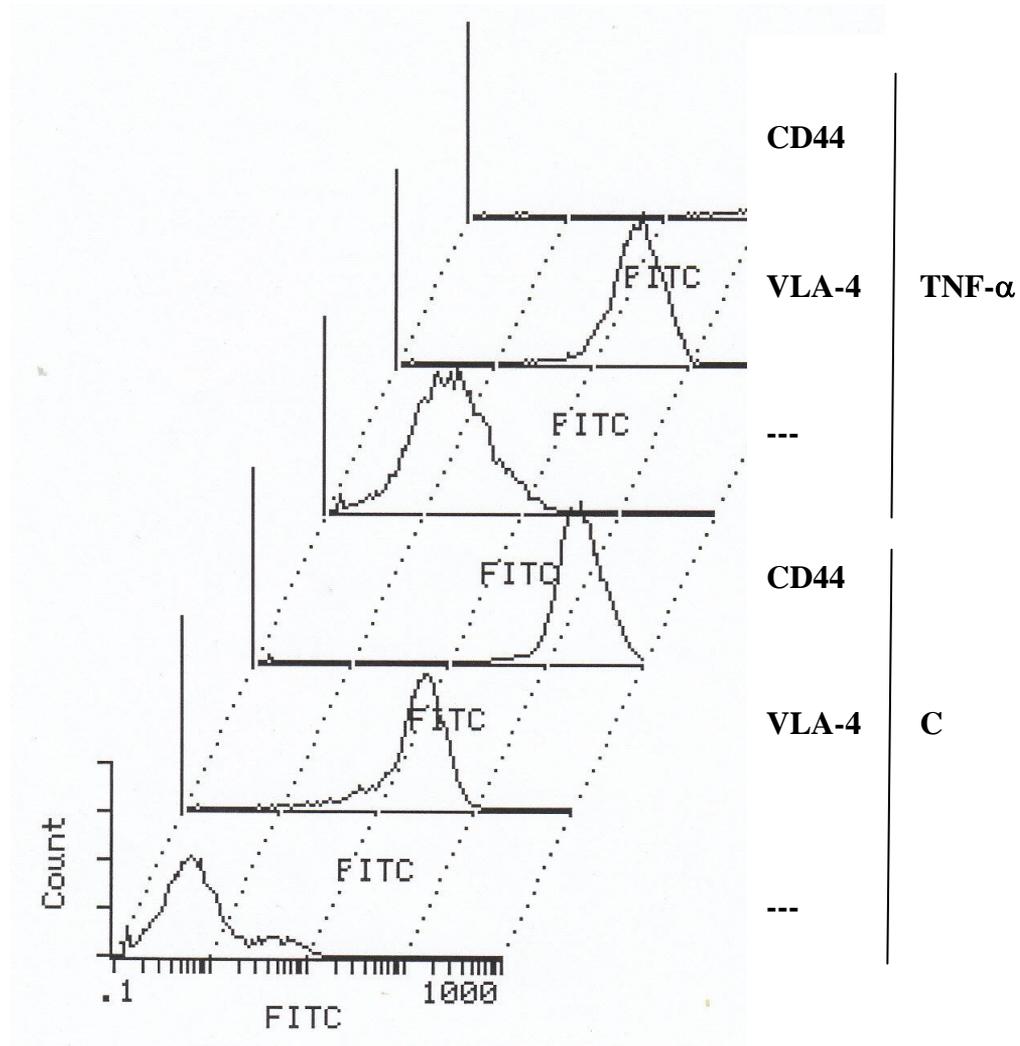


Figura 29. Histogramas monoparamétricos de intensidad de fluorescencia en escala logarítmica de citometría de flujo de los niveles de expresión de las moléculas de adhesión VLA-4 y CD44 en las células del melanoma B16F1 tratadas con TNF- α . Las imágenes se obtuvieron mediante análisis de los datos con el paquete informático WinMDI 2.8 (Scripps Research Institute) y digitalización a tamaño real mediante un escáner.

TNF- α induce una disminución transitoria en la expresión de la molécula de adhesión VLA-4 en células del melanoma B16.

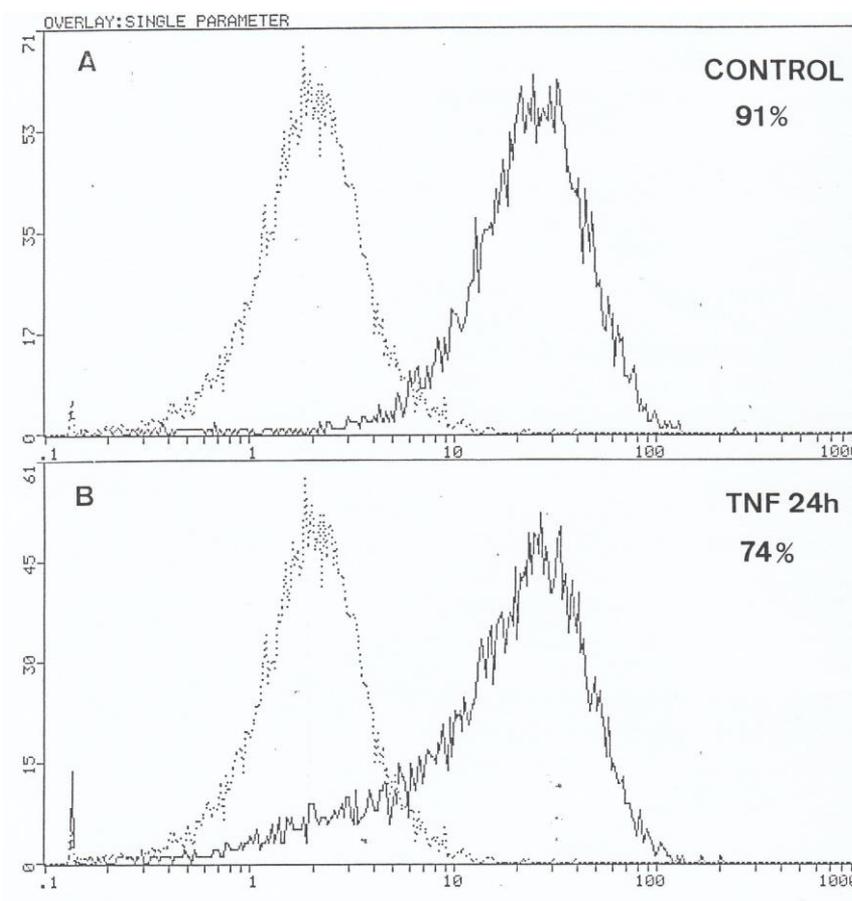


Figura 30. Histogramas monoparamétricos de intensidad de fluorescencia en escala logarítmica de citometría de flujo de los niveles de expresión de la molécula de adhesión VLA-4 en las células del melanoma B16F1 tratadas 24 h. con TNF- α . Las imágenes se obtuvieron mediante análisis de los datos con el paquete informático WinMDI 2.8 (Scripps Research Institute) y digitalización a tamaño real mediante un escáner.

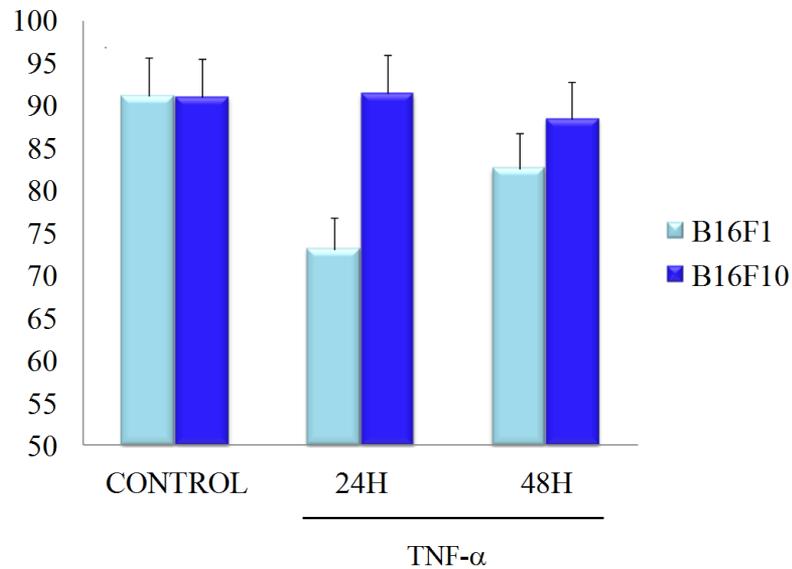
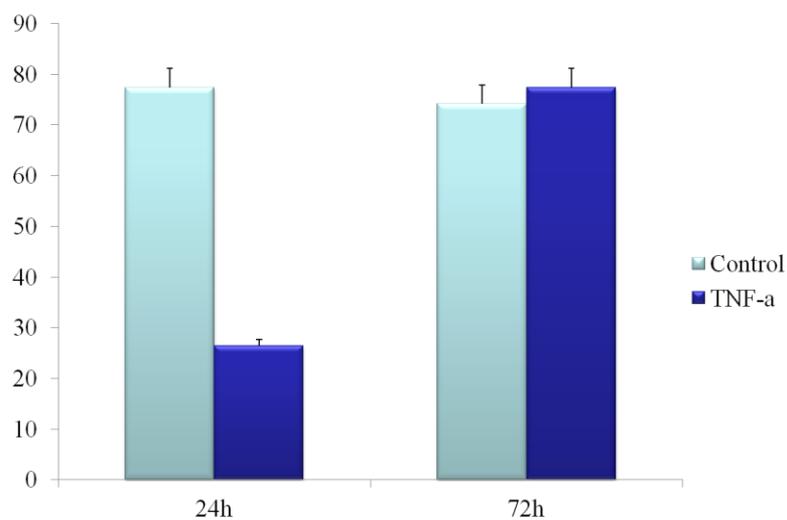
TNF- α induce una disminución transitoria en la expresión de la molécula de adhesión VLA-4 en las células del melanoma B16.**A****B**

Figura 31. (A) Niveles de expresión de la molécula de adhesión VLA-4 en las células del melanoma B16F1 y B16F10 tratadas con TNF- α durante 24 y 48 h. **(B)** Niveles de expresión de la molécula de adhesión VLA-4 en las células del melanoma B16F1 tratadas con TNF- α durante 24 y 72 h.

2.5. Determinación de la capacidad clonogénica de las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α

Para realizar este estudio, se mantuvieron en cultivo células B16 tratadas con el factor de necrosis tumoral durante un período de 7 días. El número de colonias crecidas se visualizó mediante una tinción con cristal violeta.

Se analizó el efecto del tratamiento con TNF- α en las células del melanoma B16. En este caso, se observa un efecto inhibitor del tratamiento con TNF- α sobre la capacidad de formación de colonias de las células del melanoma B16F1 y B16F10 (Tabla 5). Las diferencias observadas en el número de colonias crecidas entre ambas líneas celulares se deben a que, para la línea celular B16F10 se sembraron 100 cél/pocillo, mientras que para B16F1 se sembraron 200 cél/pocillo; con objeto de poder hacer ensayos de capacidad clonogénica simultáneos.

Al comparar los resultados de la proliferación celular con los de capacidad clonogénica, se pone de manifiesto que el efecto inhibitor del número de colonias crecidas en presencia del TNF se observa a concentraciones del factor más bajas de las empleadas en el estudio de la proliferación. Además, a la concentración de 100 ng/ml el TNF- α inhibe casi por completo la formación de colonias.

Tabla 5. Capacidad clonogénica de las células del melanoma B16F1 y B16F10 tratadas con TNF- α , durante 24 h.

TNF- α (ng/ml)	Número de colonias (rango)	
	B16F1	B16F10
0	46 (42-58)	21 (15-25)
1	39 (35-48)	16 (8-22)
10	26 (23-30)	13 (9-17)
100	4 (3-8)	3 (1-6)

2.6. Determinación de la capacidad de proliferación de las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α

El estudio de proliferación celular consistió en realizar el test colorimétrico del XTT, con las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α .

Los resultados obtenidos son los siguientes. El TNF- α no induce una disminución de la proliferación tanto en las células del melanoma B16F1 como en las células B16F10 a las 24 y 48 h. de tratamiento, aunque en las células suplementadas al 1% SBF a las 48 h. de tratamiento se empieza a observar un efecto (datos no mostrados). Por ello, se decidió realizar una cinética del efecto del TNF- α en las células de melanoma B16. En la Figura 32 se observa un claro efecto del factor a partir de 72 h de tratamiento y sobre todo, en los cultivos de las células B16F10 suplementados al 1% SBF. Por ello, se amplió el estudio y se realizaron nuevas proliferaciones de entre 72 y 96 horas de tratamiento con TNF- α . En la Figura 33 se observa que el efecto inhibitor es más patente a tiempos largos y sobre todo, en los cultivos suplementados al 1% de SBF. Similares resultados se observan con las células del melanoma B16F1 (resultados no mostrados).

Además, se realizó un recuento del número de células obtenidas que evidenció que el ensayo de XTT enmascara el efecto del TNF- α en las células del melanoma B16. Ya que se recogen más número de células control, que de células tratadas con TNF- α durante 24 y 48 h. (Tabla 6).

TNF- α induce un descenso en la proliferación de las células del melanoma B16.

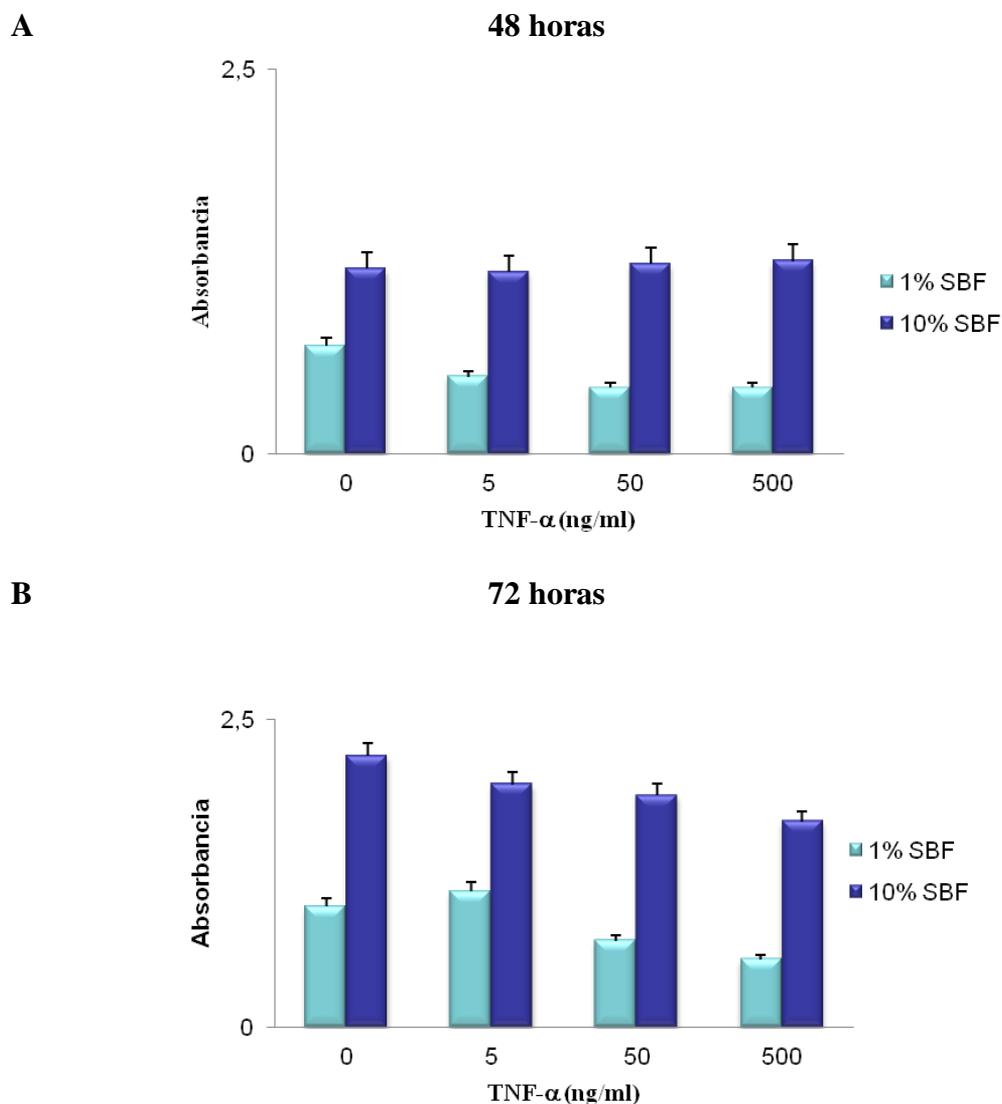


Figura 32. Proliferación de las células del melanoma B16F10 suplementadas al 1% y 10% de SBF. (A) 48 horas. (B) 72 horas. La proliferación celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico del XTT.

TNF- α disminuye la capacidad de proliferación de las células del melanoma B16 a tiempos de cultivo largo.

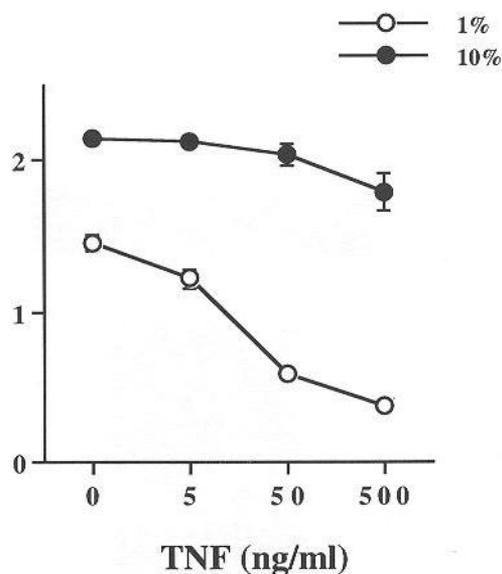


Figura 33. Proliferación de las células del melanoma B16F10 suplementadas al 1% y 10 % de SBF, tratadas con dosis crecientes de TNF- α durante 96 h. de cultivo. La proliferación celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico del XTT.

Tabla 6. Células del melanoma B16F1 y B16F10 tratadas con TNF- α .

Experiencia	Tipo de células	Tiempo incubación	Tratamiento (5 x 10 ⁴ pg/ml)	Nº células recogidas (x 10 ⁶)
1 ^a	B16F1	24 h	C	2,0
			TNF- α	0,56
2 ^a		48 h	C	5,4
			TNF- α	2,64
3 ^a	B16F10	24 h	C	4,32
			TNF- α	2,7
4 ^a		48 h	C	4,8
			TNF- α	3,0

Las células del melanoma B16F1 y B16F10 se cultivaron al 10% de SBF y se trataron con 5 x 10⁴ pg/ml de TNF- α durante 24 y 48 h. en experiencias independientes. Los resultados se expresan como número de células que se recogieron a los tiempos estudiados.

2.7. Estudio del ciclo celular en las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α

En primer lugar, analizamos el ciclo celular de las células del melanoma B16 cultivadas durante 4 y 5 días. En la Tabla 2 se observa que las células B16F1 suplementadas al 10% de SBF crecen y se acumulan en la fase G₀-G₁. Debido a la gran confluencia de los cultivos, es muy difícil discriminar o describir con claridad las fases del ciclo celular de estas células. El 90% de las células se acumulan en fase G₀-G₁ y baja el nivel de células que se encuentra en fase S y G₂-M. Resultados similares se obtienen con la línea celular B16F10 (datos no mostrados).

Con el objetivo de poder observar mejor la progresión del ciclo de éstas células, se plantearon nuevos ensayos en los que se disminuyó la concentración de células sembradas a 20.000 células /ml. En este caso, se analizaron diversos tiempos de cultivo de 3, 4 y 5 días respectivamente. En la Tabla 2 se observa el ciclo celular de las células del melanoma B16F10 suplementadas al 10% de SBF. Según avanzan los días de cultivo, las células se van acumulando en la fase G₀-G₁ y disminuyen las células en las otras fases del ciclo. Además, observamos que la progresión del ciclo celular en las células B16F10 suplementadas al 1% SBF es diferente. Se observa un retraso en la progresión del ciclo celular, por eso las células en fase G₀-G₁ sólo llegan al 69%.

Para continuar con el análisis del ciclo celular, nos pareció interesante determinar el efecto del tratamiento con TNF- α en las células del melanoma B16. Lo primero que se observó fue que, obteníamos más células de los cultivos control que de los cultivos realizados en presencia del TNF- α . Esto se observó en diversas experiencias independientes con las células de melanoma B16F1 y B16F10 cultivadas en presencia de 5 x 10⁴ pg/ml de TNF- α en ensayos de 24 y 48 h (Tabla 6). Esto nos llevó a pensar si el tratamiento con esta citocina estaba alterando en ritmo del ciclo celular, por ello se decidió tratar de estudiar el ciclo de células B16 tratadas con TNF- α a distintos tiempos.

El estudio del ciclo celular consistió en cuantificar mediante análisis por citometría de flujo las células teñidas con Ioduro de Propidio (IP), para tratar de dilucidar si el tratamiento con TNF- α altera las proporciones de células que se encuentran en las distintas fases del ciclo celular. Es decir, si el tratamiento con TNF- α provoca cambios en el ritmo del ciclo celular de las células del melanoma B16.

Los datos obtenidos para las células B16F1 tratadas con TNF- α aparecen recogidos en la Tabla 7. Fruto de la observación de los mismos, se intuye un cierto retraso del ciclo celular en las células B16 tratadas con TNF- α (Figura 34). Además, a la vista del número de células recogidas tras los tratamientos, se puede concluir que las células no tratadas detienen su ciclo celular debido al crecimiento normal del cultivo. Y las células cultivadas en presencia del TNF- α se acumulan con el tiempo en la fase G₂-M.

Analizando los ensayos de cultivos de las células del melanoma B16F10 cultivadas al 1 y 10% SBF respectivamente y tratadas con TNF- α durante 72 h., observamos que la cinética del ciclo celular es diferente en ambos casos. El tratamiento con TNF- α provoca un retraso en la entrada en el ciclo de las células tratadas. Además, en los cultivos al 10% de SBF se observa una disminución del porcentaje de células en fase G₀-G₁ que pasan del 70,5 % en los cultivos control al 67,3% en las células tratadas con TNF- α y porcentajes de células en fase S y G₂-M mayores, debidos a que las células van entrando en el ciclo más tarde (Figura 35A).

Por el contrario, en los cultivos al 1% de SBF se observa que el efecto del TNF- α es mayor y el retraso en el ciclo celular se acentúa de forma más notable. Pasando del 70,3% de células en fase G₀-G₁ al 62,7% en las células tratadas con TNF- α . Los porcentajes de células en el resto de fases del ciclo celular también son mayores debidas al retraso inducido por el TNF- α (Figura 35B).

Además, en las células del melanoma B16F1 suplementadas al 10% de SBF y tratadas con TNF- α durante 72 h. se observan muy pocas células en apoptosis, tanto en las células control (2%) como en las células tratadas con TNF- α (0,9%) (Figura 36A). Sin embargo, en la Figura 36B se observa que en las células L929 tratadas con TNF- α se incrementa los porcentajes de células en apoptosis que aumentan del 3,9% en las células control, hasta el 98,2% en las tratadas con TNF- α . Es decir, en las células L929 el tratamiento con TNF- α induce un efecto de daño celular que afecta casi a la totalidad del cultivo.

**TNF- α ralentiza el ciclo celular de las células del melanoma B16:
aumenta el porcentaje de células en fase G₂-M.**

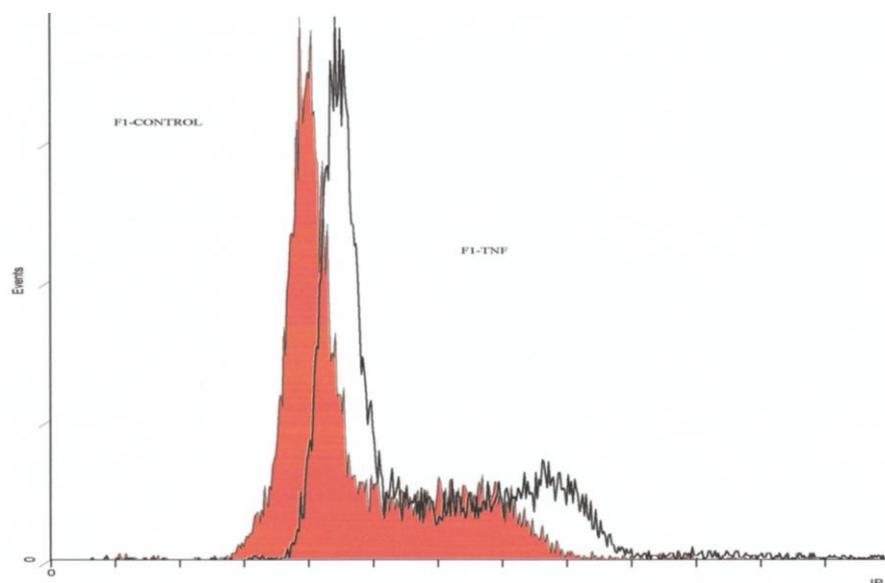


Figura 34. Histogramas monoparamétricos de intensidad de fluorescencia en escala logarítmica de citometría de flujo de las células del melanoma B16F1 marcadas con el Ioduro de Propidio (IP). Las imágenes se obtuvieron mediante análisis de los datos con el paquete informático Win MDI 2.8 (Scripps Research Institute) y digitalización a tamaño real mediante un escáner.

Tabla 7. Ciclo celular de las células del melanoma B16F1 tratadas con TNF- α .

Experiencia (tiempo incub.)	Tratamiento (5 ng/ml)	Nº células recogidas (x 10 ⁶)	Ciclo celular		
			G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M
1 ^a (48 h)	C	5,4	67,0	16,9	14,2
	TNF- α	2,64	60,3	21,8	15,6
2 ^a (72 h)	C	2,5	70,6	15,8	11,6
	TNF- α	1,9	67,5	16,1	15,5
3 ^a (96 h)	C	7,65	90,5	2,4	4,8
	TNF- α	3,84	83,8	4,6	8,0

Las células del melanoma B16 se cultivaron al 10% de SBF y se trataron con 5×10^4 pg/ml de TNF- α durante 48, 72 y 96 h. en experiencias independientes. Se fijaron en etanol y se realizó la tinción con ioduro de propidio. La cuantificación se determinó mediante análisis por citometría de flujo. Los resultados se expresan como porcentaje de células que se encontrarían en cada fase del ciclo celular.

TNF- α ralentiza la entrada en el ciclo celular de las células del melanoma B16F10.

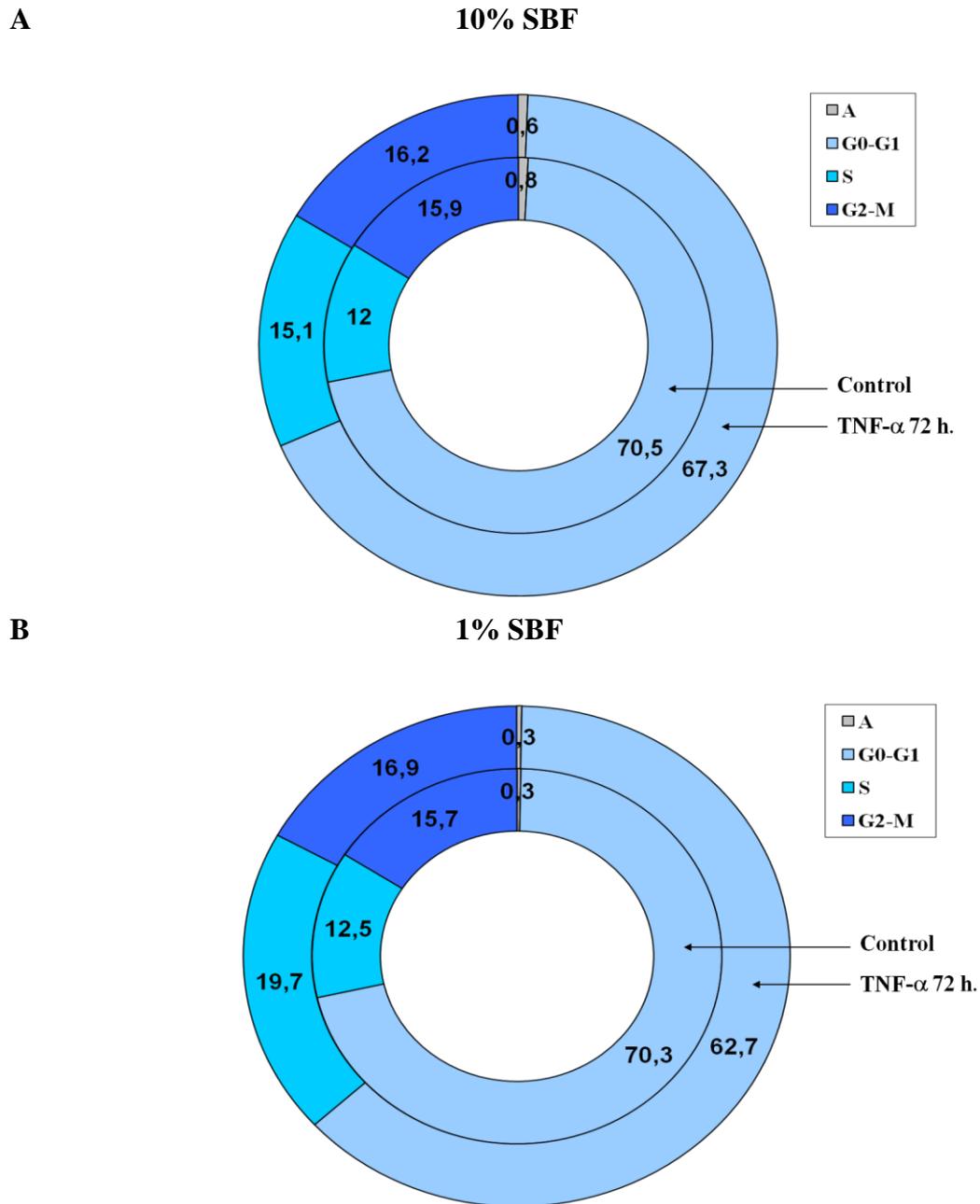


Figura 35. Ciclo celular de células del melanoma B16F10 tratadas con TNF- α . (A) 10% SBF. (B) 1% SBF. Datos obtenidos mediante tinción con yoduro de propidio y análisis por citometría de flujo. Los resultados se expresan como porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular.

TNF- α no induce muerte celular en las células del melanoma B16.

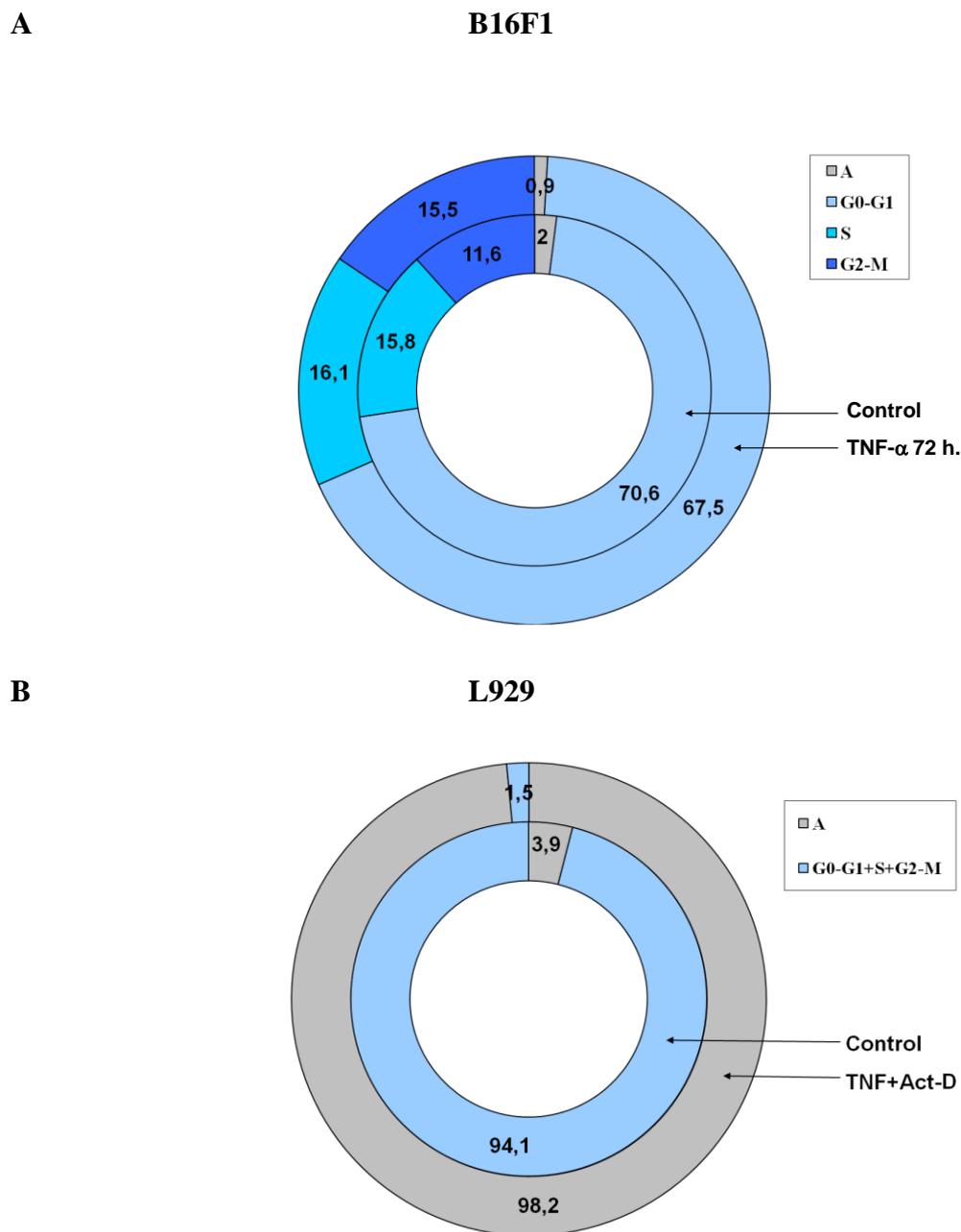


Figura 36. Ciclo celular de las células tratadas con TNF- α . (A) Células B16F1. (B) Células L929. Datos obtenidos mediante tinción con yoduro de propidio y análisis por citometría de flujo. Los resultados se expresan como porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular.

2.8. Estudio de los niveles de expresión de p21^{WAF1/CIP1} en las células del melanoma B16 tratadas con TNF- α

A partir de los resultados que demostraron un efecto inhibitor del TNF- α sobre el melanoma B16; se decidió analizar si el inhibidor del ciclo celular p21^{WAF1/CIP1} podían estar implicados en el efecto inhibitor del TNF- α que manifiestan las células del melanoma murino B16.

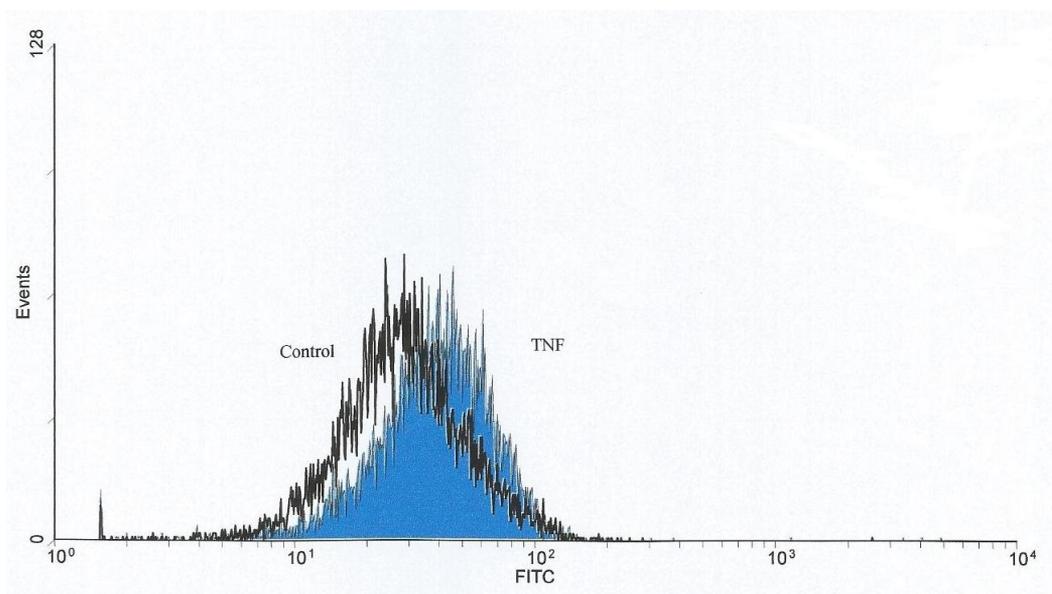
El estudio del posible papel del inhibidor del ciclo celular p21^{WAF1/CIP1}, en la ruta de la señal debida al TNF- α se llevó a cabo mediante un estudio de la expresión de dicha molécula, para ello se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Los resultados se cuantificaron mediante citometría de flujo.

Los resultados de los niveles de expresión de la molécula p21^{WAF1/CIP1} en las células de melanoma B16F1 tratadas con 50 ng/ml de TNF- α aparecen recogidos en los histogramas de citometría de flujo de la Figura 37A.

El TNF- α induce un incremento significativo de los niveles de expresión del fluorocromo p21^{WAF1/CIP1} en las células del melanoma B16F1, incrementándose los niveles de expresión desde el 10,3% en las células control, hasta el 20,3% en las células tratadas con TNF- α . En las células de melanoma B16F10, el aumento de los niveles de expresión pasa del 9,2% para las células control al 14,3% para las células tratadas con TNF- α (Figura 37B).

TNF- α induce un incremento de los niveles de expresión de p21^{WAF1/CIP1} en ambas sublíneas celulares del melanoma B16.

A



B

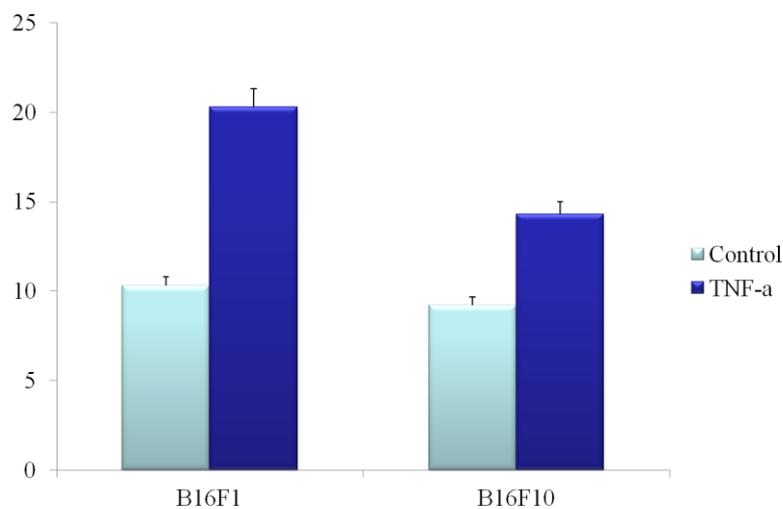


Figura 37. Citometría de flujo de células del melanoma B16 tratadas con TNF- α y marcadas con p21^{WAF1/CIP1}. (A) Histogramas monoparamétricos de intensidad de fluorescencia en escala logarítmica de las células B16F1 control (en negro) y tratadas con TNF- α (en azul). (B) Niveles de expresión de las células del melanoma B16F1 y B16F10 tratadas con TNF- α y teñidas con el fluorocromo p21^{WAF1/CIP1}. Las imágenes y los datos se obtuvieron mediante citometría de flujo y el análisis de los mismos se realizó mediante el paquete informático Win MDI 2.8 (Scripps Research Institute).

2.9. Efecto de la C₂-ceramida sobre las células del melanoma B16: proliferación y capacidad clonogénica

Se analizó tanto la proliferación como la capacidad clonogénica de las células del melanoma murino B16 tratadas con TNF- α , en respuesta a tratamientos con un análogo de la ceramida. Se empleó la C₂-ceramida (N-Acetyl-D-erythro-Sphingosine).

Determinación de la capacidad de proliferación de las células del melanoma B16

Se cultivaron las células del melanoma B16, se trataron con C₂-ceramida y se sometieron al test colorimétrico del XTT.

Lo primero que se observó fue la imagen del efecto de la C₂-ceramida en los tratamientos en microplaca (Figura 38). El tapiz celular parece haber sufrido un efecto de tipo citotóxico.

Para analizar el efecto de la C₂-ceramida a dosis más bajas y para estudiar el efecto a lo largo del tiempo, realizamos una cinética de 24, 48 y 72 h. de tratamiento. Se plantearon ensayos de proliferación con células B16F1 suplementadas con 1% de SBF y 10% de SBF. Los resultados de los mismos aparecen recogidos en los histogramas de la Figura 39. El efecto de la C₂-ceramida se manifestó desde los primeros tiempos de cultivo, a diferencia del efecto del TNF que se manifestaba con claridad a partir de las 72 h de cultivo. Además, podemos concluir que el SBF no protege a las células del melanoma B16 del efecto de la C₂-ceramida. Resultados similares se obtuvieron para las células cultivadas con 10% de SBF (datos no mostrados).

A continuación, se realizaron ensayos de proliferación celular para tratar de comparar el efecto del TNF- α y la C₂-ceramida. Para ello, se realizó cultivos de células del melanoma B16F1 suplementados con 1% de SBF, tratadas con 50 ng/ml de TNF- α durante 72 h. y cultivos de células del melanoma B16F1 suplementados con 1% SBF, tratadas 50 μ M de C₂-ceramida. Seguidamente, se realizó el ensayo de proliferación celular en placa, que se cuantificó mediante el ensayo colorimétrico del XTT (Figura 40A). Se observó que el efecto de ambos factores es distinto. La C₂-ceramida da lugar a un efecto lítico, mientras que el TNF- α da lugar a un efecto inhibitor. Resultados similares se obtuvieron para las proliferaciones celulares que se realizaron suplementando

los cultivos de las células del melanoma B16F1 con 10% de SBF (Figura 40B). Resultados similares se obtienen con las células del melanoma B16F10 (resultados no mostrados).

Podemos concluir que el efecto de la C₂-ceramida y el TNF- α son distintos. El efecto del TNF era inhibitor del crecimiento, se manifiesta a tiempos largos y en condiciones de cultivo adversas para las células. La C₂-ceramida por el contrario, da lugar a efectos de tipo lítico, el efecto es dosis dependiente, se manifiesta desde los primeros momentos del tratamiento y además, es independiente de la cantidad de SBF a la que se cultiven las células del melanoma B16.

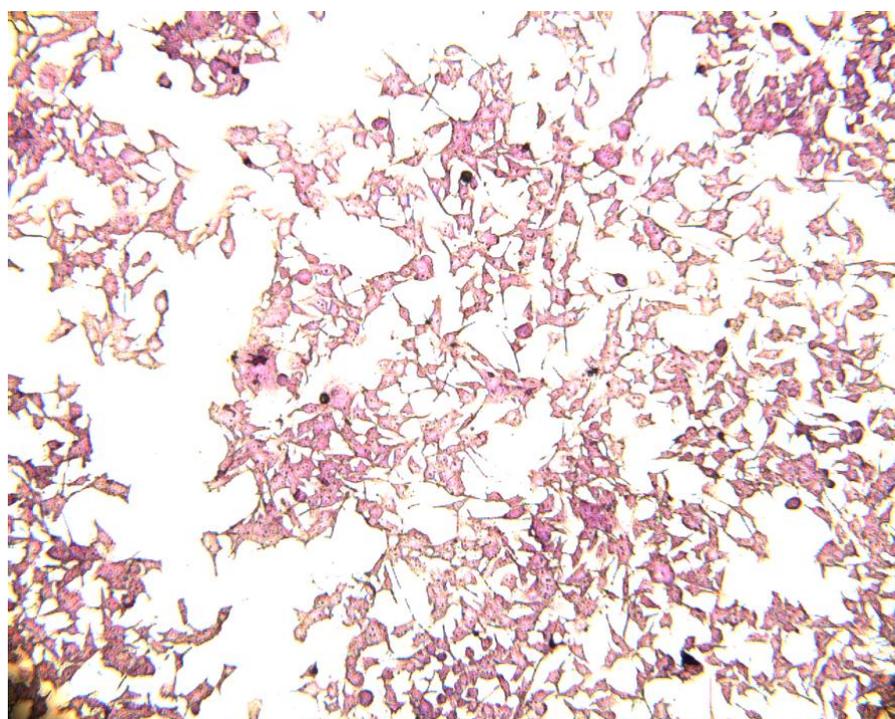


Figura 38. Células del melanoma B16F10 tratadas con C₂-ceramida durante 24 h. Imagen obtenida mediante una tinción de cristal violeta.

Efecto dosis dependiente de la C₂-ceramida en un ensayo de proliferación de las células del melanoma B16F1.

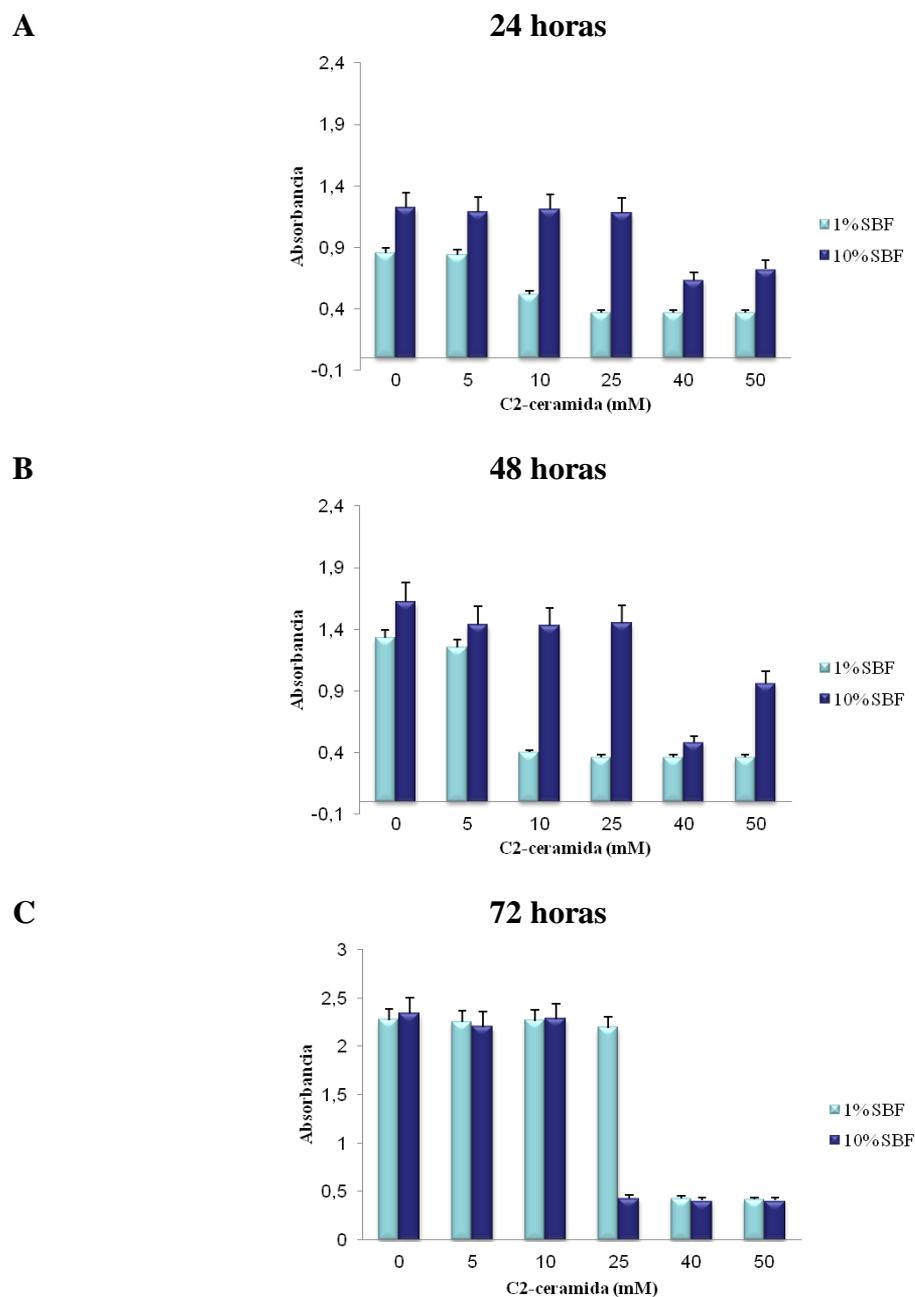


Figura 39. Proliferación de las células del melanoma B16F1 suplementadas con 1% y 10% de SBF a distintos tiempos de tratamiento con C₂-ceramida. (A) 24 horas. (B) 48 horas. (C) 72 horas. La cuantificación de la proliferación se realizó mediante el ensayo colorimétrico del XTT.

El efecto del tratamiento con la C₂-ceramida y TNF- α en cultivos de células del melanoma B16F1 es distinto.

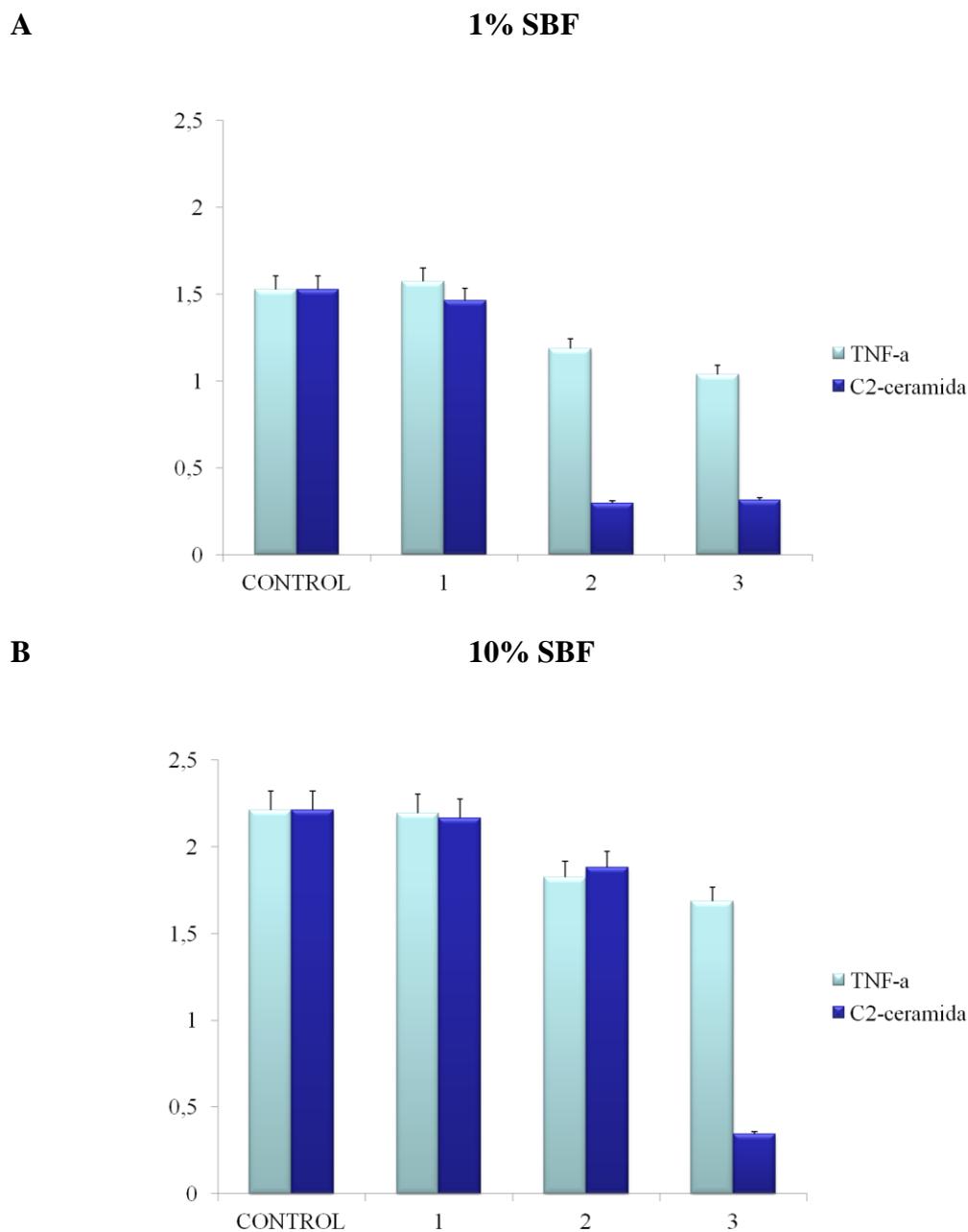


Figura 40. Análisis de tres experiencias independientes de proliferación celular de 72 h. en células del melanoma B16F1 tratadas con TNF- α o C₂-ceramida. (A) Cultivos al 1% de SBF. (B) Cultivos al 10% de SBF. La proliferación celular se cuantificó mediante el ensayo colorimétrico del XTT.

Capacidad clonogénica de las células del melanoma B16

El estudio consistió en cultivar las células del melanoma B16 durante un período de 7 días tratadas con C₂-ceramida. El número de colonias crecidas se visualizó mediante tinción con cristal violeta.

Los resultados de la capacidad de formación de colonias de las células del melanoma B16F1 tratadas con C₂-ceramida se recogen en la Tabla 8. El tratamiento con C₂-ceramida inhibe la capacidad clonogénica de las células del melanoma B16F1. Resultados similares se obtienen con las células del melanoma B16F10 (resultados no mostrados). Tanto la línea de melanoma B16F1, como la línea de melanoma B16F10, sufren un efecto de tipo lítico, que para concentraciones de 50 μ M de C₂-ceramida inhibe totalmente el crecimiento.

Tabla 8. Capacidad clonogénica de las células del melanoma B16F1 tratadas con C₂-ceramida. Las colonias obtenidas se cuantificaron mediante una tinción de cristal violeta.

C ₂ -ceramida (μ M)	Nº de colonias (rango)
0	47 (44-50)
10	34 (25-45)
25	18 (10-22)
50	0

2.10. Estudio de la capacidad de producción de TNF- α por las células del melanoma B16

Con el fin de estudiar si las células del melanoma murino B16 eran capaces de producir TNF- α , se sometieron los sobrenadantes al bioensayo de citotoxicidad de las células L929.

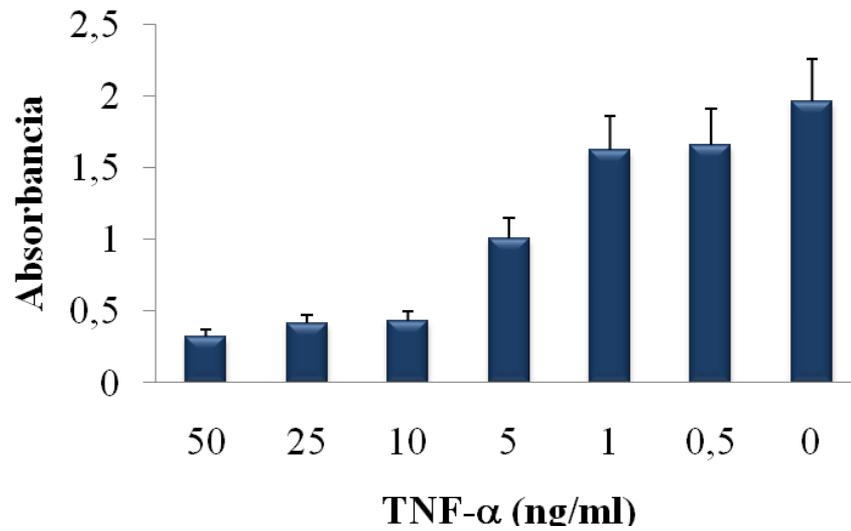
La curva patrón del ensayo de citotoxicidad de las células L929 en la que se observa que a concentraciones altas de TNF- α se da la máxima toxicidad, se muestra en la Figura 41A. A continuación, se analizó si los sobrenadantes de cultivos de células del melanoma B16F1 y B16F10 suplementados al 1% y 10% de SBF, durante 24, 48 y 72 h. eran capaces de producir TNF- α (resultados no mostrados). Sin embargo, no existe producción de TNF- α en ninguna de las condiciones testadas.

Una vez estudiado el comportamiento de las células del melanoma B16, se analizó si en los sobrenadantes de estas células estimuladas con IL-2, IL-6 o TNF- α se detectaba la presencia de TNF- α . Los datos obtenidos aparecen recogidos en la Figura 41B. Los factores empleados para tratar de estimular en las células del melanoma B16F10 la producción de TNF- α , resultan ser ineficaces.

Además de lo anterior, se cultivó las células del melanoma B16 en presencia de CsA y PMA, dos agentes activadores de las funciones celulares. Tanto la CsA, a distintas concentraciones y a tiempos de cultivo de 24, 48 y 72 h. como el PMA, a varias concentraciones no dan lugar a que se active la inducción de la producción de TNF- α (resultados no mostrados).

Las células del melanoma B16 no producen TNF- α .

A



B

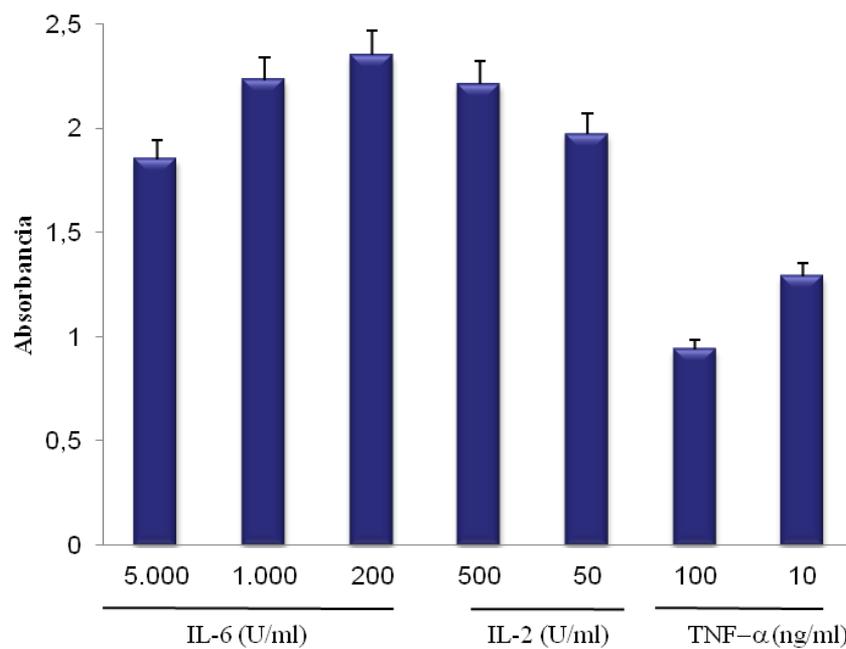


Figura 41. (A) Curva patrón de la producción de TNF- α por las células L929. (B) Sobrenadantes de las células del melanoma B16F10 tratadas con distintas dosis de IL-2 e IL-6 sometidos al ensayo de citotoxicidad de las células L929.

2.11. Inducción de la producción de IL-2 por TNF- α en las células del melanoma B16

Para estudiar si el TNF- α es inductor de la producción de IL-2 por el melanoma murino B16, se cultivaron las células en presencia de TNF- α . La determinación de la presencia de IL-2 en los sobrenadantes se realizó mediante el bioensayo con las células CTLL-2

Previamente a realizar el ensayo biológico con las células CTLL-2, se prepara la recta patrón de producción de IL-2, como se explica en detalle en el Apdo. de Materiales y Métodos 2.9. (Figura 9B).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 42. El tratamiento con TNF- α (0, 5, 50 y 500 ng/ml) durante 24, 48 y 72 h. no induce la producción de IL-2 en las células del melanoma B16F1 suplementadas al 1% y 10% de SBF. Resultados similares se obtuvieron con la línea del melanoma B16F10 (datos no mostrados).

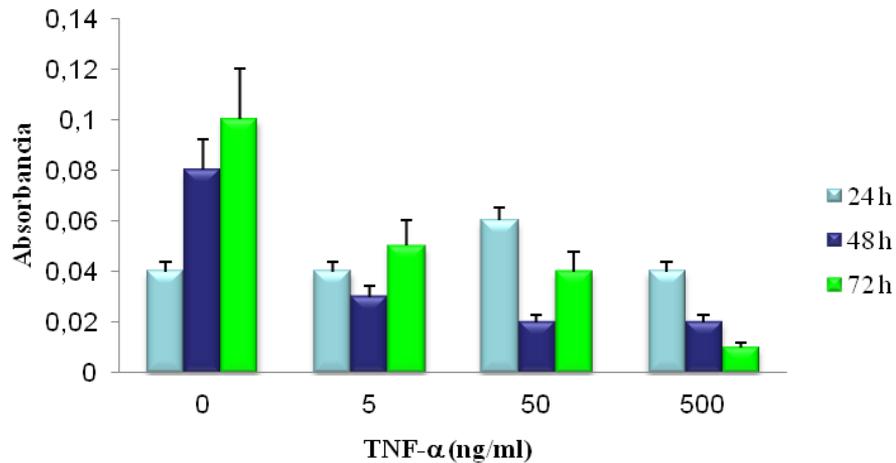
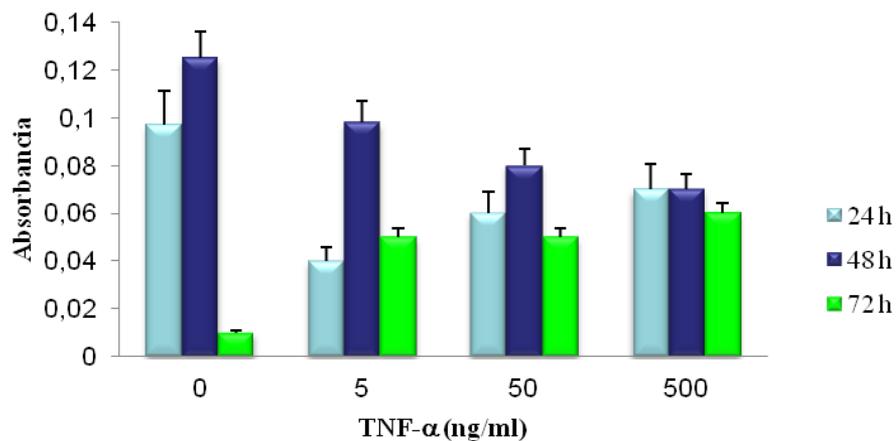
TNF- α no induce la producción de IL-2 en las células del melanoma B16.**A****Sobrenadantes de células B16F1, 1% SBF****B****Sobrenadantes de células B16F1, 10% SBF**

Figura 42. Inducción de la producción de IL-2 por TNF- α en las células del melanoma B16. (A) Sobrenadantes de las células B16F1 cultivadas al 1% SBF.

(B) Sobrenadantes de las células B16F1 cultivadas al 10% SBF. Datos obtenidos mediante el bioensayo de las células CTLL-2.

2.12. Inducción de la producción de IL-6 por TNF- α en las células del melanoma B16

Para estudiar si el TNF- α es inductor de la producción de IL-6 por el melanoma murino B16, se cultivaron las células en presencia de TNF- α . La determinación de la presencia de IL-6 en los sobrenadantes se realizó mediante un ensayo inmunoenzimático.

La línea de fibroblastos L929 se incluyó en el estudio debido a que producen IL-6 tras ser estimuladas con TNF- α y se incluyeron en el ensayo como control positivo. Se obtuvo una producción máxima de 175 pg/ml de IL-6 en respuesta al tratamiento con 100 ng/ml de TNF (Figura 43). La Figura 21 representa la curva patrón de producción de IL-6, mediante la cual se interpolan los valores de absorbancia obtenidos experimentalmente con el número de unidades de IL-6.

Se trató las células B16 con TNF- α y se sometieron al bioensayo de las L929, observando que no producen la IL-6 en ninguna de las condiciones testadas 1% y 10% de SBF y en ninguno de los tiempos de cultivo analizados: 24, 48, 72 y 96 h (datos no mostrados).

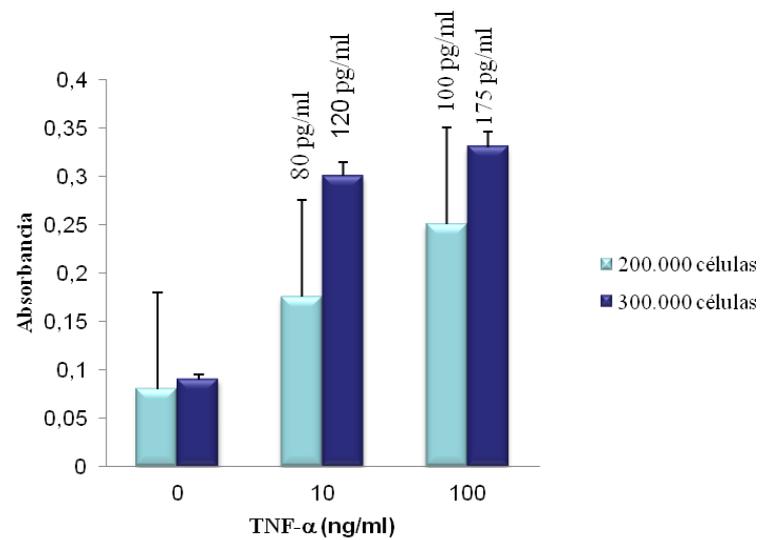
TNF- α no induce la producción de IL-6 en las células del melanoma B16.

Figura 43. Inducción de la producción de IL-6 por TNF- α en las células del melanoma B16. Los datos se obtuvieron mediante el bioensayo de citotoxicidad de las células L929.

2.13. Análisis de la capacidad proliferativa y clonogénica del TNF- α en las células del melanoma B16 pretratadas con la IL-2 y la IL-6

Por último, debido a los efectos observados de la IL-2 y de la IL-6, se plantearon nuevos ensayos de capacidad clonogénica y de proliferación celular con el objeto de analizar si ambas citocinas eran capaces de revertir los efectos de TNF- α en las células del melanoma B16.

Para ello, las células del melanoma B16F1 se pretrataron con 500 U/ml de IL-2, durante 24 h. y con 200 U/ml de IL-6 durante 48 h. y seguidamente se trataron con 100 ng/ml de TNF- α .

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 9. El pretratamiento con la IL-2 y la IL-6, no son capaces de revertir el efecto inhibitor del TNF- α sobre la biología de las células del melanoma B16F1. Similares resultados se observan con las células del melanoma B16F10 (datos no mostrados).

Tabla 9. Ensayos de capacidad clonogénica y proliferación celular de las células del melanoma B16F1 tratadas con IL-2 durante 24 h. o tratadas con IL-6 durante 48 h. a las dosis indicadas.

Tratamiento	Proliferación celular (% de inhibición)	Formación de colonias Nº de colonias (Rango)	
		Control	TNF- α (100 ng/ml)
Ninguno	27,50	19 (17-24)	0
IL-6 (200 U/ml)	27,14	18 (15-25)	1 (0-2)
Ninguno	35,50	15 (8-20)	2 (0-4)
IL-2 (500 U/ml)	37,70	21 (15-25)	3 (1-6)

V. DISCUSIÓN

Las citocinas que se producen en el microentorno tumoral, tanto si son producidas por las propias células tumorales como si provienen de las células del estroma o que infiltran el tumor, pueden constituir un factor fundamental que contribuye a definir las capacidades de las células tumorales y por tanto la progresión tumoral. Aunque esta idea se propuso desde hace muchos años, durante mucho tiempo se ha mantenido en un “estado difuso”. Los datos acumulados en la última década, sin embargo, han confirmado esta hipótesis, subrayando la especial relevancia de las citocinas proinflamatorias en el desarrollo del cáncer.

En el caso del melanoma, las citocinas, como factores implicados en la modulación de la actividad de las células del sistema inmune, pueden tener una relevancia especial ya que el melanoma es un tipo tumoral altamente inmunogénico y además, muchas de las estrategias actuales de tratamiento se basan en la utilización de estos factores, como es el caso de la IL-2.

Utilizando el modelo de melanoma experimental B16, nuestra línea de investigación se ha centrado en el estudio de la participación de citocinas proinflamatorias en la adquisición de un fenotipo metastático. Así, en resultados previos habíamos obtenido que células B16F10 cultivadas en presencia de IL-2 o de IL-6 inducían un aumento de la ocupación metastática *in vivo* (Boyano y cols., 1997; García de Galdeano y cols., 1998).

Para intentar averiguar el mecanismo responsable del efecto protumoral de la IL-2 y la IL-6, en este trabajo quisimos profundizar en el rol de estas citocinas en la modulación de la actividad de las células del melanoma B16, utilizando sublíneas de distinta capacidad metastática. Así mismo incluimos el estudio del TNF, otra importante citocina proinflamatoria y exploramos posibles interacciones entre estas citocinas en este modelo de melanoma experimental.

Los datos obtenidos revelan que tanto la IL-2 e IL-6 como el TNF modulan directamente la actividad de las células de melanoma. Las células B16 de distinta capacidad metastática (B16F1 y F16F10) responden de forma similar a estos factores, si bien con diferencias en magnitud. *In vitro*, estos factores no son inductores de los procesos celulares típicamente asociados al fenotipo metastático como la capacidad de invasión, actividad clonogénica o proliferativa, que de hecho en algunos casos están regulados negativamente, sin embargo, la modulación de la expresión de moléculas de superficie apunta a que la IL-2, IL-6 y el TNF podrían actuar como factores de

supervivencia para las células del melanoma B16; posiblemente utilizando distintos mecanismos y que en el caso del TNF estaría mediado por la inducción del regulador del ciclo celular p21. Estos resultados están de acuerdo con otros trabajos posteriores que han demostrado la actividad protumoral de estas citocinas y su importancia en el melanoma.

1. Estudio de la IL-2 e IL-6 en el melanoma B16

1.1. Efecto inducido por IL-2: modulación de la invasión y la expresión de ICAM-1

El tratamiento *in vitro* con IL-2 indujo un descenso en la capacidad de invasión de las células de melanoma, que fue más pronunciado en el caso de las células de mayor capacidad metastática B16F10. La IL-2 indujo también una menor expresión de la molécula ICAM-1 aunque la capacidad de adhesión general no resultó modificada. La IL-2 no resultó tóxica para las células ni siguió a las dosis más altas utilizadas y la actividad proliferativa se mantuvo inalterada. En cuanto a la actividad clonógena se registró un cierto incremento en el caso de las células B16F1, si bien, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Además, el tratamiento con IL-2 revertió en parte el efecto inhibitorio de la Actinomicina D, inductor de estrés celular. Por último, el análisis de la expresión del receptor demostró la presencia de la subunidad beta del RIL-2, pero no de la subunidad alfa. Tampoco se detectó presencia de IL-2 soluble liberada por las células del melanoma B16. Estos resultados confirman que las células del melanoma son capaces de responder a la IL-2. Además, aunque no podemos excluir otras posibilidades, los resultados sugieren un rol protector de la IL-2 para las células B16 que podría estar relacionado con el efecto prometastático registrado *in vivo*.

La capacidad de atravesar la membrana basal y/o la matriz extracelular es, junto con la capacidad de proliferación, la principal característica que define a una célula tumoral capaz de producir metástasis. Basándonos en esto, decidimos realizar el ensayo de invasión en matrigel, habitualmente utilizado para determinar *in vitro* esta propiedad.

Sin embargo resultó que la IL-2 suprimía la invasión, un efecto más marcado en el caso de la sublínea B16F10 y menor en B16F1. En cualquier caso, es evidente que la IL-2, de forma directa o indirecta, está regulando el proceso de invasión.

La comprensión de los mecanismos de invasión ha avanzado de forma considerable en la última década. Así, se han propuesto dos mecanismos de migración fundamentales que pueden ser utilizados por las células invasivas y que implican modificaciones del citoesqueleto diferentes y la participación de distintas proteínas reguladoras (Sahai y Marshall, 2003; Wang y cols., 2005; Guarino y cols., 2007; Yamaguchi y Condeelis, 2007; Pinner y Sahai, 2008; Linder, 2009; Yilmaz y Christofori, 2010; Nürnberg y cols., 2011; Sanz-Moreno, 2012).

En un tipo de invasión se produce la llamada transición epitelio-mesenquimática (EMT) durante la que se rompen los contactos celulares con pérdida de cadherina y aumenta la motilidad, por lo que se ha asociado a progresión tumoral y metástasis (Guarino y cols., 2007; Tse y Kalluri, 2007; Friedl y Wolf, 2009; Wells y cols., 2013). En este caso, las células adquieren morfología fibroblástica con un frente diferenciado y generación de cables corticales de actina y fibras de estrés. También se crean estructuras de adhesión focales y se produce proteólisis de la matriz extracelular, fundamentalmente mediante las metaloproteinasas (MMPs) (Itoh y cols., 2006; Li y Lin, 2008).

Existe otro modo de invasión en el que las células adquieren forma redondeada y exhiben en su superficie “blebs” altamente dinámicos. Es un movimiento de tipo ameboide que no requiere proteólisis pericelular ni formación de contactos focales por lo que es más rápido. Está mediado por la proteína Rho, que junto con Cd42 y Rac1 constituyen los principales miembros de la familia de Rho-GTPasas, importantes reguladores del citoesqueleto (Ridley, 2001); y por la proteína ROCK, de la familia de quinasas activadas por Rho. En este tipo de motilidad también participa la proteína ezrina, de la familia ERM (ezrina-radixina-moesina), que entre otras funciones, une los filamentos de actina a la membrana plasmática (Grosse y cols., 2008; Eitaki y cols., 2012). El modo mesenquimático sin embargo, no depende de Rho ni de ROCK, pero sí de Rac1; otro miembro de la familia de Rho-GTPasas.

Por otra parte, factores externos pueden inducir la transición del tipo de movilidad mesenquimático al ameboide (Wolf y cols., 2003; Torka y cols., 2006; Croft y Olson, 2008; Friedl y Wolf., 2009; Parri y Chiarugi, 2010; Sanz-Moreno y Marshall, 2009; Calvo y cols., 2011; Tam y Weinberg, 2013). Esto explicaría porqué no se inhibe la invasión de células tumorales cuando se inhibe una de las vías: parece ser que la otra vía es capaz de compensar el efecto inhibidor.

En melanoma diversos estudios han demostrado la participación de las MMPs en la actividad invasiva de las células (Hofmann y cols., 2000; Eves y cols., 2003), sin embargo, estudios posteriores han descrito la existencia de ambos estilos de invasión según la línea celular, con distinta participación de moléculas de la familia de Rho-GTPasas (Ruth y cols., 2006; Gaggioli y Sahai, 2007; Gadea y cols., 2008; Klein y Aplin, 2009; Lindsay y cols., 2011; Ho y cols., 2012; Grahovac y cols., 2013), e incluso la transición de un tipo de movilidad al otro (Hegerfeldt y cols., 2002; Sanz-Moreno y cols., 2008; Orgaz y Sanz-Moreno, 2012).

¿Qué tipo de invasión utilizan las células del melanoma B16? Parece variar en función de la línea. En células de la línea B16F10 se ha descrito mayor actividad Rac1 que en la línea parental, asociada a mayor invasión (Kurusu y cols., 2005), lo que sugiere movimiento mesenquimático. Este mismo modo de invasión se ha descrito en estudios posteriores y en otras sublíneas de B16 (Parri y Chiarugi, 2010; Kushiro y Nuñez, 2011). En B16F1 la inducción de la actividad invasiva se ha asociado a inducción de la expresión de RhoC (Clark y cols., 2000), lo que sugiere un movimiento ameboide.

En nuestro trabajo pudimos apreciar esta diferencia entre sublíneas en cuanto al modo de invasión ya que el análisis morfológico de las células B16F1 mostraba más imágenes de tipo “blebbing” que en las células B16F10. En cualquier caso, y aunque se ha descrito que la activación de Rho y de Rac sigue pautas diferentes en B16F1 y B16F10 (Scott y Leopardi, 2003), parece que ambos tipos de invasión se pueden producir en la misma sublínea de B16, es decir, que puede haber un cambio de mesenquimático a ameboide, según las condiciones (Parri y Chiarugi, 2010).

Existen pocas referencias que describan el efecto de la IL-2 sobre la capacidad de invasión. Los datos disponibles se centran en células de tipo linfoide. Tras un trabajo inicial que reportaba un efecto inhibitorio sobre la migración de células T (Hoon y cols., 1986), se propone un efecto estimulador sobre la migración de linfocitos T activados por IL-2 y de células LAK (Kornfeld y cols., 1985; Pankonin y cols., 1992; Ratner y cols., 1992; Kitayama y cols., 1993; Wilkinson y Newman; 1994; Ariel y cols., 1998).

Por otra parte no existen apenas datos de modulación de invasión mediada por IL-2 sobre células tumorales: estudiando el efecto de IL-2 sobre invasión de células de glioma, no se detectan cambios (Pedersen y cols., 1994); otro estudio sin embargo, describe la degradación de la matriz extracelular mediada por MMP-9 por células de linfoblastoma T inducida por IL-2 (Xia y cols., 1996). No parece haber datos posteriores que confirmen la actividad promigratoria y proinvasiva de la IL-2.

Sin embargo, sí se ha confirmado la reorganización del citoesqueleto de mediada por IL-2, aunque es llamativa la escasez de referencias teniendo en cuenta los evidentes cambios en la morfología de las células T asociados a la respuesta a la IL-2. Herblot y cols. (1999), estudiando una batería de genes en linfocitos T citotóxicos, demostraron un incremento en la expresión de α -tubulina o β -catenina. Así mismo, en células T activadas por mitógenos, IL-2 indujo la expresión y la polimerización de actina y sobre todo de

tubulina (Goebel y cols., 2006). Otros autores han descrito la interacción directa del RIL-2 con el citoesqueleto que precede a la endocitosis del complejo tras unión con la IL-2 (Pillet y cols., 2010). Además, se ha propuesto que la interacción entre el RIL-2 y el citoesqueleto se produce a través de la activación de Rac1 (Basquin y Sauvonnnet, 2013).

Así mismo, en células NK la reorganización de actina inducida por IL-2 es esencial para su actividad lítica: aumenta la concentración de actina y la sinapsis inmunológica. Este efecto está mediado por WAVE-2, uno de los miembros de la familia WASP, que interacciona con Arp2/3 y facilita la polimerización de G actina (Orange y cols., 2011). En el melanoma B16, sin embargo, el papel de WAVE-2 se ha asociado a una mayor capacidad invasiva (Kurisu y cols., 2005), por lo que no parece probable que IL-2 afecte al citoesqueleto de las células B16 mediante los mismos mecanismos que en el linfocito T.

En cualquier caso, el efecto de IL-2 sobre migración e invasión podría ser más complejo, con cambios a lo largo del tiempo. En células NK se ha descrito un aumento inicial de MMP-9 y de invasión en matrigel, pero más tarde se produce inhibición: un pretratamiento de 48 horas con IL-2 indujo un efecto negativo sobre migración (Edsparr y cols., 2010). Un efecto similar podría estar teniendo lugar en las células B16 ya que las fueron incubadas con IL-2 durante 24-48 horas antes de realizar el ensayo de invasión.

Otros trabajos que describen la inhibición de la actividad invasiva de las células B16 proponen distintos mecanismos como la disminución de actividad MMP o de proteínasas de la familia de catepsinas (Murata y cols., 1997; Sever y cols., 2002; Gava y cols., 2006; Rondepierre y cols., 2010; Yang y cols., 2010; Zhang y cols., 2014). Es interesante señalar que la IL-2 está involucrada en la regulación de las catepsinas en células NK induciendo precisamente la síntesis de cistatinas, inhibidores de catepsinas (Maher y cols., 2014) por lo que podríamos hipotetizar que esta vía, es decir, la inhibición de las catepsinas, podría ser la vía utilizada por IL-2 para regular negativamente la invasión en las células B16.

Otro parámetro que afecta a la invasión es la capacidad de adhesión. En el ensayo de adhesión a matrigel no hubo cambios en ninguna de las sublíneas; sin embargo, la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 fue menor por efecto de la IL-2.

ICAM-1 (CD54) pertenece a la familia de la superfamilia de las inmunoglobulinas y es el ligando de LFA-1. ICAM-1 se expresa en células del endotelio y la interacción ICAM-1/LFA-1 parece esencial para la extravasación leucocitaria y es regulada

positivamente durante los procesos inflamatorios (Vestweber, 2007; Lawson y Wolf, 2009; Rahman y Fazal, 2009). Dado que ICAM-1 favorece la migración transendotelial, una menor expresión en las células de melanoma sugiere una menor capacidad de invasión, tal como se ha visto en otros tipos tumorales (Rosette y cols., 2005).

En melanoma humano inicialmente se propuso una correlación entre mayor expresión de ICAM-1 y progresión tumoral (Johnson y cols., 1989; Natali y cols., 1990). Posteriormente sin embargo, se ha descrito una correlación inversa (Hamai y cols., 2008). Así, clones de células metastáticas expresan menos ICAM-1 lo que les confiere resistencia a la lisis por linfocitos T. Los autores demuestran correlación inversa entre los niveles de ICAM-1 y activación de la vía de supervivencia PI3K/AKT (Vanhaesebroeck y cols., 2012) que es utilizada para escapar de la acción lítica de linfocitos T. En células B16 también se ha demostrado que si disminuye la expresión de ICAM-1 aumenta el potencial metastático, pero en este caso se ha asociado a una menor infiltración linfocitoria al tumor y no tanto a la evasión directa de la acción lítica (Yamada y cols., 2005).

Es interesante señalar que la vía PI3k/AKT, media el rol antiapoptótico de la IL-2 (Lindemann y cols., 2003; Taniguchi y cols., 2004). El papel de la IL-2 como factor de supervivencia se ha demostrado ampliamente en células linfoides (Duke y Cohen, 1986; Zubiaga y cols., 1992; Armant y cols., 1995; Min y cols., 1995; Rebollo y cols., 1995). Además, se ha descrito que la señal de supervivencia mediada por IL-2 se produce sin afectar a la actividad proliferativa (Boise y cols., 1995; Zamorano y cols., 1998). En nuestro trabajo no encontramos regulación de la proliferación de las células B16 en ningún sentido: no hubo inhibición ni a las dosis más altas testadas; sin embargo hubo un ligero incremento en la actividad clonogénica, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Por otra parte, PI3K/AKT parece ser un elemento clave que liga el RIL-2 con el citoesqueleto a través de la activación de Rac1 (Basquin y Sauvonnnet, 2013). Aunque nosotros no hemos determinado la expresión de PI3k/AKT en las células B16, podemos hipotetizar que IL-2 podría resultar un factor protector para las células tumorales B16.

En nuestro trabajo se registró una disminución en la expresión de ICAM-1 (en torno al 15%) por efecto de IL-2 en B16F1, pero no en B16F10. No podemos concluir, por tanto, que la modulación de ICAM-1 esté involucrada en el efecto prometastático de la IL-2 observado in vivo (Boyano y cols., 1997), ya que las experiencias se habían realizado con B16F10.

Así todo, resultados recientes sugieren que IL-2 induce de alguna manera un aumento de la supervivencia de las células B16. En un trabajo reciente se monitoriza in vivo el efecto de la producción local de IL-2 utilizando B16F10 transfectadas con IL-2: aunque baja el crecimiento tumoral debido fundamentalmente a lisis por células T, un pequeño número de células perdura y da lugar a metástasis, lo que sugiere que los cambios inducidos por la IL-2 en las células B16 puede estar favoreciendo de alguna manera la actividad tumoral de estas células (Gerber y cols., 2012). Los autores proponen que las células entran en un estado “durmiente” que puede ser prolongado en el tiempo. Este estado “durmiente” parece ser especialmente relevante en la diseminación del melanoma humano y puede ser inducido por el microambiente tumoral (Ossowski y Aguirre-Ghiso, 2010; Bragado y cols., 2012).

1.2. Expresión del sistema IL-2/RIL-2 en el melanoma B16

La presencia del sistema IL-2/RIL-2 se considera muy restringida, limitándose a células de tipo linfóide. Sin embargo unos pocos grupos han estudiado la expresión y actividad de este sistema de señalización en células no linfoides. Así, su presencia se describió en células de la glándula pituitaria (Arz y cols., 1992; Arz y cols., 1993), en células de tipo fibroblástico (Plaisance y cols., 1994; Gruss y cols., 1996; Corrigan y cols., 2001); y más recientemente, en células endoteliales (Krieg y cols., 2010; Jen y cols., 2012).

En el caso de células tumorales, la expresión del sistema IL-2/RIL-2 se ha estudiado fundamentalmente en células de carcinoma por el grupo de Theresa L. Whiteside (Weidmann y cols., 1992; Yasumura y cols., 1994; Lin y cols., 1995; Reichert y cols., 2000), y en melanoma, por el grupo de Azzarone (Alileche y cols., 1993; Plaisance y cols., 1993; Han y cols., 1996; Azzarone y cols., 1996; Doucet y cols., 1997), además de nuestro propio grupo (García de Galdeano y cols., 1996; Boyano y cols., 1997; Boyano y cols., 1997(a); Boyano y cols., 1999; Boyano y cols., 2000; García-Vázquez y cols., 2000; García de Galdeano y cols., 2001).

Como ya se ha mencionado, el estudio de la expresión del sistema IL-2/RIL-2 en las células B16 reveló que ambas sublíneas expresan la subunidad beta del RIL-2, sin embargo no expresan la subunidad alfa y no producen IL-2 soluble.

El receptor funcional de la IL-2 está formado por 3 subunidades, alfa, beta y gamma en el linfocito Th activado, aunque las subunidades $\beta\gamma$ son los componentes responsables de la transmisión de la señal (Malek y Castro, 2010). De hecho, aunque la subunidad alfa tiene un papel muy importante en la activación de células T y es responsable de la alta afinidad del receptor funcional, otros tipos linfoides como T citotóxicos CD8+ sólo expresan $\beta\gamma$; además tampoco es necesaria para la activación de las células NK (Minami y cols., 1993; Gaffen y cols., 2001; Kim y cols., 2006; Pillet y cols., 2010; Waysbort y cols., 2013).

En células fibroblásticas, aunque un estudio previo había descrito la expresión de las subunidades alfa y beta (Gruss y cols., 1996), otro estudio posterior identifica las subunidades $\beta\gamma$, pero no la alfa (Corrigall y cols., 2001). Por otra parte, en células endoteliales, el RIL-2 parece estar formado por las 3 cadenas (Kriegg y cols., 2010).

En melanoma humano la composición del RIL-2 parece variar en función de la línea estudiada o del tipo de lesión. Así, aunque varios estudios describen la expresión de las tres subunidades del RIL-2 (Plaisance y cols., 1994; Han y cols., 1996; Doucet y cols., 1997; García-Vázquez y cols., 2000), Doucet y cols., obtienen líneas de melanoma que expresan sólo $\beta\gamma$; así mismo, el análisis de lesiones de melanoma mostró la presencia de la subunidad beta pero no la alfa (McMillan y cols., 1995). De acuerdo con esto, en un estudio reciente se describen 3 líneas de melanoma que expresan RIL-2 que no contiene la subunidad alfa (Jen y cols., 2012). Los autores demuestran la funcionalidad del receptor por activación de STATs específicas y también porque las células eran respondían a IL-15, que, al igual que la IL-2, utiliza las subunidades $\beta\gamma$ para transducir la señal. De forma similar, nuestros resultados indican que las subunidad alfa no es necesaria para inducir modulación de la actividad de las células B16.

Por otra parte, se han descrito niveles de expresión altos en melanoma humano, superiores al 50%. Nosotros también obtuvimos un porcentaje de expresión alto cuando realizamos el análisis de citometría de flujo utilizando células fijadas, sin embargo la expresión cambió totalmente cuando se analizaron células sin fijar, desapareciendo prácticamente en el caso de la subunidad alfa, lo que indica que las diferencias mencionadas pueden deberse a cuestiones metodológicas.

En nuestro estudio no hemos determinado la expresión de IL-2R gamma, por lo que no podemos excluir que sea un componente del RIL-2 en las células B16. En cualquier caso la expresión sólo de la subunidad beta puede ser suficiente para transmitir

la señal. Así, se ha descrito la presencia de homodímeros de RIL-2 beta capaces de unirse a la IL-2 y formar complejos funcionales (Pillet y cols., 2008).

La regulación del receptor se ha estudiado a fondo en las células linfoides y se ha demostrado que está regulada por la propia IL-2 (Depper y cols., 1985; Pillet y cols., 2010), y es precisamente la expresión de la subunidad alfa la que aumenta considerablemente. Nosotros hemos estudiado esta posible inducción, pero el tratamiento con IL-2 sin embargo, no estimuló la expresión de este componente en ninguna de las sublíneas de B16; aunque sí aumentó los niveles de la subunidad beta.

En cuanto a la producción de IL-2, se ha descrito expresión de IL-2 por líneas de melanoma humano y en lesiones in situ (Alileche y cols., 1993, McMillan y cols., 1995; García-Vázquez y cols., 2000). También en líneas de carcinoma humano (Lin y cols., 1995; Reichert y cols., 2000) y en células de la pituitaria (Arz y cols., 1992). Estos trabajos demuestran expresión a nivel del mensajero y también, en algunos casos, la presencia de IL-2 endógena pero unos niveles muy bajos de IL-2 liberada en el medio de cultivo. Nuestros resultados mostraron que las células B16 no liberan espontáneamente IL-2, lo que sugiere que una utilización paracrina del factor por las células B16, sin excluir la posibilidad de la expresión endógena de IL-2.

1.3. Efecto inducido por IL-6: modulación de la invasión y de la expresión de VLA-4

El tratamiento *in vitro* con IL-6 indujo supresión de la actividad invasiva en ambas sublíneas; sin embargo se produjo un aumento de adhesión inducido tal como mostró el ensayo de adhesión a matrigel o la expresión de VLA4- α . La IL-6 no resultó tóxica para las células ni siguió a las dosis más altas utilizadas, y la actividad proliferativa se mantuvo inalterada. En cuanto a la actividad clonógena se registró un cierto descenso en el caso de las células B16F10, si bien, las diferencias no fueron estadísticamente significativas; sin embargo, aumentó la resistencia a Actinomicina D. Por último, no hubo liberación de IL-6 por las células de melanoma en condiciones basales, ni cuando las células se estimularon con PMA. Estos resultados sugieren que; aunque sin excluir otros posibles mecanismos, la modulación de las propiedades de adhesión podría ser un mecanismo responsable del efecto prometastático de la IL-6 que habíamos registrado en trabajos previos (García de Galdeano y cols., 1998); y que podría favorecer la extravasación de las células B16 y colonización de órganos como el hígado o pulmón.

Los primeros estudios sobre la IL-6 y el melanoma enfocaban el rol de IL-6 como un factor producido por las células del sistema inmune con actividad antitumoral. Estos trabajos describían la existencia de células de melanoma susceptibles y resistentes a la acción inhibitoria de la IL-6. La adquisición de resistencia se asociaba a progresión tumoral e incluso se proponía que en este proceso la IL-6 se podría convertir en un factor de crecimiento que podrían utilizar de forma autocrina las células de estadios avanzados de melanoma (Lu y Kerbel, 1993; Silvani y cols., 1995; Florenes y cols., 2000; Bohm y cols., 2001).

Estudios posteriores han confirmado que las células de melanoma, sobre todo de mayor malignidad son resistentes a un efecto inhibitorio de la IL-6 y el efecto protumoral de esta citocina se ha comprobado en modelos de ratón deficientes en IL-6: los ratones IL-6^{-/-} eran más resistentes al desarrollo de melanomas inducidos (von Felbert y cols., 2005). La IL-6 favorece las vías de supervivencia, pero más recientemente, se ha descrito que la IL-6 también promueve angiogénesis en melanoma (Karst y cols., 2009), o que favorece la evasión de la actividad del sistema inmune al inducir la liberación de otra citocina, la IL-10, un potente factor inmunosupresor (Terai y cols., 2012).

En el melanoma B16 se han descrito efectos contrapuestos de la IL-6. Los primeros trabajos sugerían un rol antitumoral para la IL-6. De acuerdo con esto, el tratamiento con IL-6 eliminaba la colonización metastática (Katz y cols., 1993) y el crecimiento tumoral era menor cuando las células B16 eran transfectadas con IL-6 (Sun y cols., 1992; Cao y cols., 1995; Mackiewicz y cols., 1995; Ledda y cols., 1996) o bien con IL-6 junto con el receptor soluble sIL-6R (Ozbek y cols., 2001).

A diferencia de estos resultados, McKenzie y cols. (1994) observaban un mayor crecimiento tumoral cuando los ratones eran inoculados con IL-6, lo que coincidía con nuestros propios resultados (García de Galdeano y cols., 1998). Posteriormente se ha confirmado el efecto protumoral de la IL-6 en el melanoma B16 y se han propuesto distintos mecanismos. Así, en células B16F10 la IL-6 induce la expresión de factores asociados con progresión tumoral como la enzima iNOS (sintasa inducible de óxido nítrico) (Kang y cols., 2007). Otros autores describen la inducción por IL-6 de la transición epitelio-mesenquimática asociada a una mayor capacidad de invasión (Kushiro y Nuñez, 2012).

Nuestros resultados sugieren que otro mecanismo responsable del efecto prometastático de la IL-6 podría ser la modulación de la capacidad de adhesión, que

podría estar mediada por un aumento de VLA-4, una molécula de la familia de las integrinas de gran relevancia en la biología tumoral (Hood y Cheresh, 2002; Moschos y cols., 2007; Desgrosellier y Cheresh, 2010).

Los cambios en los niveles de expresión de VLA-4 obtenidos en nuestro trabajo no son de gran magnitud, aun así, podrían ser relevantes para la eficacia de la adhesión de las células B16 al endotelio. De hecho, incluso sin que se modifique el nivel de expresión, cambios en el estado de activación de la molécula (Chigaev y cols., 2003; Chigaev y cols., 2007) o en la organización espacial de VLA-4 en la superficie de las células (Wang y cols., 2011) pueden tener consecuencias sobre la capacidad de adhesión.

En melanoma humano, la expresión de integrinas, y más en concreto, la expresión de VLA-4 se ha asociado a un aumento en la capacidad metastática (Holzmann y cols., 1998; Johnson, 1989; Kuphal y cols., 2005). Este aumento se debe a que VLA-4 que favorece la interacción con el endotelio y por tanto la extravasación y formación de focos secundarios en nuevas localizaciones. Así mismo, la expresión de VLA-4 se ha asociado con progresión tumoral, tal como se ha visto en pacientes de melanoma (Schadendorf y cols., 1995).

Tanto en melanoma como en otros tipos tumorales, la adhesión de VLA-4 al endotelio del órgano diana está mediada por la molécula VCAM expresada en las células endoteliales y la inhibición de la interacción VCAM-VLA-4 por anticuerpos monoclonales o por otros agentes resultaba en una menor colonización metastática (Menter y cols., 1995; Garofalo y cols., 1995; Saini y cols., 1997; Danen y cols., 1998; Klemke y cols., 2007; Liang y Dong, 2008). Dada la relevancia de la interacción VLA-4/VCAM para el desarrollo tumoral de melanoma, se han propuesto nuevas estrategias terapéuticas basadas en su bloqueo (Fritzsche y cols., 2008; Schlesinger y cols., 2012).

En melanoma B16 se han obtenido resultados similares tras bloqueo de la adhesión mediada por VLA-4 (Xu y cols., 1998; Langley y cols., 2001; Ledezma y cols., 2004), aunque estos estudios no dejaban claro cuál era el mecanismo exacto implicado. Así mismo, en células B16, la inducción de la expresión de VLA-4 por estimulación con otras citocinas (Okahara y cols., 1994; Anasagasti y cols., 1996; Valcárcel y cols., 2014) conducía a mayor actividad metastática.

La mayor expresión de VLA-4 se asocia a metástasis, por ser un elemento clave en la adhesión de las células de melanoma al endotelio, pero este efecto puede ser

independiente del efecto directo sobre invasión. De hecho, aunque se ha descrito interacción directa entre VLA-4 y el citoesqueleto con activación de vías que conducen a la regulación de formación de fibras de estrés y contactos focales (Mostafavi-Pour y cols.; 2003; Peterson y cols., 2005), la implicación directa de VLA-4 en el proceso de invasión no está bien definida.

En melanoma humano, varios trabajos han descrito la asociación entre VLA-4 e invasión (Xu y cols., 1998; Liu y cols., 2002; Moyano y cols., 2003; Klemke y cols., 2007; Liang y Dong, 2008; Lee y cols., 2009), sin embargo, otras integrinas como $\alpha\beta3$ y $\alpha5\beta1$ parecen estar ser más directamente responsables de la capacidad invasora (Seftor y cols., 1999, Dang y cols., 2006).

Así mismo, en melanoma se han encontrado antagonismos entre diferentes integrinas que conllevan un feedback negativo en cuanto a su efecto sobre la invasión: $\alpha4\beta1$ regula negativamente la actividad de $\alpha5\beta1$, de forma que mientras que $\alpha5\beta1$ induce la liberación de MMP2 y MMP7 y aumenta la invasión, como consecuencia de su interacción con $\alpha4\beta1$, se elimina este efecto. De hecho se ha encontrado asociación entre upregulación de $\alpha4\beta1$ y downregulación de MMPs (Huhtala y cols., 1995; Misra y cols., 2005). De acuerdo con esto, en melanoma B16, se ha demostrado que el aumento de la expresión de VLA-4 conduce a una pérdida de la capacidad invasiva (Qian y cols.; 1994).

Nuestros resultados, confirman los obtenidos por estos autores: podría ser que el aumento de VLA-4 confiera a las células más posibilidad de adhesión al endotelio *in vivo* pero que VLA-4 contribuya al menos en parte a un descenso en la invasión; sin excluir que ambos efectos sean independientes. En cualquier caso es interesante la relación entre VLA-4 e IL-6, ya que la unión de VLA-4 con su ligando parece que induce la expresión de IL-6 en células endoteliales (Zohlhofer y cols., 2000), lo que podría contribuir al microambiente tumoral.

Independientemente de su efecto sobre VLA-4, la IL-6 podría modular la capacidad de invasión por otros mecanismos. Sin embargo, en general la IL-6 se considera proinvasiva. Este efecto proinvasivo se ha descrito para linfocitos T, fibroblastos o células del trofoblasto (Weissenbach y cols., 2004; Yamaguchi y cols., 2008; Jovannovic y Vicovac, 2009) y para distintos tipos tumorales como linfomas, cáncer de ovario, de mama y otros carcinomas (Obata y cols., 1997; Kossakowska y cols., 1999; Lin y cols., 2007; Rodier y cols., 2009; Tang y cols., 2011). Se ha propuesto como mecanismo la activación de proteínas de las metaloproteinasas (MMPs) y también se ha involucrado la

vía RhoA/ROCK. Además, en un trabajo reciente, la IL-6 se ha involucrado en la inducción de la transición epitelio-mesenquimática que conduce a mayor invasión (Kushiro y cols., 2012).

Por otro lado, también se ha descrito que la IL-6 inhibe migración linfocitaria en linfomas de células B (Lu y cols., 2007), o que el efecto puede depender de la dosis de IL-6 utilizada (Hsu y Chung, 2006). En el tratamiento de las células B16 utilizamos altas dosis de IL-6 (2000 U/ml), lo que pueda explicar en parte nuestros resultados.

De forma paralela al estudio con la IL-2, determinamos la actividad proliferativa y clonogénica de ambas sublíneas B16 en presencia de IL-6, pero no registramos ningún efecto. Sin embargo, al igual que con la IL-2, obtuvimos que las células tratadas previamente con IL-6 superaban el efecto negativo inducido por Actinomicina D, recuperando su actividad normal. Estos resultados apuntan a un rol de factor de supervivencia para IL-6 en las células del melanoma B16 que podría subyacer al efecto prometastático in vivo que habíamos obtenido en estudios previos por tratamiento in vitro de las células B16 con IL-6.

El efecto antiapoptótico de IL-6 se ha demostrado sobre células del sistema inmune y otros tipos celulares (Teagge y cols., 1997). Muchos de los efectos protumorales de la IL-6 se han asociado a la activación de STAT3, ya que desaparecen con la eliminación de este factor de transcripción.

STAT3, un elemento crucial en la transmisión intracelular de la señal IL-6 (Ihle, 2001), ha adquirido un claro protagonismo en la biología tumoral (Bromberg y cols., 1999; Yu y Jove, 2004; Huang, 2007; Yu y cols., 2007; Aggarwal y cols., 2009).

Aunque se había descrito inhibición de este factor asociada al desarrollo de resistencias a IL-6 (Bohm y cols., 2001), estudios posteriores apuntan claramente a una participación de STAT3 en el desarrollo tumoral y metastático del melanoma, en gran parte debido a su efecto en la supervivencia de las células, es decir, como agente antiapoptótico (Niu y cols., 2002; Xie y cols., 2004; Kortylewski y cols., 2005; Homsy y cols., 2006; Xie y cols., 2006; Messina y cols., 2008; Nicholas y Lesinski, 2011).

Aunque nosotros no hemos determinado la expresión de STAT3, podríamos hipotetizar que su activación podría estar implicada en el efecto prometastático de la IL-6

al favorecer la supervivencia o la resistencia al sistema inmune de las células tumorales, lo que estaría de acuerdo con los estudios de Niu y cols. (1999, 2001) en el melanoma B16, y de otros autores (Alshamsan y cols., 2010; Kong y cols., 2010; Alshamsan y cols., 2011). Sin embargo esta hipótesis estaría en desacuerdo con los resultados de Yang y cols. (2010), según los cuales STAT3 es esencial para la actividad invasiva de las células y ésta se pierde si se bloquea la expresión de STAT3. Teniendo en cuenta este dato, parece poco probable que el efecto de la IL-6 esté mediado por STAT3 en nuestro modelo.

En cualquier caso otros mecanismos podrían estar involucrados en el rol protector de la IL-6 sobre las células de melanoma. Así, estudios *in vivo* realizados por el grupo de Estrela y cols. adjudican a la IL-6 un papel relevante como factor paracrino que favorece la supervivencia de las células B16 de forma indirecta, al inducir la liberación de hormonas que aumentan la concentración y actividad de glutatión (GGS) y por tanto la supervivencia de las células tumorales; y que conduce en último término a una mayor colonización metastática (Obrador y cols., 2011; Valles y cols., 2013).

Por último, quisimos determinar si las células B16 eran capaces de liberar IL-6. Estudiamos la producción de IL-6 en condiciones basales y tras estimulación con PMA, un agente inductor de su expresión, sin embargo, los resultados fueron negativos para ambas sublíneas.

A diferencia de nuestros resultados, el grupo de Estrela ha descrito síntesis de IL-6 por las células tumorales, que además, contribuía al crecimiento tumoral y colonización metastática de forma indirecta, mediante la inducción de la liberación de glutatión por hepatocitos. Además, demuestran la inducción de la expresión de IL-6 en B16F10 por glucocorticoides y noradrenalina (Obrador y cols., 2011; Valles y cols., 2013).

La producción de IL-6 también se ha descrito en melanoma humano, tanto en líneas de celulares como en lesiones en distintos estadios; y varios estudios sugieren la implicación de la expresión de IL-6 en la progresión del melanoma. (Lee y cols., 1992; Colombo y cols., 1992; Benicelli y Guerry, 1993, Ciotti y cols., 1995, Francis y cols., 1996, Lupetti y cols., 1996; Lázár-Molnár y cols., 2000; Elias y cols., 2010). Así mismo, se ha propuesto que las células de melanoma puede utilizar IL-6 de forma autocrina (Lu y cols., 1992; Lu y Kerbel, 1993; Mouawad y cols., 1996; Lázár-Molnár y cols., 2000). Además, como en el caso del melanoma murino, también en melanoma humano la noradrenalina induce la expresión de IL-6 tanto en líneas celulares como en biopsias (Yang y cols., 2010).

El control de la producción de IL-6 parece ser esencialmente transcripcional, aunque también se han descrito mecanismos post-transcripcionales. Así, aunque se ha descrito algunos autores encuentran correlación entre la producción del mensajero y del factor soluble (Lupetti y cols., 1996), en otros casos las células expresaban el mensajero pero no liberaban IL-6 detectable (Colombo y cols., 1992, Lee y cols., 1992). De acuerdo con esto se ha descrito la expresión endógena de IL-6 en células de melanoma (Lu y cols., 1993; Mouawad y cols., 1996). Aunque nosotros no lo hemos determinado, no podemos excluir la posibilidad que las células B16 produzcan IL-6 de forma endógena, ya que en estudios previos habíamos detectado la expresión del mensajero (García de Galdeano y cols., 1998).

2. Estudio del TNF en el melanoma B16

2.1. Modulación por el TNF de las propiedades de invasión y adhesión

El TNF, de la misma forma que la IL-2 y la IL-6, se considera una de las principales citocinas proinflamatorias. Aunque inicialmente y tal como indica su nombre, se definió por su actividad lítica, más recientemente ha quedado en evidencia que esta no es su principal función y actualmente se considera más bien un potente factor regulador de muchos aspectos de la actividad celular incluyendo la modulación de la expresión génica (Old, 1985, Aggarwall, 2003; Wajant y cols., 2003; Varfolomeef y Ashkenazi, 2004; Walczak, 2011). Por otra parte, la actividad biológica del TNF tiene muchos aspectos en común con la de la IL-6 y sus efectos pueden ser sinérgicos. Con este punto de partida, decidimos estudiar la modulación inducida por el TNF sobre las células de melanoma B16 con alta y baja capacidad metastática.

El tratamiento *in vitro* con TNF resultó en una disminución de la capacidad de invasión y pérdida de la actividad clonogénica de las células del melanoma. Así mismo, el TNF indujo un descenso en la tasa de adhesión a matrigel, aunque el tratamiento *in situ* con TNF no produjo cambios significativos. La expresión de VLA-4 disminuyó de forma significativa por efecto del TNF, si bien a 72 h se habían recobrado los valores controles. Por el contrario, la molécula de adhesión CD44, que se expresa prácticamente en el 100% de las células B16, no disminuyó y además, su intensidad aumentó significativamente. En cuanto al patrón de distribución de actina, no hubo cambios apreciables inducidos por el TNF.

El efecto negativo del TNF sobre la invasión no era el esperado ya que en general se ha considerado que TNF modula de forma positiva la actividad de migración e invasión. De hecho, su naturaleza proinflamatoria se explica en parte por su efecto sobre la migración de células de tipo leucocitario, posiblemente debido a la inducción de producción de factores de la familia de las quimiocinas o de sus receptores (Green y cols., 1998; Franitza y cols., 2000; Sedgwick y cols., 2000; Brzezinska-Blaszyk y cols., 2007). Además de favorecer la extravasación leucocitaria, el TNF parece estimular la invasión en células tumorales y se han propuesto varios mecanismos implicados.

Así, el efecto proinvasivo se ha asociado a la estimulación de las metaloproteínasas (MMPs) que degradan la matriz extracelular (Hagemann y cols., 2004; Tanimura y cols.,

2005; Seeger y cols., 2006), en el caso de melanoma fundamentalmente por estimulación de MMP-9; y se ha asociado con la progresión metastática (MacDougall y cols., 1999; Shellman y cols., 2006). Otros trabajos sin embargo, describen un efecto inductor de la invasión independiente de MMPs, que no varían (Zhu y cols., 2002; Katerinaki y cols., 2003; Zhu y cols., 2004).

Aunque el efecto proinvasivo del TNF y su capacidad de estimular las MMPs está bien documentado, algunos trabajos demuestran que el TNF también es capaz de inhibir la invasión, asociado a supresión de actividad MMP (Qin y cols., 1998; Schmitmeier y cols., 2000); e incluso habiendo un aumento de MMP-9 (Huber y cols., 2006). En este estudio los autores observan que la regulación negativa de la invasión inducida por TNF estaba mediado por el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), uno de los componentes del sistema activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA) (Andreasen y cols., 1997) que ya se había descrito previamente como un supresor de la migración (Stefansson y cols., 1996; Kjoller y cols., 1997).

Dado que el TNF es un activador de PAI-1 (Hou y cols., 2004), su inducción por el TNF en las células de melanoma B16 podría explicar la menor actividad invasiva; sin embargo, estudios previos con melanoma B16 no encuentran asociación entre expresión del sistema de activador del plasminógeno y actividad invasiva (Baramova y cols., 1994; Huijzer y cols., 1995). En cualquier caso es interesante señalar que, a pesar de regular negativamente la invasión, PAI-1 parece contribuir al crecimiento tumoral y metástasis debido, entre otros, a su efecto antiapoptótico o por su efecto sobre angiogénesis como se ha descrito en melanoma (Kwaan y cols., 2000; McMahon y cols., 2001; Lee y cols., 2005).

El TNF también podría inducir cambios en el citoesqueleto. El citoesqueleto de actina constituye el elemento estructural fundamental en el proceso de migración e invasión y cambios en la proporción de F actina (actina polimerizada), en su localización y en las estructuras basadas en la actina se han asociado con una mayor tasa de invasión (Wang y cols., 2005; Yamazaki y cols., 2005; Yamaguchi y Condeelis, 2007; Olson y Sahai, 2008; Nürnberg y cols., 2011). Por otra parte, en células B16 se ha descrito que la invasión puede ser reprimida como consecuencia de modificaciones en elementos del citoesqueleto de actina (Fujita y cols., 2001; Kovacs y cols., 2006).

La participación del TNF en la modulación del citoesqueleto de actina es compleja, con resultados que pueden ser contrapuestos incluso en el mismo tipo celular: en

fibroblastos promueve la generación de fibras de estrés aunque también induce la desaparición de la formación de filopodios con disminución de la migración y quimiotaxis (Peppelenbosch y cols., 1999; Hanna y cols., 2001; Gadea y cols., 2004). Este resultado es interesante ya que se ha descrito en melanoma B16 que estructuras citoesqueléticas similares a los filopodios (microespículas) participan en la formación de la lamela o frente de migración (Nemethova y cols., 2008), y por tanto, son importantes para la capacidad de invasión de las células B16.

Por otra parte el TNF es uno de los agentes capaz de inducir la transición epitelio-mesenquimal (EMT) y contribuir así a un aumento de la invasión por células tumorales (Chua y cols., 2007; Wu y Zhou, 2010). El efecto parece mediado por NF- κ B y uno de los mecanismos propuestos es que el TNF induce la estabilización de la proteína Snail que a su vez, está directamente implicada en la desaparición de la adhesión mediada por E-cadherina (epitelial) y la inducción de vimentina (mesenquimática). Snail se ha asociado a EMT tanto en melanoma humano, como en células B16 (Kuphal y cols., 2005; Kushiro y cols., 2011; Kushiro y Nuñez, 2012), por lo que podría esperarse que el TNF pondría en marcha esta vía en las células B16.

Para determinar la posible modulación de TNF sobre el citoesqueleto de las células B16 realizamos un estudio morfológico mediante tinción con TRITC-faloidina de la distribución de filamentos de actina, pero como ya hemos mencionado, no apreciamos cambios morfológicos apreciables entre células control y tratadas. Es posible sin embargo, que las condiciones de nuestro ensayo no hayan permitido recoger en su totalidad el efecto del TNF sobre el citoesqueleto de actina.

En cualquier caso parece evidente que el TNF está bloqueando por alguna vía los mecanismos implicados en motilidad de las células B16. De hecho, el TNF interactúa directamente con muchas de la enorme variedad de proteínas que regulan el comportamiento del citoesqueleto, de la motilidad y por tanto, del mayor o menor grado de invasión.

Así, se ha descrito la interacción entre TNF y las proteínas de la familia Rho-GTPasas que conduce a la remodelación del citoesqueleto de actina y de las propiedades de adhesión celular, sobre todo en el caso de células endoteliales (Wojciak-Stothard y cols., 1998; Peppelenbosch y cols., 1999; Gadea y cols., 2004; Osiak y cols., 2005; Papaharalambus y cols., 2005; Mckenzie y Ridley, 2007; Mong y cols., 2008; Kant y cols., 2011). El TNF es capaz de interactuar con los tres tipos fundamentales de Rho-GTPasas

(Rho, Rac y Cdc42) (Ridley, 2001; Burridge y Wennerberg, 2004). Otra familia de proteínas, la familia ERM (ezrina-radixina-moesina), fundamentales para el anclaje del citoesqueleto en la membrana plasmática (Bretscher y cols., 2002; Arpin y cols., 2011) también podría ser regulada por el TNF (Koss y cols., 2006).

En melanoma la actividad de ezrina y de moesina se ha asociado a fenotipo metastático (Brambilla y Fais, 2009; Federici y cols., 2009) ya que contribuye a la migración e invasión (Estecha y cols., 2009; Lorentzen y cols., 2010). Sin embargo, es interesante señalar que, aunque ezrina se localiza habitualmente en el citoplasma, se ha descrito también su presencia en el núcleo y su posible implicación en supervivencia (Gautreau y cols., 1999; Batchelor y cols., 2004; DiCristofano y cols., 2010). Si tenemos en cuenta que en la translocación de ezrina al núcleo participa RhoA (Kishore y cols., 2005), quizá la Rho-GTPasa más relevante para la actividad del TNF, y que RhoA se ha implicado en la regulación negativa de la invasión, podríamos hipotetizar que en las células B16, el TNF vía la proteína RhoA podría estar induciendo un descenso en la concentración de ezrina, lo que podría explicar la disminución de la capacidad invasiva de las células.

El bloqueo de la invasión inducido por TNF podría estar relacionado también con la modulación de las propiedades de adhesión. Precisamente la inducción de VCAM-1 (molécula de adhesión vascular 1) en el endotelio por TNF subyace al efecto prometastático del factor descrito en el melanoma B16: el número de metástasis pulmonares aumentaba cuando se administraba TNF a los ratones antes de la inoculación de las células tumorales y este efecto se anulaba cuando se bloqueaba VCAM-1 con anticuerpos monoclonales. Las células B16 se adhieren al endotelio por medio de la integrina VLA-4 expresada en su superficie por lo que los autores concluyen esta interacción es crucial para el desarrollo de los focos metastáticos (Okahara y cols., 1994). Posteriores resultados han corroborado la participación de las moléculas $\alpha 4\beta 1$ y VCAM-1 en la formación de focos metastáticos y la importancia de su modulación en melanoma B16 y también en melanoma humano (Higashiyama y cols., 1996; Cardones y cols., 2003). De hecho, Cardones y cols. (2003) sugieren que $\alpha 4\beta 1$ es la molécula de adhesión fundamental para la formación de focos metastáticos por las células B16.

Aunque de forma general se admite que el TNF estimula las propiedades de adhesión del endotelio, regulando moléculas como VCAM-1 y E-selectina (Xia y cols., 1998; Makondo y cols., 2004), el TNF puede regular negativamente ciertos procesos de adhesión como la unión mediante cadherinas que se suprime en la ya mencionada

transición epitelio-mesenquimática. Por otra parte, no está claro el efecto directo de TNF sobre las integrinas. De hecho el TNF, como agente antitumoral frente a melanoma, es capaz de inhibir la expresión de integrinas en el endotelio, lo que conduce a muerte celular y eliminación de la red vascular tumoral (Rüegg y cols., 1998).

En nuestro trabajo pudimos comprobar que las células B16 tratadas con TNF muestran una cierta disminución en la expresión de VLA-4 y también pierden capacidad de adhesión. Aunque probablemente este descenso no sea suficiente para explicar el bloqueo de la invasión por efecto del TNF, es posible que sea uno de los mecanismos implicado. Como ya se ha mencionado para la IL-6, en melanoma se ha encontrado correlación entre la expresión de la proteína $\alpha 4$ y el aumento de migración e invasión, por lo que la menor expresión de $\alpha 4$ en las células B16, podría explicar en parte el descenso en la actividad invasiva de las células. Nuestros datos sin embargo, no concuerdan con los obtenidos en melanoma humano donde se ha descrito un aumento de expresión de $\alpha 4$ inducido por TNF asociado a invasión (Zhu y cols., 2002).

Otra de las moléculas de adhesión que estudiamos en este trabajo es CD44, una glicoproteína de superficie, considerado como el receptor del ácido hialurónico (HA) y que media la adhesión de la célula a la matriz extracelular (Aruffo y cols., 1990; Underhill, 1992; Goodfison y cols., 1999; Turley y cols., 2001; Ponta y cols., 2003; Thorne y cols., 2004). Debido a su interacción con la matriz extracelular, CD44 se ha implicado en la migración y tráfico celular pero también en la transmisión de señales. Por todo ello, la expresión de CD44 y particularmente variantes específicas, se ha asociado con la progresión tumoral y con mayor actividad metastática (Naor y cols., 1997; Marhaba y cols., 2004; Louderbough y Schroeder, 2011).

En nuestro estudio todas las células estudiadas mostraron una alta expresión de CD44 que no variaba en función de la línea de mayor o menor capacidad metastática. Cuando las células se trataron con TNF, la intensidad de expresión de CD44 aumentó significativamente en ambas líneas.

Estos resultados concuerdan con otros datos que describen una expresión constitutiva de CD44 en el melanoma B16, aunque puede haber diferencias según la línea estudiada (Lakshmi y cols., 1997). En general CD44 parece tener un rol protumoral en el melanoma B16 ya que el bloqueo de CD44 con péptidos específicos resultaba en un menor número de metástasis pulmonares y en una mejora de la supervivencia de los ratones (Mummert y cols., 2003, Hibino y cols., 2004).

Así mismo, en células de melanoma humano, el bloqueo de la expresión de CD44 conduce a inhibición del desarrollo tumoral “in vivo” (Guo y cols., 1994; Ahrens y cols., 2001). Particularmente la variante CD44v5 se expresa en melanoma, aunque existen discrepancias en cuanto a su correlación con la malignidad (Dietrich y cols., 1997). El efecto protumoral de CD44 puede ser debido a favorecer la invasión de las células mediada por inducción de metaloproteínas aunque también a estimulación de la proliferación (Faassen y cols., 1992; Takahashi y cols., 1999; Ahrens y cols., 2001; Edward y cols., 2005; Anderegg y cols., 2009; Hernández y cols., 2011).

Por otra parte, la inducción de la expresión de CD44 por el TNF está bien documentada (Osada y cols., 1995; Levesque y Haynes, 1997; Maiti y cols., 1998; Leir, 2000; Gee y cols., 2002). Parece ser que el TNF induce modificaciones postranscripcionales necesarias para la funcionalidad de la molécula (Levesque y Haynes, 1999; Delcommenne y cols., 2002), aunque este efecto que puede estar acompañado de aumento en la tasa de invasión (Barshisat y cols., 2002; Muthukumaran y cols., 2006).

En nuestro estudio el TNF aumentó la expresión de CD44 pero disminuyó la tasa de invasión; es posible sin embargo, que en el melanoma B16, el bloqueo de la invasión pueda producirse independientemente de CD44. De hecho, Gava y cols., describen un descenso en la tasa de invasión de B16F10, sin modificación en CD44 (Gava y cols., 2006). De acuerdo con esto, estudios más recientes han descrito una correlación inversa entre expresión de CD44 e invasión: microRNAs promueven invasión al inhibir el CD44; es decir, que parece necesario que baje la expresión de CD44 para que haya invasión (Huang y cols., 2008).

En cualquier caso, aunque CD44 no esté involucrado en la actividad invasiva de las células B16 puede ser que su mayor expresión tenga consecuencias sobre la actividad tumoral de las células; de hecho actualmente se considera que CD44, además de su papel en adhesión/migración, puede modular vías de señalización que conducen a supervivencia (Ponta y cols., 2003). Así se ha descrito la inducción de la vía IP3k-Akt, tanto en células del sistema inmune (Gore y cols., 2008; Baaten y cols., 2010) como en varios tipos tumorales (Bates y cols., 2001; Fujita y cols., 2002; Bourguignon y cols., 2009) y se ha propuesto que este efecto puede ser clave para inducir y aumentar la eficiencia metastática (Godar y cols., 2008, Klingbeil y cols., 2009). Además, a través la vía IP3k-Akt, CD44 contribuye al aumento de resistencia a drogas que exhiben las células tumorales al aumentar la expresión de MDR1 (Misra y cols., 2005; Bourguignon y cols., 2007; Hao y

cols., 2010). Así mismo, otros autores asocian el aumento de CD44 con mayor supervivencia por activación de NF- κ B (Gore y cols., 2008); o al bloqueo de la vía Fas inactivando el programa que conduce a apoptosis (Mielgo y cols., 2006). Es posible por tanto, que el aumento de CD44 inducido por TNF en las células B16 podría tener un efecto protumoral.

2.2. Modulación por el TNF de la capacidad de formación de colonias, la actividad proliferativa, el ciclo celular y estado redox de las células B16

Siguiendo el mismo planteamiento que para la IL-2 e IL-6, estudiamos la capacidad de formación de colonias y proliferación en las células tratadas con TNF y además, completamos esta parte del trabajo con el análisis del ciclo celular. A diferencia del efecto de IL-2 o IL-6, los resultados demostraron una disminución de la actividad clonogénica inducida por TNF en ambas sublíneas F1 y F10, alcanzando un descenso del 90% para una concentración de TNF de 100 ng/ml. También disminuyó la actividad proliferativa aunque el efecto fue más pronunciado a baja concentración de suero. Además, el análisis morfológico tanto de las colonias como de los tapices celulares puso en evidencia que no había muerte celular: el tratamiento con TNF no sólo no resultó citotóxico; por el contrario, los cultivos, al igual que ocurría con IL-2 e IL-6 mostraban un aspecto homogéneo y muy regular; de hecho las células B16 proliferaron incluso a altas concentraciones de TNF (500 ng/ml). Por último, el análisis del ciclo celular confirmó el efecto citostático del TNF y la ausencia de muerte celular.

El efecto de TNF sobre la capacidad proliferativa puede variar mucho, incluso ser opuesto según el contexto. Inicialmente al TNF se le asignó un rol antiproliferativo asociado a su efecto apoptótico (Sugerman y cols., 1985). Datos posteriores han demostrado que TNF es capaz de inducir la proliferación en una variedad de células normales (Suda y cols., 1990; Watanabe y cols., 1997, Radeff-Huang y cols., 2007; Kim y cols., 2012), así como en células tumorales (Lachman y cols., 1987; Gelin y cols., 1991; Wu y cols., 1993; Gaiotti y cols., 2000; Liu y cols., 2000; Park y cols., 2001; Radeff-Huang y cols., 2007); e incluso se ha descrito un efecto opuesto según la dosis del factor (Lewis y cols., 1987; Kaiser y cols., 1999).

En melanoma humano el efecto de TNF sobre la proliferación parece ser inhibitorio (Helson y cols., 1975; Muhukkumar y cols., 1996; Hattori y cols., 2001), si bien se ha descrito una diferencia en la respuesta asociada a mayor o menor malignidad, inhibiendo la proliferación de melanocitos y células de estadios tempranos pero no de

estadios avanzados (Swope y cols., 1991; Lázár-Molnár y cols., 2000). De acuerdo con esto, se ha descrito que el TNF no afecta a la proliferación de células B16 con capacidad metastática, aunque sí se observa supresión de la actividad clonogénica asociado a bloqueo de la invasión in vitro (Fleishmann y cols., 1996; Fujita y cols., 2001).

Nuestros resultados demostraron que el TNF afecta claramente al estado proliferativo de las células B16: las células progresan a través del ciclo celular pero más lentamente, aunque la presencia de suero enmascara el efecto antiproliferativo del TNF y lo contrarresta en parte. Este enlentecimiento del ciclo se vio muy claramente tras varios días de cultivo (4-5). Así, mientras que los tapices de células no tratadas habían llegado a confluencia y se acumulaban en G_0 - G_1 , los tratados con TNF estaban aún en proliferación activa: las células que habían entrado más tarde en fase S estaban todavía en fase S y G_2 -M. No había casi células en estas fases en las no tratadas. La ralentización del ciclo por TNF parece deberse a un acúmulo en G_0 / G_1 que podría deberse a inhibición de la síntesis de DNA, tal como han observado otros autores (Belizario y Dinarello, 1984; Hattori y cols., 2001), aunque en el caso de fibroblastos también se ha descrito detención en fase G_2 del ciclo celular inducida por TNF (Dazynekiewicz y cols., 1984).

Por otra parte, pudimos comprobar que el ensayo de proliferación XTT estaba infravalorando el efecto citostático del TNF. Una explicación de esta discrepancia puede ser que el TNF induzca cambios metabólicos en la célula que interfieran con el ensayo.

El ensayo XTT es un ensayo colorimétrico que se basa en la reducción del tetrazolio a formazán. Para que se produzca esta reacción se requiere poder reductor y la presencia de superóxido. Se utiliza para monitorizar la viabilidad y proliferación celular ya que se supone que en la reacción participan enzimas mitocondriales y que la intensidad del color es proporcional al número de mitocondrias y por tanto al número de células (si hay muerte celular no hay actividad mitocondrial), aunque también se ha descrito que pueden estar implicados enzimas no mitocondriales o incluso que la reacción puede ocurrir en presencia de NADH o NADPH y en ausencia de enzimas. (Scudiero y cols., 1988; Berridge y cols., 1996; Barbu y Welsh, 2004).

El ensayo XTT asume que la capacidad de reducción de las células es constitutiva y permanece constante a lo largo del experimento, sin embargo nuestros resultados apuntan a que TNF induce cambios metabólicos en la células B16 responsables del mayor volumen de reacción XTT; es decir, que el TNF estaría afectando al estado redox de la célula.

El estado redox de la célula alude al balance de una serie de metabolitos entre su forma oxidada y reducida; siendo los más representativos el glutatión (GSH/GSG), NAD/NADH y NADP/NADPH. Estos agentes oscilando entre su estado reducido y oxidado controlan la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS). Varias enzimas afectan directamente al estado redox de la célula: las que eliminan ROS, como MnSOD, de la familia de las superóxido dismutasas, junto con catalasas y peroxidasas; y las que generan ROS como la familia de las NADHP oxidasas o familia Nox (Bedard y Krause, 2007).

Cómo ya hemos mencionado previamente, los datos obtenidos del ensayo XTT con células del melanoma B16 apuntaban a que el TNF directa o indirectamente está afectando al estado redox de la célula; pero el mayor volumen de reacción sugiere un aumento del poder reductor. El mecanismo subyacente a este efecto podría ser por incremento directo de NADPH, o también por un aumento o activación de agentes antioxidantes como glutatión (GSH) o bien, de enzimas de la familia de superóxido dismutasas.

El glutatión es uno de los elementos clave en el sistema de defensa antioxidante de la célula: inactiva ROS intracelular y juega un papel decisivo en la regulación del crecimiento celular y apoptosis. Además, está implicado en la resistencia de las células tumorales a drogas o a radiaciones ionizantes (Ortega y cols., 2011). Para generar GSH el poder reductor se obtiene fundamentalmente de NADHP, por lo que la concentración de ambos agentes está relacionada. Estudios previos han descrito que el TNF es capaz de inducir un aumento de glutatión: activa los enzimas involucrados en la síntesis de GSH vía NF- κ B y AP-1 que se unen a los promotores de los genes correspondientes (Yang y cols., 2005). Además, la eliminación de glutatión convierte a células resistentes en sensibles a agentes citotóxicos, entre otros, al propio TNF (Marí y cols., 2008). Este efecto protector del glutatión frente al TNF se ha descrito también en células de melanoma B16 (Ortega y cols., 2003).

Junto con GSH los enzimas detoxificantes como MnSOD se encargan de mantener el equilibrio redox. Localizada en la matriz mitocondrial, MnSOD cataliza la conversión de radicales superóxido a peróxido de hidrógeno y puede ser modulada por TNF protegiendo la célula contra apoptosis (Rogers y cols., 2001; Djavaheri-Mergny y cols., 2004; Jennings-Gee y cols., 2006; Ranjan y Boss, 2006). Por otra parte, un aumento de actividad MnSOD se ha asociado con disminución de la proliferación en células tumorales.

Curiosamente el TNF induce la generación de ROS, es decir, que puede modular el estado redox de la célula induciendo efectos diferentes e incluso contrapuestos, lo que refleja una vez más la dualidad de la biología de este factor.

La generación de ROS por TNF se ha asociado al efecto lítico de este factor. Así, estudios iniciales centrados en discernir el mecanismo de lisis del TNF demostraron un aumento de agentes oxidantes en células tratada con TNF (Schulze-Osthoff y cols., 1992; Hennes y cols., 1993; Goossens y cols., 1995) y también que la mitocondria participaba directamente en el proceso lítico (Schulze-Osthoff y cols., 1993; Pastorino y cols., 1996; De Vos y cols., 1998; Busquets y cols., 2003; Nagakawa y cols., 2005). De acuerdo con esto, la supresión de ROS inhibía la lisis celular inducida por TNF (Pham y cols., 2004). Se han descrito varias vías que explican el efecto pro-oxidante del TNF, fundamentalmente debido a la regulación positiva de enzimas implicados en la generación de ROS como lipooxigenasas, o enzimas NOX y también distintos mecanismos por los que ROS y la actividad mitocondrial llevan a la muerte celular (Woo y cols., 2000; Kim y cols., 2007; Kuwano y cols., 2008; Shulga y Pastorino, 2012).

Las células del melanoma B16 no son susceptibles al efecto lítico de TNF, por lo que no parece que se produzca un aumento de ROS en estas células. Además, en melanoma humano, un aumento de ROS aumenta la capacidad de invasión (Comito y cols., 2011; Fiaschi y Chiarugi, 2012; Liu y cols., 2012), mientras que en este estudio la invasión disminuyó.

Aunque en este trabajo no hemos determinado el mecanismo por el que TNF modifica el estado redox de la célula consideramos que es un resultado significativo, dada la importancia que han adquirido ROS como señales intracelulares (Brown y Griendling, 2009; Gough y Cotter, 2011; Ferro y cols., 2012), así como la estrecha interdependencia que parece cada vez más evidente entre las vías que controlan la actividad metabólica y otros procesos celulares como proliferación, diferenciación, motilidad o incluso supervivencia; y su relevancia para el desarrollo tumoral y metástasis (DeBerardinis y cols., 2008; Jones y Thomson, 2009; Pani y cols., 2009; Acharya y cols., 2010; Pani y cols., 2010; Fiaschi y Chiarugi, 2012; Agathocleous y Harris, 2013), así como para el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer (Wondrak, 2009; Van der Heiden, 2011).

2.3. Mecanismos involucrados en el efecto del TNF expresión de p21^{WAF1/Cip1}

¿Qué vías utiliza TNF para suprimir la proliferación? Con el fin de investigar los mecanismos implicados en el efecto de ralentización del ciclo celular determinamos la expresión de p21^{WAF1/Cip1} en las células B16. El p21^{WAF1/CIP1} es una proteína que se describió inicialmente como un potente inhibidor de la actividad de las quinasas dependientes de ciclina (CDKs). Pertenece a la familia Cip/Kip de inhibidores del ciclo (p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1} y p57^{KIP}), considerada de amplio espectro, ya que controla la actividad de quinasas dependientes de varias ciclinas (A, D y E) a diferencia de otros inhibidores del ciclo, de actividad más restringida (El-Deiry y cols., 1993; Xiong y cols., 1993; Sherr y Roberts, 1995).

El aumento de p21^{WAF1/Cip1} conduce a una detención del ciclo celular, fundamentalmente porque se une a complejos ciclina-cdk e impide que estos fosforilen a Rb: el Rb hipofosforilado induce la detención del ciclo celular. Así mismo, p21^{WAF1/Cip1} es capaz de inhibir la replicación del DNA. Posteriormente se ha demostrado que el rol del p21^{WAF1/Cip1} es más complejo ya que además de su efecto antiproliferativo, se ha demostrado que participa en la progresión del ciclo y en otros aspectos de la actividad celular (LaBadier y cols., 1997; Brugarolas y cols., 1999; Cheng y cols., 1999; Sherr y Roberts, 1999; Dotto, 2000; Coqueret, 2003; Blundell, 2006). Debido a su condición de inhibidor del ciclo p21^{WAF1/Cip1} se considera un supresor tumoral, aunque también puede actuar como factor anti-apoptosis (El-Deiry y cols., 1995; Gartel y Radhakrishnan, 2005; Rowland y Peeper, 2006; Abbas y Dutta, 2009).

En nuestro estudio, el TNF produjo un aumento de la expresión de p21^{WAF1/Cip1} en ambas sublíneas de melanoma: el número de células positivas subió un 10% respecto a la expresión de los controles lo que confirmaba el efecto citostático. Este resultado concuerda con otros autores que han descrito en células B16 un aumento en la expresión de p21^{WAF1/Cip1} asociado a efecto antiproliferativo (Oh y cols., 1997; Kuzumaki y cols., 1998; Laughlin y cols., 2009); y además que este aumento en la expresión de p21^{WAF1/Cip1} podía ser inducido por TNF (Shiohara y cols., 1996).

¿Cómo regula el TNF la expresión de p21^{WAF1/Cip1}? En general, en la regulación de la expresión de p21^{WAF1/Cip1} se han descrito distintos mecanismos tanto a nivel transcripcional, que puede ser p53-dependiente o independiente, como post-transcripcional (Bellido y cols., 1998; Gartel y Tyner, 1999; Haapajarvi y cols., 1999; Liu y Lozano, 2005). De forma similar, por efecto del TNF se ha observado tanto un aumento

del mRNA de p21^{WAF1/Cip1}, así como la estabilización de la proteína y se ha propuesto la participación de NF- κ B (Akahsi y cols., 1995; Shiohara y cols., 1996; Jiang y Porter, 1998; Kobayashi y cols., 2000; Bren y cols., 2001; Basile y cols., 2003).

El efecto antiproliferativo sobre las células B16 mediado por p21^{WAF1/Cip1} puede ocurrir por acúmulo en fase G₂/M (Kalechman y cols., 2000). De hecho, p21^{WAF1/Cip1} puede detener el ciclo en la fase G pero también en G₂; además, el efecto puede ser transitorio e incluso contribuir en último término a la progresión del ciclo (Hermeking y cols., 1997; Dash y El-Deiry, 2005; Wuerzberger-Davis y cols., 2005). Aunque no podemos descartar otras opciones, los datos de nuestro estudio son compatibles con la posibilidad de que el TNF vía p21^{WAF1/Cip1} promueva el acúmulo de las células B16 en la fase G₂ del ciclo.

Por otra parte, la expresión de p21^{WAF1/Cip1} podría constituir un mecanismo de resistencia de las células B16. El rol de p21^{WAF1/Cip1} como inhibidor de apoptosis está aceptado (Gartel y Tyson, 2002) y múltiples trabajos han descrito asociación entre p21^{WAF1/Cip1} y supervivencia o resistencia a muerte celular por diversos factores, por radiación, estrés oxidativo, hipoxia o por quimioterapia (Xu y El-Diry, 2000; O'Reilly y cols., 2005; Le y cols., 2005; Chen y cols., 2010; Wu y Zhou, 2010). De acuerdo con esto, si se produce un descenso de p21^{WAF1/Cip1} o si se bloquea su inducción, aumenta la susceptibilidad a apoptosis, además, la eliminación de p21^{WAF1/Cip1} hace que las células se vuelvan susceptibles a apoptosis mediada por el propio TNF (Donato y Pérez, 1998; Jiang y Porter, 1998; Zhang y cols., 1999; Chang y cols., 2001; Wang L. y cols., 2005). Estos últimos autores, así como Basile y cols. (2003) proponen que la vía TNF/NF- κ B/p21^{WAF1/Cip1} es la que conduce a un aumento en la resistencia de las células a efectos citotóxicos. Por otro lado, se ha propuesto que el efecto de p21^{WAF1/Cip1} sobre el ciclo y el efecto de supervivencia son independientes y que depende de la localización subcelular de la proteína: el p21^{WAF1/Cip1} nuclear controla el ciclo, mientras que el citoplasmático tiene un efecto antiapoptótico (Wang Z. y cols., 2005; Kumar y cols., 2007; Lin. y cols., 2007).

En melanoma humano p21^{WAF1/Cip1} puede tener una relevancia especial para favorecer la supervivencia de las células tumorales. De hecho, aunque se ha descrito la adquisición de un fenotipo senescente asociado a detención en fase G₁ con inducción de p21^{WAF1/Cip1} (Kramer y cols., 2001), la delección del gen p21^{WAF1/Cip1} en melanocitos no inducía la ruptura del control del ciclo ni es necesario para inducir senescencia en melanocitos (Halaban y cols., 1998, Halaban y cols., 1999; Halaban, 2005; Gray-Schopfer y cols., 2006). De forma similar, los datos obtenidos del estudio de lesiones de melanoma

en distintos estadios han arrojado resultados poco concluyentes: se ha asociado expresión de p21^{WAF1/Cip1} un mejor pronóstico (Karjalainen y cols., 1999); pero también se ha descrito que en lesiones de melanoma hay mayor expresión de p21^{WAF1/Cip1} durante la fase radial que en nevi benigno o displástico; si bien luego desaparece en la fase de crecimiento vertical (Gray-Schopfer y cols., 2006).

Por otra parte, en melanoma reviste un interés especial la interacción entre p21^{WAF1/Cip1} y MiTF, factor de transcripción que juega un papel central en la supervivencia y la diferenciación de la línea melanocítica, ya que induce la activación de la expresión de los genes involucrados en la melanogénesis (Widlund y Fisher, 2003; Cheli y cols., 2009). Asociado a su efecto de factor de diferenciación o factor de supervivencia se ha postulado la participación de p21^{WAF1/Cip1} (Carreira y cols., 2005; Liu F y cols., 2010).

En melanoma MiTF puede actuar como un oncogén contribuyendo a la progresión tumoral (Levy y cols., 2006; Zhu y cols., 2009; Liu F y cols., 2010; Shah y cols., 2010; Yajima y cols., 2011). Aunque está expresado en la mayoría de los melanomas, parece que el papel de MiTF depende de su nivel de expresión, pudiendo inducir efectos contrapuestos (Carreira y cols., 2006; Gray-Schopfer y cols., 2007). Precisamente la expresión génica de Mitf parece estar regulada por p21^{WAF1/Cip1}; siendo esta interacción mutua ya que MiTF regula a su vez la expresión de p21^{WAF1/Cip1}, creándose un bucle de retroalimentación que contribuye a la supervivencia de las células tumorales (Sestakova y cols., 2010).

En relación con esto, en células B16 se ha identificado una población de crecimiento lento con bajo nivel de expresión de MiTF que parece ser la responsable del potencial tumorigénico: su eliminación disminuía la formación del tumor (Cheli y cols., 2011). Todo ello nos lleva a considerar que el efecto de TNF sobre las células B16 mediado por expresión de p21^{WAF1/Cip1} puede tener un efecto protumoral, a pesar de la supresión de la actividad proliferativa.

¿Existe una vía común que para el efecto del TNF sobre el control del ciclo celular y la regulación negativa de la invasión? Varios estudios han demostrado una regulación común pero inversa de genes inhibidores del ciclo y genes implicados en invasión en diversos tipos tumorales, entre ellos, también en melanoma (Shi y cols., 2001; Denoyelle y cols., 2001; Lazennec y cols., 2001; Wu y cols., 2008; Fenouille y cols., 2011). Así mismo, otros autores han descrito la relación directa entre expresión de p21^{WAF1/Cip1} y regulación del citoesqueleto (Coleman y cols., 2006; Romanov y cols., 2010).

Se ha demostrado que TNF puede estimular mecanismos comunes de regulación de proliferación y moléculas o estructuras del citoesqueleto. Así, la inhibición de la formación de estructuras citoesqueléticas por el TNF se ha asociado a aumento de expresión de p21^{WAF1/Cip1} (Gadea y cols., 2004). En otro estudio se ha descrito que TNF disminuye la proliferación de células endoteliales con activación de ROCK, fosforilación de la proteína del citoesqueleto ezrina que se transloca al núcleo donde regula negativamente la expresión de ciclina (Kishore y cols., 2005).

En conjunto estos datos sustentan la hipótesis de que el TNF desencadena una vía de activación que conduce a cambios en procesos tan diversos como inhibición de la proliferación y de la invasión y que puede hacerlo a través de p21^{WAF1/Cip1} que contribuiría a un efecto antiapoptótico. De hecho, aunque el p21^{WAF1/Cip1} se ha considerado un gen supresor de tumor, también puede actuar como un oncogen (Abbas y Dutta, 2009).

Por último, no podemos excluir que, además de p21^{WAF1/Cip1}, el efecto antiproliferativo de TNF podría estar asociado a la modulación de las MAPK quinasa. Dentro de este extenso grupo de proteínas reguladoras, la familia de p38 MAPK quinasa (Harubin y Han, 2005; Risco y Cuenda, 2011) se ha asociado a efectos antiproliferativos y a diferenciación en el melanoma humano y en B16 (Smalley y Eisen, 2000; Smalley y Eisen, 2002; Hata y cols., 2003) y además participa en la vía utilizada por TNF para suprimir la proliferación (Hattori y cols., 2001); por lo que podría subyacer al efecto observados por nosotros.

Así mismo, la vía RAS-RAF-MEK-ERK podría estar implicada. En esta vía RAS quinasa activa a RAF que a su vez conduce a la fosforilación de MEK y de ERK; alternativamente RAF puede activar la vía de supervivencia PI3K/Akt (Nazarian y cols., 2010; Muthusamy y Piva, 2011). Park y cols. (2001) demuestran que la supresión de la proliferación inducida por TNF está mediada por la quinasa RAF. Además proponen que TNF y Ras compiten por RAF que sería un elemento común para ambas vías: en presencia de TNF parte de RAF es reclutado y utilizado para fosforilar PI3K y no está disponible para fosforilar ERK. De esta manera queda regulada negativamente la vía de MAPKs que conduce a un efecto proliferativo, pero inducida la vía que conduce a supervivencia (Park y cols., 2001). Aunque nosotros no hemos explorado esta vía TNF podría estar modificando RAF o alguno de los otros componentes ya que su regulación en células B16 se ha involucrado en la proliferación y diferenciación.

2.4. Ceramida induce muerte celular en el melanoma B16

Incluimos ceramida en nuestro estudio para explorar las vías de transducción implicadas en el efecto del TNF sobre las células del melanoma B16, ya que estudios iniciales habían descrito su participación como mediador fundamental de la señal del TNF (Kim y cols., 1991; Daibo y cols., 1993; Kolesnick y Golden, 1994; Wiegman y cols., 1994; García-Ruiz y cols., 1997).

En nuestro trabajo el efecto drástico inducido por la ceramida en los cultivos, con inhibición total del crecimiento asociada a muerte celular, demostró que el efecto era diferente al del TNF por lo que concluimos que, en el melanoma B16 el TNF activa vías de transducción distintas de las inducidas por ceramida.

La ceramida pertenece a la familia de los esfingolípidos bioactivos, que se consideran actualmente como uno de los principales grupos de señales moleculares que controlan la actividad celular: el metabolismo de los esfingolípidos es clave para el mantenimiento de la homeostasis celular (Hannun y Obeid, 2008; Hia y Dannenberg, 2012; Li y cols., 2014).

En la célula la ceramida se genera a partir de esfingolípidos de membrana, por acción de las esfingomielinasas o también por síntesis de novo inducida por diversos estímulos, en general, agentes inductores de estrés celular como radiación ultravioleta o estimulación de receptores de muerte como los activados por CD95 o TNF. De acuerdo con esto, y aunque se ha descrito la participación de la ceramida en diversos procesos celulares, sin duda tiene un papel clave en la inducción de muerte celular, fundamentalmente por apoptosis (Hannun, 1996; Dbaibo y cols., 1998; Hannun y Luberto, 2000; Ruvolo, 2001; Gulbins, 2003; Siskind, 2005; Novgorodov y cols., 2005; Schenck y cols., 2007; Carpinteiro y cols., 2008; Mullen y cols., 2011).

El papel exacto de la ceramida en las vías de transducción del TNF, aunque ha sido extensamente estudiado, se ha mantenido como tema de discusión durante muchos años. Para determinar si la ceramida es responsable de la actividad del TNF en muchos de estos trabajos se ha utilizado como estrategia experimental la modulación de las enzimas que controlan la síntesis de ceramida o bien, el tratamiento exógeno de las células con análogos de la ceramida. Estos estudios han confirmado que el efecto lítico del TNF está mediado por ceramida. El mecanismo de acción de la vía TNF-ceramida conlleva cambios en permeabilidad mitocondrial y la activación de caspasas tardías; tipo caspasa 3 (Manna y

cols., 2000; Chen y cols., 2001; García-Ruíz y cols., 2003; Heinrich y cols., 2004; Sawada y cols., 2004; Martínez y cols., 2012). También se ha descrito que inhibe los mecanismos de supervivencia como la vía Akt (Teruel y cols., 2001), o que activa directamente catepsina D (Heinrich y cols., 2004).

Como ya hemos mencionado, las células B16 resultaron resistentes al efecto lítico del TNF, pero sí fueron susceptibles a C₂, el análogo de la ceramida utilizado en nuestro trabajo. Además, el estudio morfológico de los cultivos tratados con ceramida sugiere que la muerte de las células se produjo por apoptosis. Esto estaría de acuerdo con otros resultados que demuestran que el acúmulo de ceramida en células del melanoma B16 bloquea las vías que llevan a supervivencia, concretamente por regulación negativa de la vía PI3K (Kanto y cols., 2001). Además, parece haber una asociación entre la resistencia a TNF y el tipo de muerte. Así, células resistentes, como B16, mueren por apoptosis, mientras que en células susceptibles también se observa necrosis (Ameyar y cols., 1998; Davis y cols., 2000).

Además de inducir apoptosis la ceramida C₂ indujo una reducción drástica en la tasa de formación de colonias y también un cierto descenso en la tasa de adhesión *in situ*. En ambos casos no hubo un paralelismo entre el efecto de TNF y de ceramida, lo que corrobora la activación de distintas vías intracelulares. De acuerdo con esto otros autores tampoco han encontrado paralelismo entre el efecto de TNF y ceramida C₂ sobre adhesión (Xia y cols., 1998). Por último, sería interesante investigar el rol de ceramida en invasión ya que se ha descrito su implicación en la remodelación del citoesqueleto similar al de TNF (Hanna y cols., 2001).

Estudios recientes han confirmado el rol de ceramida en la actividad de las células tumorales (Morad y Cabot, 2013; Saddoughi y Ogretmen, 2013). En melanoma humano el tratamiento con ceramida es capaz de inducir muerte por apoptosis aunque no en todos los casos; también se ha observado un efecto antiproliferativo similar al descrito sobre melanocitos (Raisova y cols., 2000; Deng y cols., 2002; Han y cols., 2002; Kim y cols., 2002). En cualquier caso, merece la pena resaltar que la ceramida y en general la vía de las esfingomielinas (Bektas y cols., 2005) tiene una relevancia especial en el caso del melanoma ya que es capaz de contrarrestar la regulación negativa de las vías que conducen a apoptosis, y que es una de las características del melanoma. En este hecho se basan las nuevas terapias combinadas basadas en ceramida que elimina la quimioresistencia de las células de melanoma (Tran y cols., 2008; Bedia y cols., 2011); y que se están aplicando también en otros tipos tumorales (Senchenkov y cols., 2001; Ponnusamy y cols.,

2010; Dimanche-Boitrel y cols., 2011; Liu y cols., 2013; Morad y Cabot, 2013; Saddoughi y Ogretmen, 2013).

2.5. TNF como factor de supervivencia para el melanoma B16

La modulación inducida por el TNF del conjunto de la actividad celular de las células B16 podría corresponder a la activación de mecanismos de resistencia. Según esto, el TNF podría estar ejerciendo un efecto protumoral.

El papel de TNF como inhibidor de apoptosis ha adquirido mayor relevancia frente al rol como inductor de muerte celular. De hecho, desde hace ya bastantes años y a pesar de su definición inicial, se considera que el TNF no provoca muerte en la mayoría de las células sino que básicamente induce activación de las células. Así, el rol del TNF como factor de supervivencia se ha descrito en distintos tipos celulares, destacando sobre todo su papel como neuroprotector promoviendo la supervivencia de neuronas (Muñoz-Fernandez y cols., 1998; Temkin y Levi-Schaffer, 2001; Basile y cols., 2003; Marchetti y cols., 2004; Wang y cols., 2005; Bieler y cols., 2007; Sass y cols., 2007; Dolga y cols., 2008; Figiel, 2008). En melanoma humano también se ha descrito que TNF puede inducir un efecto antiapoptótico. Así, el tratamiento con TNF previo a irradiación y a otros agentes que supongan estrés celular protege a las células frente a apoptosis (Ronai y cols., 1998; Ivanov y cols., 1999, Gray-Schopfer y col., 2007).

En el bloqueo de la apoptosis por el TNF la activación de NF- κ B desempeña un papel esencial que conduce al bloqueo de la activación de caspasas o que interfiere con agentes proapoptóticos como miembros de la familia Bcl-2 o la vía PI3/Akt (Wang y cols., 1998; Xu y El-Deiry, 2000; Chen y Goeddel, 2002; Liu y cols., 2007). Podría ser que en el melanoma B16 el TNF esté regulando estas vías que conducen a supervivencia u otras alternativas.

El melanoma es un tipo tumoral que se caracteriza por su gran capacidad para evadir la muerte celular, quizás debido en parte a las vías metabólicas específicas de la línea melanocítica. Este hecho subyace a la elevada resistencia del melanoma a los tratamientos antitumorales habituales. Todavía no se conocen en su totalidad los mecanismos responsables de la resistencia del melanoma se han descrito diversas vías que conducen a la supervivencia. Y muchas de ellas pueden ser reguladas por el TNF. En relación a esto, ya se ha mencionado la regulación que puede ejercer sobre MITF y la vía BRAF, que conducen a supervivencia.

De la misma forma, TNF es capaz de regular negativamente PTEN (Kim y cols., 2004; Koul y cols., 2006). PTEN se considera un gen supresor de tumor que codifica una fosfatasa cuya pérdida está implicada en el desarrollo tumoral fundamentalmente porque el bloqueo de PTEN permite la activación de la vía PI3K/Akt y por tanto el aumento de resistencia (Yamada y Araki, 2001; Baker, 2007; Salmena y cols., 2008; Song y cols., 2012).

La pérdida de PTEN se ha asociado a progresión tumoral en melanoma (Stahl y cols., 2003; Wu y cols., 2003; Slipicevic y cols., 2005; Mirmohammadsadegh y cols., 2006; Dankort y cols., 2009; Paraiso y cols., 2011), y también a un aumento en la expresión de p21 (Lin y cols., 2007), sin embargo, también se ha descrito un efecto positivo sobre la migración/capacidad de invasión (Bowen y cols., 2009). En nuestro trabajo el TNF inhibía la capacidad de invasión de las células de melanoma, por lo que; aunque este efecto y la vía que lleva a supervivencia pueden ser independientes (Leslie y cols., 2005) no parece probable que PTEN tenga algo que ver con el efecto de TNF en el melanoma B16.

Otra vía que relaciona el TNF, supervivencia y migración podría ser a través de la familia de los inhibidores de apoptosis IAPs (Devereaux y Reed, 1999) en melanoma, moléculas IAPs se han asociado a la supervivencia de las células (Chawla-Sarkar, 2004), y además pueden ejercer un control negativo de la capacidad de migración de las células tumorales (Oberoi y cols., 2012). El TNF conduce a un aumento de IAPs que, vía NF- κ B suprimen la actividad de caspasas (Wang y cols., 1998; Mahoney y cols., 2008; Varfolomeev y cols., 2008). Por otra parte, al menos en células endoteliales, el efecto de supervivencia de IAPs se ha visto que se acompaña de inhibición de la proliferación y aumento de la expresión de p21^{WAF1/Cip1} (Levkau y cols., 2001).

Por otra parte, como ya se ha señalado anteriormente, el TNF es protector frente a la actividad lítica del propio factor: si se induce la expresión endógena de TNF las células se volvían resistentes y no se producía muerte celular cuando se cultivaban en presencia de TNF exógeno (Himeno y cols., 1990; Van Antwerp y cols., 1998). Otros sin embargo, han descrito que la producción autocrina de TNF está ligada a muerte por el factor (Petersen y cols., 2007; Robbs y cols., 2013). En cualquier caso, las vías que conducen a supervivencia y a muerte están interconectadas y que la decisión que lleva a vida o muerte depende del contexto concreto de la célula.

Nosotros también quisimos determinar también si las células B16 podrían sintetizar el factor, sin embargo los resultados fueron negativos: no hubo presencia de TNF en el medio de cultivo ni siquiera cuando las células se estimularon con PMA, un potente inductor de la síntesis de TNF.

No podemos descartar que haya expresión del mRNA para el TNF pero que la traducción esté suprimida. De hecho la producción de TNF puede ocurrir en una gran variedad de células. Así, se ha observado producción del TNF en el melanoma humano (Castelli y cols., 1994; Ahmed y cols., 1995; Sander y Boeryd, 1996; Bergenwald y cols., 1997) y en muchos otros tipos tumorales como el cáncer de ovario (Szlosarek y cols., 2006), tumores gastrointestinales, de mama y pulmón (Spriggs y cols., 1988; Qin y cols., 1993; Hsieh y cols., 2004); pero es un proceso con una regulación muy compleja que puede ser regulado en distintos puntos mediante mecanismos transcripcionales y postranscripcionales (Beutler y col., 1986; Piecyk y cols., 2000).

3. TNF y el microambiente tumoral

Los resultados del efecto del TNF sobre las células del melanoma B16 cobran relevancia a la luz de las investigaciones realizadas en la última década sobre el microambiente tumoral. Las células tumorales no generan cáncer ellas solas sino en colaboración con células que forman parte del tejido local donde se desarrolla el tumor o que son reclutadas al tumor. Como fruto de la interacción entre las células tumorales y las células del estroma se genera un microambiente tumoral específico que, como cada vez parece más claro, contribuye a la carcinogénesis y progresión tumoral (Hanahan y Weinberg, 2000; Lorusso y Rüegg, 2008).

En el microambiente tumoral se han identificado diversos tipos celulares, destacando por su actividad protumoral los macrófagos infiltrantes del tumor; la principal célula productora de TNF (Condeelis y Pollard, 2006; Qian y Pollard, 2010; Balkwill y cols., 2012; Hanahan y Coussens; 2012). Los macrófagos pueden ser inducidos “in situ” a sintetizar TNF que será utilizado por las células tumorales en su propio beneficio (Oguma y cols., 2008; Kim y cols., 2009; Cordero y cols., 2010).

El TNF presente en el microambiente tumoral puede actuar de factor de supervivencia directamente, pero también puede inducir inmunosupresión y facilitar la evasión de la respuesta inmune por las células tumorales. Así, se ha demostrado recientemente que el TNF induce la acumulación de células reguladoras que, directamente, o a través de la liberación de IL-10, suprimen la respuesta de los linfocitos T (Schioppa y cols., 2011; Zhao y cols., 2012). En el caso del melanoma, se ha descrito otro mecanismo para escapar del sistema inmune: el TNF induce pérdida de antígenos en las células tumorales (desdiferenciación) que lleva a evasión de la respuesta inmune y resistencia a inmunoterapia (Landsberg y cols., 2012).

Por otra parte en la última década ha cobrado fuerza una vieja hipótesis estrechamente relacionada con el concepto de microambiente tumoral: la asociación entre inflamación y cáncer. El desarrollo tumoral puede estar favorecido por una condición inflamatoria previa, pero actualmente parece cada vez más evidente que, en otros casos, es la propia transformación oncogénica la que induce un microambiente inflamatorio protumoral (Coussens y Werb, 2002; Balkwill y Coussens, 2004; Mantovani, 2005; Aggarwall y cols., 2006; Hussain y Harris, 2007; Mantovani y cols., 2008; Colotta y cols., 2009; Grivennikov y cols., 2009; Atsumi y cols., 2014). El TNF, uno de los principales factores inflamatorios, puede ser el lazo de unión esencial que ligue inflamación y cáncer;

probablemente por su efecto sobre NF- κ B (Aggarwal, 2004; Pilarsky y cols., 2004; Amiri y Richmond, 2005; Balkwill, 2006; Karin, 2005; Szlosarek y cols., 2006; Balkwill, 2009; Sethi y cols., 2008).

Más aún, en esta misma línea, las investigaciones más recientes ponen de relieve la importancia que puede tener la flora bacteriana específica en el desarrollo del tumoral, confirmando la asociación entre infección y cáncer. La interacción entre la microbiota específica y las células del sistema inmune responsable de la respuesta innata configuran un microambiente que puede ser más o menos favorable para las células tumorales y puede ser uno de los factores que determinen la respuesta a los tratamientos antitumorales (Levy y cols., 2013; Pennisi y cols., 2013; Viaud y cols., 2013). Precisamente uno de estos trabajos se ha llevado a cabo en el melanoma B16.

Como se ha señalado ya, en nuestro modelo “in vitro”, las células de melanoma no son productoras de TNF, sin embargo, podrían utilizar TNF producido por células del entorno, de forma paracrina. Estudios anteriores con células B16 ya describían un efecto protumoral del TNF aunque el mecanismo propuesto era fundamentalmente por el efecto pro-adhesión y angiogénico del TNF, que favorece la metástasis.

Además de TNF, otros factores proinflamatorios como la IL-6, otras interleucinas o quimiocinas pueden estar presentes en el microambiente tumoral. Estos factores solubles pueden estar interactuando o incluso actuar de forma sinérgica favoreciendo el desarrollo tumoral. (Cubillos y cols., 1997; Charles y cols., 2009; Kim y cols., 2009). En nuestro trabajo hemos querido determinar si existía interacción entre la IL-2, IL-6 y el TNF.

Tratamos las células con TNF con el fin de inducir la producción de IL-6 ya que el TNF se considera un potente inductor de la expresión de IL-6 en fibroblastos, en células leucocitarias y otros tipos celulares (Norris y cols., 1994; Beyaert y cols., 1996; De Cesaris y cols., 1998; Vanden Berghe y cols., 1998; Wysk y cols., 1999; You y cols., 2001; Williams y cols., 2008; Montfort y cols., 2009; Tanabe y cols., 2010; Tseng y cols., 2010; McFarland y cols., 2013). Así mismo, en melanoma humano se ha descrito aumento de la expresión de IL-6 a nivel transcripcional y postranscripcional por sobreexpresión de NF- κ B. Los resultados sin embargo, fueron negativos. Concluimos por tanto que, las vías que pone en marcha el tratamiento con TNF no conducen a la inducción de IL-6 en el melanoma B16, o al menos a la secreción de IL-6.

Quisimos determinar también si el pretratamiento de las células con IL-2 o con IL-6 revertía el efecto inhibitor del TNF, pero no hubo cambios apreciables; no evitó por ejemplo la pérdida de capacidad de formación de colonias. Tampoco el pretratamiento con estas interleucinas indujo la liberación de TNF en los sobrenadantes de los cultivos. En cualquier caso, no podemos excluir la posibilidad de que la falta de interacciones entre estos factores se deba al planteamiento experimental utilizado.

A la vista investigaciones recientes y de nuestros propios resultados sigue vigente la cuestión de la dualidad del TNF: ¿es el TNF un agente antitumoral o protumoral? La respuesta a esta cuestión puede tener connotaciones importantes de cara a las nuevas estrategias terapéuticas antitumorales: a pesar de su denominación el TNF podría convertirse en un objetivo a ser eliminado (Watersston y Bower, 2004; Wang y Lin, 2008; Balkwill, 2009; Bertazza y Mocellin, 2010).

En un intento por recoger la base común que subyace a la enorme diversidad del cáncer, Hanahan y Weinberg propusieron seis rasgos que caracterizan al cáncer (“hallmarks of cancer”): señalización proliferativa mantenida, evasión de los supresores del crecimiento, resistencia a muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis y activación de invasión y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000). Según este esquema, la células tumoral es un “fuera de la ley” capaz de evadir las barreras intrínsecas protectoras del organismo utilizando para ello diferentes soluciones. Posteriormente dos rasgos más se han añadido en este esquema: la evasión de la respuesta inmune junto con la reprogramación del metabolismo energético y se ha admitido la importancia de la inflamación en el proceso neoplásico (Hanahan y Weinberg, 2011). Es posible que el TNF participe en la adquisición de la mayoría de estos rasgos tumorales por lo que ahora más que nunca es de especial relevancia profundizar en los efectos de este factor.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten extraer las siguientes conclusiones:

- 1.- Las células del melanoma B16 no expresan la subunidad alfa del RIL-2 pero sí expresan la subunidad beta del receptor de la IL-2 lo que podría afectar a la interacción con las células del sistema inmune en el microambiente tumoral.
- 2.- El RIL-2 es funcional ya que IL-2 indujo un descenso en la actividad invasiva de las células y la modulación de la proteína de adhesión ICAM-1.
- 3.- La IL-6 indujo un marcado descenso en la invasión de las células del melanoma B16 y un incremento en la expresión de la molécula de adhesión VLA-4.
- 4.- La IL-2 y la IL-6 no afectan a la actividad proliferativa de las células B16, ya que el tratamiento con estos factores no modificó la tasa de proliferación ni de formación de colonias de las células tumorales.
- 5.- El TNF disminuyó la capacidad de invasión de las células y modificó la expresión de las moléculas de adhesión CD44, que aumentó y de VLA-4, que resultó regulada negativamente.
- 6.- El TNF afecta al crecimiento de las células del melanoma B16, induciendo una ralentización del ciclo; así mismo, anula la capacidad clonogénica de las células B16, lo que indica que está interfiriendo con los mecanismos de regulación del ciclo celular. Además, este efecto parece estar asociado a una modulación del estado redox de las células B16.
- 7.- Aunque no podemos excluir otros mecanismos, el p21^{WAF1/CIP1}, uno de los principales inhibidores del ciclo celular, está directamente implicado en la inhibición de la proliferación; sin embargo, la ceramida no parece involucrada ya que indujo un efecto distinto sobre las células que condujo a muerte celular.

8.- Las células del melanoma B16 no liberan IL-2, IL-6 o TNF al medio de cultivo, ni en condiciones basales, ni tras estimulación, por lo que no parece haber una utilización autocrina de estos factores.

9.- La modulación inducida por IL-2, IL-6 y por el TNF, aunque inhibidora para algunas funciones de las células de melanoma B16, es compatible con un papel de estas citocinas como factores de supervivencia, que podría contribuir al desarrollo tumoral.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas T. & Dutta A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer* 9 (6): 400-414.
- Acharya A, Das I, Chandhok D, Saha T. 2010. Redox regulation in cancer. A double-edged sword with therapeutic potential. *Oxidative Med. Cell. Longevity* 3 (1): 23-34.
- Adinolfi E, Callegari M.G, Cirillo M, Pinton P, Giorgi C, Cavagna D, Rizzuto R, Di Virgilio F. 2009. Expression of the P2X₇ receptor increases the Ca²⁺ content of the endoplasmic reticulum, activates NFATc1, and protects from apoptosis. *J. Biol. Chem.* 284: 10120-10128.
- Administración de la Comunidad Autónoma del País Vasco. Departamento de Sanidad y Consumo. (Datos publicados en Octubre de 2010). www.osakidetza.euskadi.net/r8520319/es/contenidos/informacion/estado_salud/es_5463/adjuntos/cancer.pdf
- Agarwala S.S. di Pietro A, Flaherty K.T, Garbe C, Grob J-J, Kashani-Sabet M, Kirkwood J.M, Leachman S, Messina J, O'Day S, Ribas A, Sondak V. 2010. Meeting report from the third global workshop on melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 23: e1-e7.
- Agathocleous M. & Harris W.A. 2013. Metabolism in physiological cell proliferation and differentiation. *TRENDS Cell Biol.* 23 (10): 484-492.
- Aggarwal B.B, Gupta S.C, Kim J.H. 2011. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: twenty-five years later a golden journey. *Blood.* 119 (3): 651-665.
- Aggarwal B.B, Kunnumakkara A.B, Harikumar K.B, Gupta S.R, Tharakan S.T, Koca C, Dey S, Sung B. 2009. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann. N Y Acad. Sci.* 1171: 59-76.
- Aggarwal B.B, Samanta A, Feldmann M. 2001. TNF- α Cytokine Reference, In Oppenheim J. and Feldman M. Editors, Academic Press. London: 413-434.
- Aggarwal B.B, Shishodia S, Sandur S.K, Pandey M.K, Sethi G. 2006. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem. Pharmacol.* 72: 1605-1621.
- Aggarwal B.B, Vijayalekshmi R.V, Sung B. 2009(a). Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin. Cancer Res.* 15: 425-430.
- Aggarwal B.B. 2004. Nuclear factor- κ B: the enemy within. *Cancer Cell* 6: 203-208.
- Ahrens T, Assmann V, Fieber C, Termeer C.C, Herrlich P, Hofmann M, Simon J.C. 2001. CD44 is the principal mediator of hyaluronic-acid-induced melanoma cell proliferation. *J. Invest. Dermatol.* 116: 93-101.
- Ahrens T, Sleeman J.P, Schempp C.M, Howells N, Hofmann M, Ponta H, Herrlich P, Simon J.C. 2001(a). Soluble CD44 inhibits melanoma tumor growth by blocking cell surface CD44 binding to hyaluronic acid. *Oncogene* 20: 3999-3408.
- Akashi M, Hachiya M, Osawa Y, Spirin K, Suzuki G, Koeffler H.P. 1995. Irradiation induces WAF1 expression through a p53-independent pathway in KG-1 cells. *J.Biol. Chem* 270 (32): 19181-19187.
- Akst J. 2012. Cancer exosomes promote metastasis visicles released by melanoma cells stimulate pro-metastatic behaviors in bone marrow cells. *The Scientist* (May 29).
- Alderton G.K. 2012. Tumour microenvironment. The haves and the have nots. *Nature Rev. Cancer* 12: 505 (doi: 10.1038/nrc3330).
- Alderton G.K. 2014. Combination and dosing schedule are key. *Nature Rev. Cancer* 14 (4): 215-215.

- Alileche A, Plaisance S, Hn D.S, Rubinstein E, Mingari C, Bellomo R, Jasmin C, Azzarone B. 1993. Human melanoma cell line M14 secretes a functional interleukin 2. *Oncogene* 8 (7): 1791-1796.
- Allavena P, Germano G, Marchesi F, Mantovani A. 2011. Review: chemokines in cancer related inflammation. *Exp. Cell Res.* 317 (5): 664-673.
- Alshamsan A, Hamdy S, Haddadi A, Samuel J, El-Kadi A.O.S, Uludag H, Lavasanifar A. 2011. STAT3 knockdown in B16 melanoma by siRNA lipopolyplexes induces bystander immune response in vitro and in vivo. *Translational Oncology* 4 (3): 178-188.
- Alshamsan A, Hamdy S, Samuel J, El-Kadi A.O.S, Lavasanifar A, Uludag H. 2010. The induction of tumor apoptosis in B16 melanoma following STAT3 siRNA delivery with a lipid-substituted polyethylenimine. *Biomaterials* 31 (6): 1420-1428.
- Álvarez Mon-Soto M, Camacho Martínez F, Díaz Pérez J.L, Díaz Rubio E, González Larriba J.G, Guillen Porta V, López López J.J, Moreno Nogueira J.A, Serrano Ortega S, Toribio Pérez J. 2005. *Melanoma*. Ed. Just in Time S.L., Madrid.
- American Cancer Society. 2007. Learn about skin cancer-melanoma. Atlanta, GA: American Society. (www.cancer.org).
- Ameyar M, Atfi A, Cai Z, Stancou R, Shatrov V, Bettaie B, Chouaib S. 1998. Analysis of human breast adenocarcinoma MCF-7 resistance to tumor necrosis factor-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 273 (44): 29002-29008.
- Amiri K.I. & Richmond A. 2005. Role of nuclear factor- κ B in melanoma. *Cancer and Metastasis Rev.* 24: 301-313.
- Anasagasti M.J, Alvarez A, Avivi C, Vidal-Vanaclocha F. 1996. Interleukin-1-mediated H₂O₂ production by hepatic sinusoidal endothelium in response to B16 melanoma cell adhesion. *J.Cell. Physiol.* 167: 314-323.
- Anaya J.M. 2003. Descripción molecular del TNF- α . *Reumatología* 19 (2): 112-120.
- Ancrile B, Lim K-H, Counter C.M. 2007. Oncogenic Ras-induced secretion of IL-6 is required for tumorigenesis. *Genes & Dev.* 21: 1714-1719.
- Andereg U, Eichenberg T, Parthaune T, Haiduk C, Saalbach A, Milkova L, Ludwig A, Grosche J, Averbeck M, Gebhardt C, Voelcker V, Sleeman J.P, Simon J.C. 2009. ADAM10 is the constitutive functional sheddase of CD44 in human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 129 (6): 1471-1482.
- Andreasen P.A, Kjoller L, Christensen L, Duffy M.J. 1997. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int. J. Cancer* 72 (1): 1-22.
- Andreassen P.A, Egelund R, Petersen H.H. 2000. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol. Life Sci.* 57 (1): 25-40.
- Ara T. & DeClerck Y.A. 2010. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur. J. Cancer* 46 (7): 1223-1231.
- Argilés J.M. & López-Soriano F.J. 1997. Cancer Cachexia: a key role for TNF? *Int. J. Oncol.* 10: 565-572.
- Ariel A, Yavin E.J, Hershkovich R, Avron A, Franitza S, Hardan I, Cahalon L, Fridkin M, Lider O. 1998. IL-2 induces T cell adherence to extracellular matrix: inhibition of adherence and migration by IL-2 peptides generated by leukocyte elastase. *J. Immunol.* 161: 2465-2472.
- Armant M, Delespesse G, Sarfati M. 1995. IL-2 and IL-7 but not IL-12 protect natural killer cells from death by apoptosis and up-regulate bcl-2 expression. *Immunology* 85: 331-337.

- Arozarena I, Sanchez-Laorden B, Packer L, Hidalgo-Carcedo C, Hayward R, Viros A, Sahai E, Marais R. 2011. Oncogenic BRAF induces melanoma cell invasion by downregulation the cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A. *Cancer Cell* 19 (1): 45-57.
- Arpin M, Chirivino D, Naba A, Zwaenepoel I. 2011. Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. *Cell Adhesion & Migration* 5 (2): 199-206.
- Arsic N, Bendris N, Peter M, Begon-Pescia C, Rebouissou C, Gadéa G, Bouquier N, Bibeau F, Lemmers B, Blanchard J.M. 2012. A novel function for cyclin A2: control of cell invasion via RhoA signaling. *J. Cell Biol.* 196 (1): 147-162.
- Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill C.B, Seed B. 1990. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61 (7): 1303-1313.
- Arzt E, Buric R, Stelzer G, Stalla J, Sauer J, Renner U, Stalla G.K. 1993. Interleukin involvement in anterior pituitary cell growth regulation: effects of IL-2 and IL-6. *Endocrinology* 132 (1): 459-467.
- Arzt E, Stelzer G, Renner U, Lange M, Müller O.A, Stalla G.K. 1992. Interleukin-2 and interleukin-2 receptor expression in human corticotrophic adenoma and murine pituitary cell cultures. *J. Clin. Invest.* 90: 1944-1951.
- Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). 2011.
www.aecc/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/melanoma/Paginas/
- Ataie-Kachoie P, Pourgholami M.H, Morris D.L. 2013. Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. *Cytokine & Growth Factor Rev.* 24: 163-173.
- Atkins M.B. 2006. Cytokine-based therapy and biochemotherapy for advanced melanoma. *Clin. Cancer Res.* 12 (7 Suppl): 2353s-2358s.
- Atsumi T, Singh R, Sabharwal L, Bando H, Meng J, Arima Y, Yamada M, Harada M, Jiang J-J, Kamimura D, Ogura H, Hirano T, Murakami M. 2014. Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer Res.* 74 (1): 8-14.
- Avinoach I. & Aflalo E. 1992. Human melanoma cell lines established from metastasis of a patient with a completely regressed primary site. *Cancer* 69: 113-122.
- Avril M.F, Charpentier P, Margulis A, Guillaume J.C. 1992. Regression of primary melanoma with metastases. *Cancer* 69: 1377-1381.
- Azzarone B, Pottin-Clemenceau C, Krief P, Rubistein E, Jasmin C, Scudeletti M, Indiveri F. 1996. Are interleukin-2 and interleukin-15 tumor promoting factors for human non-hematopoietic cells? *Eur. Cytokine Netw.* 7 (1): 27-36.
- Baaten B.J.G, Li C-R, Deiro M.F, Lin M.M, Linton P.J, Bradley L.M. 2010. CD44 regulates survival and memory development in Th1 cells. *Immunity* 32: 104-115.
- Bachmann M.F. & Oxeneus A. 2007. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Reports* 8 (12): 1142-1148.
- Baker P.E, Gillis S, Smith K.A. 1979. Monoclonal cytolytic T-cell lines. *J. Exp. Med.* 149 (1): 273-278.
- Baker S.J & Premkumar Reddy E. 1996. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 12: 1-9.
- Baker S.J. & Premkumar Reddy E. 1998. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17: 3261-3270.

- Baker S.J. 2007. PTEN enters the nuclear age. *Cell* 128 (1): 25-28.
- Balch C.M, Buzaid A.C, Atkins M.B, Cascinelli N, Coit D.G, Fleming I.D, Houghton A, Kirkwood J.M, Mihm M.F, Morton D.L, Reintgen D, Ross M.I, Sober A, Soong S-J, Thompson J.A, Thompson J.F, Gershenwald J.E, McMasters K.M, 2000. A new american joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer* 88 (6): 1484-1491.
- Balch C.M, Gershenwald J.E, Soong S.J, Thompson J.F, Atkins M.B, Byrd D.R, Buzaid A.C, Cochran A.J, Coit D.G, Ding S, Eggermont A.M, Flaherty K.J, Gimotty P.A, Kirkwood J.M, McMasters K.M, Mihm M.C. Jr, Morton D.L, Ross M.I, Sober A.J, Sondak V.K. 2009. AJCC melanoma staging and classification. *J. Clin. Oncol.* 27 (36): 6199-6206.
- Balkwill F. & Coussens L.M. 2004. An inflammatory link. *Nature* 431: 405-406.
- Balkwill F. 2006. TNF- α in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 25: 409-416.
- Balkwill F.R, Capasso M, Hagemann T. 2012. The tumor microenvironment at a glance. *J. Cell Sci.* 125: 5591-5596.
- Balkwill F.R. & Burke F. 1989. The cytokine network. *Immunol. Today* 10: 299-304.
- Balkwill F.R. 2009. Tumour necrosis factor and cancer. *Nature Rev.* 9 (5): 361-371.
- Ball K.L, 1997. p21: structure and functions associated with cyclin-CDK binding. *Prog. Cell Cycle Res.* 3: 125-134.
- Bani M.R, Rak J, Adachi D, Wiltshire R, Trent J.M, Kerbel R.S, Ben-David Y. 1996. Multiple features of advanced melanoma recapitulated in tumorigenic variants of early stage (radial growth phase) human melanoma cell lines: evidence for a dominant phenotype. *Cancer Res.* 56: 3075-3086.
- Baramova E.N, Coucke P, Leprince P, De Pauw-Gillet M.C, Bassleer R, Foidart J.M. 1994. Evaluation of matrix metalloproteinases and serine proteases activities in three B16 melanoma cell line with disinct tumorigenic potential. *Anticancer Res.* 14 (3A): 841-846.
- Barbu A. 2004. The use of tetrazolium salt-based methods for determination of islet cell viability in response to cytokines: a cautionary note. *Diabetologia* 47: 2042-2043.
- Baregamian N, Song J, Bailey C.E, Papaconstantinou J, Evers B.M, Chong D.H, 2009. Tumor necrosis factor- α and apoptosis signal-regulating kinase 1 control reactive oxygen species release, mitochondrial autophagy, and c-Jun N-terminal kinase/p38 phosphorylation during necrotizing enterocolitis. *Oxidative Medicine & Cellular Longevity* 2 (5): 297-306.
- Barshishat M, Ariel A, Cahalon L, Chowars Y, Lider O, Schwart B. 2002. TNF- α and IL-8 regulate the expression and fuction of CD44 variant proteins in human colon carcinoma cells. *Clin. Exp. Metastasis.* 19 (4): 327-337.
- Bartholdy C, Nansen A, Marker O, Thomsen A.R. 1999. Soluble tumour necrosis factor (TNF)-receptor levels in serum as markers of antiviral host reactivity. *Clin. Exp. Immunol.* 116: 299-306.
- Basile J.R, Eichten A, Zacny V, Münger K. 2003. NF- κ B mediated induction of p21^{Cip1/Waf1} by tumor necrosis factor α induces growth arrest and cytoprotection in normal human keratinocytes. *Mol. Cancer Res.* 1: 262-270.
- Basquin C. & Sauvonnnet 2013. Phosphoinositide-3-kinase at the crossroad between endocytosis and signaling of cytokine receptors. *Comm. & Integrated Biol.* 6:4, e24243.
- Bastian B.C. 2008. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic. *PloS Med* 3; 5 (6): e120 18532874.

- Bataille R, Jourdan M, Zhang X.G, Klein B. 1989. Serum levels of interleukin-6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias. *J. Clin. Invest.* 84 (6): 2008-2011.
- Batchelor C.L, Woodward A.M, Crouch D.H. 2004. Nuclear ERM (ezrin, radixin, moesin) proteins: regulation by cell density and nuclear import. *Exp. Cell Res.* 296 (2): 208-222.
- Bates R.C, Edwards N.S, Burns G.F, Fisher D.E. 2001. A CD44 survival pathway triggers chemoresistance via Lyn kinase and phosphoinositide 3-kinase/Akt in colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 61: 5275-5283.
- Baud V. & Karin M. 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *TRENDS in Cell Biology* 11 (9): 372-377.
- Bazzoni F. & Regalia E. 2001. Triggering of antitumor activity through melanoma-specific transduction of a constitutively active tumor necrosis factor (TNF) R1 chimeric receptor in the absence of TNF- α . *Cancer Res.* 61: 1050-1057.
- Bedard K. & Krause K-H. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87: 245-313.
- Bedia C, Casas J, Andrieu-Abadie N, Fabriàs G, Levade T. 2011. Acid ceramidase expression modulates the sensitivity of A375 melanoma cells to dacarbazine. *J. Biol. Chem.* 286 (32): 28200-28209.
- Bektas M, Jolly P.S, Müller C, Eberle J, Spiegel S, Geilen C.C. 2005. Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene* 24: 178-187.
- Belizario J.E. & Dinarello C.A. 1991. Interleukin 1, interleukin 6, tumor necrosis factor, and transforming growth factor β increase cell resistance to tumor necrosis factor cytotoxicity by growth arrest in the G₁ phase of the cell cycle. *Cancer Res.* 51: 2379-2385.
- Bellido T, O'Brien C.A, Roberson P.K, Manolagas S.C. 1998. Transcriptional activation of the p21^{WAF1,CIP1,SDI1} gene by interleukin-6 type cytokines. *J. Biol. Chem.* 273 (33): 21137-21144.
- Bennett D.C. 2008(a). Ultraviolet wavebands and melanoma initiation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21: 520-524.
- Bennett D.C. 2008. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res.* 21: 27-38.
- Bennicelli J.L. & Guerry D. 4th. 1993. Production of multiple cytokines by cultured human melanomas. *Exp. Dermatol.* 2 (4): 186-190.
- Berger M.F, Hodis E, Heffernan T.P, Lissanu Deribe Y, Lawrence M.S, Protopopov A, Ivanova E, Watson I.R, Nickerson E, Ghosh P, Zhang H, Zeid R, Ren X, Cibulskis K, Sivachenko A.Y, Wagle N, Sucker A, Sougnez C, Onofrio R, Ambrogio L, Auclair D, Fennell T, Carter S.L, Drier Y, Stojanov P, Singer M.A, Voet D, Jing R, Saksena G, Barretina J, Ramos A.H, Pugh T.J, Stransky N, Parkin M, Winckler W, Mahan S, Ardlie K, Baldwin J, Wargo J, Schadendorf D, Meyerson M, Gabriel S.B, Golub T.R, Wagner S.N, Lander E.S, Getz G, Chin L, Garraway L.A. 2012. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* 485: 502-506.
- Berridge M.V, Tan A.S, McCoy K.D, Wang R. 1996. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 4: 14-19.
- Bertazza L. & Mocellin S. 2008. Tumor necrosis factor (TNF) biology and cell death. *Front Biosci.* 13: 2736-2743.

- Bertazza L. & Mocellin S. 2010. The dual role of tumor necrosis factor (TNF) in cancer biology. *Curr. Med. Chem.* 17 (29): 3337-3352.
- Beutler B. & Cerami A. 1986. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 320: 584-588.
- Beutler B. & Cerami A. 1988. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 505-518.
- Beutler B. 1995. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J. Invest. Med.* 43 (3): 227-235.
- Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee J.C, Haegeman G, Cohen P, Fiers W. 1996. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J.* 15: 1914-1923.
- Beyaert R. & Fiers W. 1994. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity: What we do understand and what we do not. *FEBS Letters* 340: 9-16.
- Bhoulmik A, Huang T-G, Ivanov V, Gangi L, Qiao R.F, Woo S.L.C, Chen S-H, Ronai Z. 2002. An ATF2-derived peptide sensitizes melanomas to apoptosis and inhibits their growth and metastasis. *J. Clin. Invest.* 110 (5): 643-650.
- Bianchi K. & Meier P. 2009. A tangled web of ubiquitin chains: Breaking news in TNF-R1 signaling. *Molecular Cells* 36: 736-742.
- Bidard F.C, Pierga J.Y, Vicent-Salomon A, Poupon M.F. 2008. A “class action” against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis? *Cancer Metastasis Rev.* 27 (1): 5-10.
- Birchmeier W, Behrens J, Weidner K.M, Frixen U.H, Schipper J. 1991. Dominant and recessive genes involved in tumor cell invasion. *Current Op. Cell. Biol.* 3: 832-840.
- Blanpain C. 2013. Tracing the cellular origin of cancer. *Nature Cell Biology* 15 (2): 126-134.
- Blood C.H. & Zetter B.R. 1990. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim. Biophys. Acta* 1032: 89-118.
- Blundell R.A, 2006. The biology of p21^{Waf1/Cip1}-Review Paper. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 2 (1): 33-40.
- Böhm M, Schulte U, Funk J.O, Raghunath M, Behmann I, Kortylewski M, Heinrich P.C, Kues T, Luger T.A, Schwarz T. 2001. Interleukin-6-resistant melanoma cells exhibit reduced activation of STAT3 and lack of inhibition of cyclin E-associated kinase activity. *J. Invest. Dermatol.* 117 (1): 132-140.
- Boise L.H, Minn A.J, June C.H, Lindsten T, Thompson C.B. 1995. Growth factors can enhance lymphocyte survival without committing the cell to undergo cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 5491-5495.
- Bollrath J, Pheesse T.J, von Burstin V.A, Putoczki T, Bennecke M, Bacterman T, Nebelsiek T, Lundgren-May T, Canli Ö, Schwitalla S, Matthews V, Schmid R.M, Kirchner T, Arkan M.C, Ernst M, Greten F.R. 2009. Gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 15: 91-102.
- Bourguignon L.Y.W, Xia W, Wong G. 2009. Hyalurona-mediated CD44 interaction with p300 and SIRT1 regulates β -catenin signaling and NF- κ B-specific transcription activity leading to MDR1 and Bcl-x_L gene expression and chemoresistance in breast tumor cells. *J. Biol.Chem.* 284 (5): 2657-2671.
- Bowen K.A, Doan H.Q, Zhou B.P, Wang Q, Zhou Y, Rychahou P.G, Evers B.M. 2009. PTEN loss induces epithelial-mesenchymal transition in human colon cancer cells. *Anticancer Res.* 29: 4439-4450.

- Box N.F & Terzian T. 2008. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21: 525-533.
- Boyano M.D, García de Galdeano A, García-Vázquez M.D, Alvarez A, Cañavate M.L. 1999. Cyclosporin A Upmodulates the α -Subunit of the Interleukin-2 Receptor and the Metastatic Ability of Murine B16F10 Melanoma Cells. *Invasion & Metastasis* 18 (3): 122-133.
- Boyano M.D, García de Galdeano A, Smith-Zubiaga I, Cañavate M.L. 1997. IL-2 treatment of B16F10 melanoma cells stimulates metastatic colonization in the liver. *Anticancer Res.* 17: 1135-1142.
- Boyano M.D, García-Vázquez M.D, Gardeazabal J, García de Galdeano A, Smith-Zubiaga I, Cañavate M.,L, Ratón J.A, Bilbao I, Díaz-Pérez J.L. 1997(a). Serum-soluble IL-2 receptor and IL-6 levels in patients with melanoma. *Oncology* 54: 400-406.
- Boyano M.D, García-Vázquez M.D, López-Michelena T, Gardeazabal J, Bilbao J, Cañavate M.L, García de Galdeano A, Izu R, Díaz-Ramón J.L, Ratón J.A, Díaz-Pérez J.L. 2000. Soluble interleukin-2 receptor, intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-10 serum levels in patients with melanoma. *Br. J. Cancer* 83 (7): 847-852.
- Boyman O. & Sprent J. 2012. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Rev. Immunol.* 12: 180-190.
- Bradley J.R. 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* 214 (2): 149-160.
- Bragado P, Sosa M.S, Keely P, Condeelis J, Aguirre-Ghiso J.A. 2012. Microenvironments dictating tumor cell dormancy. *Recent Results Cancer Res.* 195: 25-39.
- Brambilla D. & Fais S. 2009. The janus-faced role of ezrin in “linking” cells to either normal or metastatic phenotype. *Int. J. Cancer* 125 (10): 2239-2245.
- Brar S.S, Kennedy T.P, Sturrock A.B, Hueksteadt T.P, Quinn M.T, Whorton R, Hoidal J.R. 2002. An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282: C1212-C1224.
- Bretscher A, Edwards K, Fehon R.G. 2002. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3 (8): 586-599.
- Bromberg J. & Wang T.C. 2009. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer Cell* 15: 79-80.
- Bromberg J.F, Wrzeszczynska M.H, Devgan G, Zhao Y, Pestell R.G, Albanese C, Darnell J.E. Jr. 1999. Stat3 as an oncogen. *Cell* 98: 295-303.
- Brooks S.A, Lomax-Browne H.J, Carter T.M, Kinch C.E, Hall D.M. 2010. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem.* 112 (1): 3-25.
- Brown D.I. & Griendling K.K. 2009. NOX protein in signal transduction. *Free Rad. Biol. Med.* 47: 1239-1253.
- Brugarolas J, Moberg K, Boyd S.D, Taya Y, Jacks T, Lees J.A. 1999. Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G₁ arrest after γ -irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 1002-1007.
- Bryant J, Ahern D.J, Brennan F.M. 2012. CXCR4 and vascular cell adhesion molecule 1 are key chemokine/adhesion receptors in the migration of cytokine-activated T cells. *Arthritis Rheum.* 64 (7): 2137-2146.
- Brzezinska-Blaszczyk E, Pietrzak A, Misiak-Tloczek A.H. 2007. Tumor necrosis factor (TNF) is a potential rat mast cell chemoattractant. *J. Interferon & Cytokine Res.* 27: 911-919.

- Buckle A.M. & Hogg N. 1990. Human memory T cells express intercellular adhesion molecule-1 which can be increased by interleukin 2 and interferon-gamma. *Eur. J. Immunol.* 20 (2): 337-341.
- Bulló-Bonet M, García-Lorda P, López-Soriano F.J, Argilés J.M, Salas-Salvadó J. 1999. Tumor necrosis factor, a key role in obesity? *FEBS Letters* 451: 215-219.
- Burridge K. & Wennerberg K. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell* 116: 167-179.
- Burton J, Goldman C.K, Rao P, Moos M, Walmann T.A. 1990. Association of intercellular adhesion molecule 1 with the multichain high-affinity interleukin 2 receptor. *Immunology* 87: 7329-7333.
- Busquets S, Aranda X, Ribas-Carbó M, Azcon-Bieto J, López-Soriano F.J, Argilés J.M. 2003. Tumour necrosis factor-alpha uncouples respiration in isolated rat mitochondria. *Cytokine* 22: 1-4.
- Calvo F, Sanz-Moreno V, Agudo-Ibáñez L, Wallberg F, Sahai E, Marshall C.J, Crespo P. 2011. RasGRF suppresses Cdc42-mediated tumour cell movement, cytoskeletal dynamics and transformation. *Nature Cell Biol.* 13: 819-826.
- Cao X, Zhang W, Gu S, Yu Y, Tao Q, Ye T. 1995. Induction of antitumor immunity and treatment of preestablished tumor by interleukin-6-gene-transfected melanoma cells combined with low-dose interleukin-2. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 121: 721-728.
- Cardones A.R, Murakami T, Hwang S.T. 2003. CXCR4 enhances adhesion of B16 tumor cells to endothelial cells in vitro and in vivo via β 1 integrin. *Cancer Res.* 63: 6751-6757.
- Carpinteiro A, Dumitru C, Schenck M, Gulbins E. 2008. Ceramide-induced cell death in malignant cells. *Cancer Letters* 264: 1-10.
- Carreira S, Goodall J, Aksan I, La Rocca S.A, Galibert M.D, Denat L, Larue L, Goding C.R. 2005. Mitf cooperates with Rb1 and activates p21/Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature* 433 (7027): 764-769.
- Carreira S, Goodall J, Denat L, Rodríguez M, Nuciforo P, Hoek K.S, Testori A, Larue L, Goding C.R. 2006. Mitf regulation of Dial controls melanoma proliferation and invasiveness. *Gene & Dev.* 20: 3426-3439.
- Chaffer C.L. & Weinberg R.A. 2011. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331: 1559-1564.
- Chang Q, Bournazou E, Sansone P, Berishaj M, Gao S.P, Daly L, Wels J, Theilen T, Granitto S, Zhang X, Cotari J, Alpaugh M.L, de Stanchina E, Manova K, Li M, Bonafe M, Ceccarelli C, Taffurelli M, Santini D, Altan-Bonnet G, Kaplan R, Norton L, Nishimoto N, Huszar D, Lyden D, Bromberg J. 2013. The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis. *Neoplasia* 15 (7): 848-862.
- Chang W-T, Kang J.J, Lee K-Y, Wei K, Anderson E, Gotmare S, Ross J.A, Rosen G.D. 2001. Triptolide and chemotherapy cooperate in tumor cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276 (3): 2221-2227.
- Charles K.A, Kulbe H, Soper R, Escorzio-Correlá M, Lawrence T, Schultheis A, Chakravarty P, Thompson R.G, Kollias G, Smyth J.F, Balwill F.R, Hagemann T. 2009. The tumor-promoting actions of TNF- α involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J. Clin Invest.* 119 (10): 3011-3023.
- Chaubal V.A, Nair S.S, Ito S, Wakamatsu K, Mojamdar M.V. 2002. γ -Glutamyl transpeptidase and its role in melanogenesis: redox reactions and regulation of tyrosinase. *Pigment Cell Res.* 15 (6): 420-425.

- Chawla-Sarkar M, Bae S.I, Reu F.J, Jacobs B.S, Lindner D.J, Borden E.C. 2004. Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and surviving) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 11: 915-923.
- Cheli Y, Giuliano S, Fenouille N, Allegra M, Hofman V, Hofman P, Bahadoran P, Lacour J-P, Tartare-Deckert S, Bertolotto C, Ballotti R. 2012. Hypoxia and MITF control metastatic behavior in mouse and human melanoma cells. *Oncogene* 31: 2461-2470.
- Cheli Y, Giuliano S, Botton T, Rocchi S, Hofman V, Hofman P, Bahadoran P, Bertolotto C, Ballotti R. 2011. Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiation progeny. *Oncogen* 30: 2307-2318.
- Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, Bertolotto C. 2009. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 23: 21-40.
- Chen C-C, Sun Y-T, Chen J-J, Chang Y-J. 2001. Tumor necrosis factor- α -induced cyclooxygenase-2 expression via sequential activation of ceramide-dependent mitogen-activated protein kinases, and I κ B kinase 1/2 in human alveolar epithelial cells. *Mol. Pharmacol.* 59 (3): 493-500.
- Chen G. & Goeddel D.V. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296 (5573): 1634-1635.
- Chen X. & Rotenberg S.A. 2010. PhosphoMARCKS drives motility of mouse melanoma cells. *Cell Signal* 22 (7): 1097-1103.
- Cheng M, Olivier P, Diehl J.A, Fero M, Roussel M.F, Roberts J.M, Sherr C.J. 1999. The p21^{Cip1} and p27^{Kip1} CDK “inhibitors” are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* 18 (6): 1571-1583.
- Chigaev A, Waller A, Zwartz G.J, Buranda T, Sklar L.A. 2007. Regulation of cell adhesion by affinity and conformational unbending of alpha4beta1 integrin. *J. Immunol.* 178 (11): 6828-6839.
- Chigaev A, Zwartz G, Graves S.W, Dwyer D.C, Tsuji H, Foutz T.D, Edwards B.S, Prossnitz E.R, Larson R.S, Sklar L.A. 2003. Alpha4beta1 integrin affinity changes govern cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 278 (40): 38174-38182.
- Chou J, Lin J.H, Brenot A, Kim J-w, Provot S, Werb Z. 2013. GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression. *Nature Cell Biol.* 15: 201-213.
- Chu M.B, Fesler M.J, Armbrecht E.S, Fosko S.W, Hsueh E, Richard J.M. 2013. Study high-dose interleukin-2 (HD IL-2) therapy should be considered for treatment of patients with melanoma brain metastases. *Chemotherapy Res. Practice* 2013. Id: 726925, 7 pages.
- Chua H.L, Bhat-Nakshatri P, Clare S.E, Morimiya A, Badve S, Nakshatri H. 2007. NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene* 26 (5): 711-724.
- Cianchi F, Vinci M.C, Supuran C.T, Peruzzi B, De Giuli P, Fasolis G, Perigli G, Pastorekova S, Papucci L, Pini A, Masini E, Puccetti L. 2010. Selective inhibition of carbonic anhydrase IX decreases cell proliferation and induces ceramide-mediated apoptosis in human cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334 (3): 710-719.
- Ciotti P, Rainero M.L, Nicolò G, Spina B, Garrè C, Casabona F, Santi P.L, Bianchi-Scarrà G. 1995. Cytokine expression in human primary and metastatic melanoma cells: analysis in fresh biopsic specimens. *Melanoma Res.* 5: 41-47.
- Clark E.A, Golub T.R, Lander E.S, Hynes R.O. 2000. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 406 (6795): 532-535.

- Clark W.H, Elder D.E, Guerry D.I.V, Epstein M.N, Greene M.H, Van Horn M. 1984. A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathol.* 15: 1147-1165.
- Coleman M.L, Densham R.M, Croft D.R, Olson M.F. 2006. Stability of p21^{Waf1/Cip1} CDK inhibitor protein is responsive to RhoA-mediated regulation of the actin cytoskeleton. *Oncogene* 25 (19): 2708-2716.
- Colombo M.P, Maccalli C, Mattei S, Melani C, Radrizzani M, Parmiani G. 1992. Expression of cytokines genes, including IL-6, in human malignant melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 2 (3): 181-189.
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. 2009. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30 (7): 1073-1081.
- Comito G, Calvani M, Giannoni E, Bianchini F, Calorini L, Torre E, Mgliore C, Giordano S, Chiarugi P. 2011. HIF-1 α stabilization by mitochondrial ROS promotes met-dependent invasive growth and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *Free Rad. Biol. Med.* 51 (4): 893-904.
- Condeelis J. & Pollard J.W. 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124: 263-266.
- Coqueret O. 2003. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *TRENDS in Cell Biol.* 13 (2): 65-70.
- Cordero J.B, Macagno J.P, Stefanatos R.K, Strathdee K.E, Cagan R.L, Vidal M. 2010. Oncogenic Ras diverts a host TNF tumor suppressor activity into tumor promoter. *Developmental Cell* 18: 999-1011.
- Cornett W.R, McCall L.M, Petersen R.P, Ross M.I, Briele H.A, Noyes R.D, Sussman J.J, Kraybill W.G, Kane J.M, 3rd, Alexander H.R, Lee J.E, Mansfield P.F, Pingpank J.F, Winchester D.J, White R.L. Jr, Charadam V, Herndon J.E. 2nd, Fraker D.L, Tyler D.S. 2006. Randomized multicenter trial of hyperthermic isolated limb perfusion with melphalan alone compared with melphalan plus tumor necrosis factor: American college of surgeons oncology group trial Z0020. *J. Clin. Oncol.* 24 (25): 4196-4201.
- Corrigall V.M, Arastu M, Khan S, Shah C, Fife M, Smeets T, Tak P-P, Panayi G.S. 2001. Functional IL-2 receptor β (CD122) and γ (CD132) chains are expressed by fibroblast-like synoviocytes: activation by IL-2 stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production. *J. Immunol.* 166: 4141-4147.
- Corti A. 2004. Strategies for improving the anti-neoplastic activity of TNF by tumor targeting. *Methods Mol. Med.* 98: 247-264.
- Cossins D. 2013. Non-coding mutations may drive cancer. *The Scientist* (January 24).
- Coussens L.M. & Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-867.
- Coventry B.J. & Ashdown M.L. 2012. The 20th anniversary of interleukin-2 therapy: bimodal role explaining longstanding random induction of complete clinical responses. *Cancer Management Res.* 4: 215-221.
- Croft D.R. & Olson M.F. 2008. Regulating the conversion between rounded and elongated modes of cancer cell movement. *Cancer Cell* 14: 349-351.
- Cubillos S, Scallon B, Feldmann M, Taylor P. 1997. Effect of blocking TNF on IL-6 levels and metastasis in B16-BL6 melanoma/mouse model. *Anticancer Res.* 17 (3): 2207-2211.
- Culig Z. & Puhr M. 2012. Interleukin-6: a multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 360: 52-58.

- Danen E.H.J, Marcinkiewicz C, Cornelissen I.M.H.A, van Kraats A.A, Pachter J.A, Ruiter D.J, Niewiarowski S, van Muijen G.N.P. 1998. The disintegrin eristostatin interferes with integrin $\alpha 4\beta 1$ function and with experimental metastasis of human melanoma cells. *Exp. Cell Res.* 238: 188-196.
- Dang D, Bambang J.R, Ramos D.M. 2006. $\alpha V\beta 3$ integrin and cofilin modulate K1735 melanoma cell invasion. *Exp. Cell. Res.* 312 (4): 468-477.
- Daniel D. & Wilson N.S. 2008. Tumor necrosis factor: renaissance as a cancer therapeutic? *Curr. Cancer Drug Targets* 8 (2): 124-131.
- Dankort D, Curley D.P, Carlidge R.A, Nelson B, Karnezis A.N, Damsky W.E, You M.J, DePinho R.A, McMahon M & Bosenberg M. 2009. $Braf^{600E}$ cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nature Genetics* 41 (5): 544-552.
- Darzynkiewicz Z, Williamson B, Carswell E.A, Old L.J. 1984. Cell cycle-specific effects of tumor necrosis factor. *Cancer Res.* 44 (1): 83-90.
- Dash B.C. & El-Deiry W.S. 2005. Phosphorylation of p21 in G_2/M promotes cyclin B-Cdc2 kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* 25 (8): 3364-3387.
- Davies H, Bignell G.R, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett M.J, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gunters B.A, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones C, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins G.J, Bigner D.D, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho J.W.C, Leung S.Y, Yuen S.T, Weber B.L, Seigler H.F, Darrow T.L, Paterson H, Marais R, Marshall C, Wooster R, Stratton M.R, Futreal P.A. 2002. Mutations of BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949-954.
- Davis M.A, Flaws J.A, Young M, Collins K, Colburn N.H. 2000. Effect of ceramide on intracellular glutathione determines apoptotic or necrotic cell death of JB6 tumor cells. *Toxicological Sciences* 53: 48-55.
- Dbaibo G.S, Obeid L.M, Hannun Y.A. 1993. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) signal transduction through ceramide. *J. Biol. Chem.* 268 (24): 17762-17766.
- De Cesaris P, Starace D, Riccioli A, Padula F, Filippini A, Ziparo E. 1998. Tumor necrosis factor- α induces interleukin-6 production and integrin ligand expression by distinct transduction pathways. *J. Biol. Chem.* 273 (13): 7566-7571.
- De Vos K, Goossens V, Boone E, Vercammen D, Vancompernelle K, Vandenaabeele P, Haegeman G, Fiers W and Grooten J. 1988. The 55-KDa tumor necrosis factor receptor induces clustering of mitochondria through its membrane-proximal region. *J. Biol. Chem.* 273 (16): 9673-9680.
- Deberardinis R.J, Lum J.J, Hatzivassiliou G, Thompson C.B. 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Press*. DOI: 10.1016/j.cmet.2007.10002 pages 11-22.
- Dejana E, Bertocchi F, Bortolami M.C, Regonesi A, Tonta A, Breviario F, Giavazzi R. 1988. Interleukin 1 promotes tumor cell adhesion to cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 82: 1466-1470.
- Dekker S.K, Vink J, Vermeer B.J, Bruijn J.A, Byers H.R. 1994. Role of beta 1 integrins in cell spreading and migration of human nevomelanocytes and dysplastic nevi cells on collagen type IV and laminin. *Pigment Cell Res.* 7 (5): 339-347.
- Delcommenne M, Kannagi R, Johnson P. 2002. TNF- α increases the carbohydrate sulfation of CD44: induction of 6-sulfo N-acetyl lactoamine on N- and O-linked glycans. *Glycobiology* 12 (10): 613-622.

- Deng J, Zhang H, Kloosterboer F, Liao Y, Klostergaard J, Levitt M.L, Hung M-C. 2002. Ceramide does not act as a general second messenger for ultraviolet-induced apoptosis. *Oncogene* 21: 44-52.
- Denninghoff V, Falco J, Curutchet H.P, Elsner B. 2006. Estudio del ganglio centinela, diagnóstico y tratamiento del melanoma maligno cutáneo, estadíos I y II. *Medicina (Buenos Aires)* 66: 144-146.
- Denoyelle C, Vasse M, Korner M, Zohair M, Ganne F, Vannier J-P, Soria J, Soria C. 2001. Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study. *Am. J. Ther-Carcinogenesis* 22 (8): 1139-1148.
- Depper J.M, Leonard W.J, Drogula C, Krönke M, Waldman T.A, Greene W.C. 1985. Interleukin2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4230-4234.
- Desgrosellier J.S. & Cheresch D.A. 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 10 (1): 9-22.
- Deshpande S.S, Angkeow P, Huang J, Ozaki M, Irani K. 2000. Rac1 inhibits TNF- α -induced endothelial cell apoptosis: dual regulation by reactive oxygen species. *FASEB J.* 14: 1705-1714.
- Deveraux Q.L. & Reed J.C. 1999. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes & Development* 13: 239-252.
- Dhomen N, Reis-Filho J.S, da Rocha Dias S, Hayward R, Cavage K, Delmas V, Larve L, Pritchard C, Marais R. 2009. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* 15 (4): 294-303.
- Di Cristofano C, Leopizzi M, Miraglia A, Sardella B, Moretti V, Ferrara A, Petrozza V, Della Rocca C. 2010. Phosphorylated ezrin is located in the nucleus of the osteosarcoma cell. *Mod. Pathol.* 23 (7): 1012-1020.
- Dietrich A, Tanczos E, Vanscheidt W, Schöpf E, Simon J.C. 1997. High CD44 surface expression on primary tumours of malignant melanoma correlates with increased metastatic risk and reduced survival. *Eur. J. Cancer* 33 (6): 926-930.
- Dimanche-Boitrel M.T, Rebillard A, Gulbins E. 2011. Ceramide in chemotherapy of tumors. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 6 (3): 284-293.
- Dinareello C.A. & Cannon J.G. 1993. Cytokine measurements in septic shock. *Ann. Inter. Med.* 119 (8): 853-854.
- Divoldi A, Mendonca E.A, Evans J.A, Rzhetsky A. 2011. Conflicting biomedical assumptions for mathematical modeling: the case of cancer metastasis. *PLoS Computational Biology* 7 (10): 31002132.
- Djavaheri-Mergny M, Javelaud D, Wietzerbin J, Besancon F. 2004. NF-kB activation prevents apoptotic oxidative stress via an increase of both thioredoxin and MnSOD levels in TNF α -treated Ewing sarcoma cells. *FEBS Letters* 578: 111-115.
- Dolga A.M, Njholt I.M, Ostroveanu A, Luiten P.G, Ten Bosch Q, Luiten P.G, Eisel U.L. 2008. Lovastatin induces neuroprotection through tumor necrosis factor receptor 2 signaling pathways. *J. Alzheimers Dis.* 13 (2): 111-122.
- Donato N.J. & Perez M. 1998. Tumor necrosis factor-induced apoptosis stimulates p53 accumulation and p21^{WAF1} proteolysis in ME-180 cells. *J. Biol. Chem.* 273 (9): 5067-5072.
- Dorff T.B, Goldman B, Pinski J.K, Mack P.C, Lara P.N, Van Veldhuizen P.J, Quinn D.I, Vogelzang W.J, Thompson I.M, Hussain M.H. 2010. Clinical and correlative results of SWOG SO354: a phase II

- trial of CNTO328 (siltuximab) a monoclonal antibody against interleukin 6, in chemotherapy-pretreated patients with castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 16 (11): 3028-3034.
- Dormond O, Lejeune F.J, Ruegg C. 2002. Modulation of cdk2, cyclin D1, p16^{INK4a}, p21^{WAF} and p27^{Kip1} expression in endothelial cells by TNF/IFN γ . *Anticancer Res.* 22: 3159-3164.
- Dosquet C, Schaetz A, Faucher C, Lepage E, Wautier J-L, Richard F, Cabane J. 1994. Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and interleukin-6 in patients with renal cell carcinoma. *Eur. J. Cancer* 30A (2): 162-167.
- Dotto G.P. 2000. p21^{WAF1/Cip1}: more than a break to the cell cycle? *Biochimica et Biophysica Acta* 1471: M43-M56.
- Doucet C, Meazza R, Pottin-Clemenceau C, Scudetti M, Brouty-Boye D, Ferrini S, Alileche A, Taoufik Y, Jasmin C, Azzarone B, Indiveri F. 1997. Role of interleukin (IL)-2 and IL-15 in the tumour progression of a melanoma cell line MELP, derived from an IL-2 progressor patient. *Melanoma Res.* 7 Suppl 2: S7-S17.
- Drost J. & Agami R. 2009. Transformation locked in a loop. *Cell* 139: 654-656.
- Duffy S.A, Taylor J.M.G, Terrell J.E, Islam M, Li Y, Fowler K.E, Wolf G.T, Teknos T.N. 2008. Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. *Cancer* 113: 750-757.
- Duke R.C. & Cohen J.J. 1986. IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Res.* 5 (4): 289-299.
- Dulic V, Kaufmann W.K, Wilson S.J, Tlsty T.D, Lees E, Harper J.W, Elledge S.J, Reed S.I. 1994. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblast during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76 (6): 1013-1023.
- Edsparr K, Speetjens F.M, Mulder-Stapel A, Goldfarb R.H, Basse P.H, Lennernäs B, Kuppen P.J.K, Albertsson P. 2010. Effects of IL-2 on MMP expression in freshly isolated human NK cells and the IL-2-independent NK cell line YT. *J. Immunother.* 33 (5): 475-481.
- Edward M, Gillan C, Micha D, Tammi R.H. 2005. Tumour regulation of fibroblast hyaluronan expression: a mechanism to facilitate tumour growth and invasion. *Carcinogenesis* 26 (7): 1215-1223.
- Egberts J-H, Cloosters V, Noack A, Schniewind B, Thon L, Klose S, Kettler B, von Forster C, Kneitz C, Tepel J, Adam D, Wajant H, Kalthoff H, Trauzold A. 2008. Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 68 (5): 1443-1450.
- Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S. 1997. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Inmunol. Today* 18 (10): 487-492.
- Eitaki M, Yamamori T, Meike S, Yasui H, Inanami O. 2012. Vincristine enhances amoeboid-like motility via GEF-H1/RhoA/ROCK/Myosin light chain signaling in MKN45 cells. *BMC Cancer* 12: 469. doi: 10.1186/1471-2407-12-469.
- El-Deiry W.S, Tokino T, Waldman T, Oliner J.D, Velculescu V.E, Burrell M, Hill D.E, Healy E, Rees J.L, Hamilton S.R, Kinzler K.W, Vogelstein B. 1995. Topological control of p21^{WAF1/CIP1} expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 55: 2910-2919.
- Elias E.G, Hasskamp J.H, Sharma B.K. 2010. Cytokines and growth factors expressed by human cutaneous melanoma. *Cancers* 2: 794-808. doi: 10.3390/cancers2020794.

- Emenaker N.J, Calaf G.M, Cox D, Basson M.D, Quneshi N. 2001. Short-chain fatty acids inhibit invasive human colon cancer by modulating uPA, TIMP-1, TIMP-2, mutant p53, Bcl-2, Bax, p21 and PCNA protein expression in an in vitro cell culture model. *J. Nutric.* 131: 3041S-3046S.
- Engelhardt B. 2007. α 4-integrins: structure, function and secrets. *Adhesion molecules: function and inhibition*, edited Klaus Ley 117-147.
- Estecha A, Sánchez-Martín L, Puig-Krönger A, Bartolomé R.A, Teixidó J, Samaniego R, Sánchez-Mateos P. 2009. Moesin orchestrated cortical polarity of melanoma tumour cells to initiate 3D invasion. *J.Cell Sci.* 122 (Pt 19): 3492-3501.
- Eves P, Katerinaki E, Simpson C, Layton C, Dawson R, Evans G & MacNeil S. 2003. Melanoma invasion in reconstructed human skin is influenced by skin cells-investigation of the role of proteolytic enzymes. *Clin. Exp. Metastasis* 20: 685-700.
- Faassen A.E, Schrager J.A, Klein D.J, Oegema T.R, Couchman J.R, McCarthy J.B. 1992. A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. *J.Cell Biol.* 116 (2): 521-531.
- Federici C, Brambilla D, Lozupone F, Materrese P, de Milito A, Lugini L, Lessi E, Cecchetti S, Marino M, Perdicchio M, Logozzi M, Spada M, Malorni W, Fais S. 2009. Pleiotropic function of ezrin in human metastatic melanomas. *Int. J. Cancer* 124 (12): 2804-2812.
- Fehérvári Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. 2006. The dichotomous role of IL-2: tolerance versus immunity. *TRENDS Immunol.* 27 (3): 109-111.
- Feinerman O, Jentsch G, Tkach K.E, Coward J.W, Hathorn M.M, Sneddon M.W, Emonet T, Smith K.A, Altan-Bonnet G. 2010. Single-cell quantification of IL-2 response by effector and regulatory T cells reveals critical plasticity in immune response. *EMBO Mol. Systems Biol.* 6: 437; doi: 10.1038/msb.2010.90.
- Feldman M. & Eisenbach L. 1989. ¿Por qué es metastásica la célula tumoral? *Investigación y Ciencia* 148: 24-32.
- Fenouille N, Robert G, Tichet M, Puissant A, Dufies M, Rocchi S, Ortonne J.P, Deckert M, Ballotti R, Tantare-Deckert S. 2011. The p53/p21Cip1/Waf1 pathway mediates the effects of SPARC on melanoma cell cycle progression. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24 (1): 219-232.
- Fernandez L.P, Milne R.L, Pita G, Floristan U, Sendagorta E, Feito M, Avilés J.A, Martín-Gonzalez M, Lázaro P, Benites J, Ribas G. 2009. Pigmentation-related genes and their implication in malignant melanoma susceptibility. *Exp. Dermatol.* 18 (7): 634-642.
- Ferro E, Goitre L, Retta S.F, Trabalzini L. 2012. The interplay between ROS and Ras GTPases: physiological and pathological implications. *J. Signal Transduction.* Article ID: 365769, 9 pages.
- Fiaschi T. & Chiarugi P. 2012. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *Int. J. Cell Biol.* Article ID 762825, 8 pages.
- Fidler I.J. & Balch C.M. 1987. The biology of cancer metastasis and implications for therapy. *Curr. Probl. Surg.* 24: 130-209.
- Fidler I.J. & Hart R.I. 1982. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* 217: 998-1003.
- Fidler I.J. 1973. Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nature New Biol.* 242: 148-149.
- Fidler I.J. 1991. Cancer metastasis. *Br. Med. Bull.* 47: 157-177.

- Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. 1999. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18: 7719-7730.
- Fiers W. 1991. Tumor necrosis factor: Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Letters* 285 (2): 199-212.
- Figiel I. 2008. Pro-inflammatory cytokine TNF- α as a neuroprotective agent in the brain. *Acta Neurobiol. Exp.* 68: 526-534.
- Finn L, Markovic S.N, Joseph R.W. 2012. Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. *BMC Medicine* 10: 23. page 1-10.
- Fleischmann C.M, Stanton G.J, Fleischmann W.R. 1996. Enhanced in vivo sensitivity of in vitro interferon-treated B16 melanoma cells to CD8 cells and activated macrophages. *J. Interferon Cytokine Res.* 16: 805-812.
- Florenes V.A, Faye R.S, Maelandsmo G.M, Nesland J.M, Holm R. 2000. Level of cyclin D3 is associated with poor clinical outcome in superficial melanoma. *Clin. Cancer Res.* 6: 3614-3620.
- Francis G.M, Krohn E.G, Woods K.V, Buzaid A.C, Grimm E.A. 1996. Interleukin-6 production and secretion in human melanoma cell lines: regulation by interleukin-1. *Melanoma Res.* 6: 191-201.
- Franitza S, Hershkovich R, Kam N, Lichtenstein N, Vaday G.G, Alon R, Lider O. 2000. TNF- α associated with extracellular matrix fibronectin provides a stop signal for chemotactically migrating T cells. *J. Immunol.* 165: 2738-2747.
- Fredersdorf S, Milne A.W, Hall P.A, Lu X. 1996. Characterization of a panel of novel anti-p21^{Waf1/Cip1} monoclonal antibodies and immunochemical analysis of p21^{Waf1/Cip1} expression in normal human tissues. *Am. J. Pathol.* 148 (3): 825-835.
- French J.D, Tschumper R.C, Jelinek D.F. 2002. Analysis of IL-6-mediated growth control of myeloma cells using a gp130 chimeric receptor approach. *Leukemia* 16 (6): 1189-1196.
- Friedl P. & Wolf K. 2009. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* 188 (1): 11-19.
- Fritzsche J, Simonis D, Bendas G. 2008. Melanoma cell adhesion can be blocked by heparin in vitro: suggestion of VLA-4 as a novel target for antimetastatic approaches. *Thromb Haemost.* 100 (6): 1166-1175.
- Fujita H, Okada F, Hamada J-i, Hosokawa M, Moriuchi T, Chikara Koya R, Kuzumaki N. 2001. Gelsolin functions as a metastasis suppressor in B16-BL6 mouse melanoma cells and requirement of the carboxyl-terminus for its effect. *Int. J. Cancer* 93: 773-780.
- Fujita Y, Kitagawa M, Nakamura S, Azuma K, Ishii G, Higashi M, Kishi H, Hiwasa T, Koda K, Nakajima N, Harigaya K. 2002. CD44 signaling through focal adhesion kinase and its anti-apoptotic effect. *FEBS Lett.* 528 (1-3): 101-108.
- Gadea G, Roger L, Anguille C, de Toledo M, Gire V, Roux P. 2004. TNF α induces sequential activation of Cdc42- and p38/p53-dependent pathways that antagonistically regulate filopodia formation. *J. Cell Sci.* 117: 6355-6364.
- Gadea G, Sanz-Moreno V, Self A, Godi A, Marshall C.J. 2008. DOCK10-mediated Cdc42 activation is necessary for amoeboid invasion of melanoma cells. *Curr. Biol.* 18 (19): 1456-1465.
- Gaffen S.L. 2001. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine* 14 (2): 63-77.

- Gaggioli C. & Sahai E. 2007. Melanoma invasion-current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res.* 20: 161-172.
- Gaillard J.P, Liautard J, Klein B, Brochier J. 1997. Major role of the soluble interleukin-6/interleukin-6 receptor complex for the proliferation of interleukin-6-dependent human myeloma cell lines. *Eur. J. Immunol.* 27: 3332-3340.
- Gaiotti D, Chung J, Iglesias M, Nees M, Baker P.D, Evans C.H, Woodworth C.D. 2000. Tumor necrosis factor-alpha promotes human papillomavirus (HPV) E6/E7 RNA expression and cyclin-dependent kinase activity in HPV-immortalized keratinocytes by a ras-dependent pathway. *Mol. Carcinog.* 27 (2): 97-109.
- Ganguly K.K, Pal S, Moulik S, Chatterjee A. 2013. Integrins and metastasis. *Cell Adh. Migr.* 7 (3): 251-261.
- García de Galdeano A, Boyano M.D, Smith-Zubiaga I, Alvarez A, Cantón I, Cañavate M.L. 1998. Involvement of interleukin-6 in the biology and metastatic activity of B16F10 melanoma cells. *Eur. Cytokine Netw.* 9 (2): 187-192.
- García de Galdeano A, Boyano M.D, Smith-Zubiaga I, Cañavate M.L. 1996. B16F10 murine melanoma cells express interleukin-2 and a functional interleukin-2 receptor. *Tumor Biol.* 17: 155-167.
- García de Galdeano A, Cruz-Conde J.C, Boyano M.D, García-Vázquez M.D, Cañavate M.L. 2001. Effect of IL-2 and IL-6 on parameters related to metastatic activity in a murine melanoma. *Pathobiology* 69 (4): 230-236.
- García de Galdeano A. 1993. Efecto de las interleucinas (IL-2, IL-1B, IL-6) sobre la capacidad metastática de las células del melanoma B16F10. Tesis Doctoral.
- García-Ruiz C, Colell A, Marí M, Morales A, Calvo M, Enrich C, Fernández-Checa J.C. 2003. Defective TNF- α -mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J. Clin. Invest.* 111 (2): 197-208.
- García-Ruiz C, Colell A, Marí M, Morales A, Fernández-Checa J.C. 1997. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 272 (17): 11369-11377.
- García-Vázquez M.D, Boyano M.D, Cañavate M.L, Gardeazabal J, García de Galdeano A, López-Michelena T, Ratón J.A, Izu R, Díaz-Ramón J.L, Díaz-Pérez J.L. 2000. Interleukin-2 enhances the growth of human melanoma cells derived from primary but not from metastatic tumours. *Eur. Cytokine Netw.* 11 (4): 654-661.
- Garofalo A, Chirivi R.G.S, Foglieni C, Pigott R, Mortarini R, Martin-Padura I, Anichini A, Gearing A.J, Sanchez-Madrid F, Dejana E, Giavazzi R. 1995. Involvement of the very late antigen 4 integrin on melanoma in interleukin 1-augmented experimental metastases. *Cancer Res.* 55: 414-419.
- Gartel A.L, Serfas M.S, Gartel M, Goufman E, Wu G.S, El-Deiry W.S, Tyner A.L. 1996. p21 (WAF1/CIP1) expression is induced in newly nondividing cells in diverse epithelia and during differentiation of the Caco-2 intestinal cell line. *Exp. Cell Res.* 227 (2): 171-181.
- Gartel A.L. & Tyner A.L. 1999. Transcriptional regulation of the p21^(WAF1/CIP1) gene. *Exp. Cell Res.* 246: 280-289.
- Gartel A.L. & Tyner A.L. 2002. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* 8: 639-649.
- Gautreau A, Pouillet P, Louvard D, Arpin M. 1999. Ezrin, a plasm membrane-microfilament linker, signals cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 (13): 7300-7305.

- Gava B, Zorzet S, Spessotto P, Cocchietto M, Sava G. 2006. Inhibition of B16 melanoma metastases with the ruthenium complex imidazolium trans-imidazoledimethylsulfoxide-tetrachlororuthenate and down-regulation of tumor cell invasion. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 317 (1): 284-291.
- Gearing A.J.H, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson A.H, Drummond A.H, Galloway W.A, Gilbert R, Gordon J.L, Leber T.M, Mangan M, Miller K, Nayee P, Owen K, Patel S, Thomas W, Wells G, Wood L.M, Woolley K. 1994. Processing of tumour necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature* 370: 555-557.
- Gee K, Lim W, Ma W, Nandan D, Diaz-Mitoma F, Kozlowski M, Kumar A. 2002. Differential regulation of CD44 expression by lipopolysaccharide (LPS) and TNF- α in human monocytic cells: distinct involvement of c-Jun N-terminal kinase in PLS-induced CD44 expression. *J. Immunol.* 169: 5660-5672.
- Gelin J, Molladawer L.L., Lönnroth C, Sherry B, Chizzonite R, Lundholm K. 1991. Role of endogenous tumor necrosis factor α and interleukin 1 for experimental tumor growth and the development of cancer cachexia. *Cancer Res.* 51: 415-421.
- Gentle I.E. & Silke J. 2011. New perspective in TNF-R1-induced NF- κ B signaling. *Advances in TNF family research, Advances in experimental medicine and biology* 691, chapter 8, page 79-88. doi: 10.1007/978-1-4419-6612-4-8.
- Gerber S.A, Sorensen E.W, Sedlacek A.L, Lim J.Y.H, Skrombolas D, Frelinger J.G, Lord E.M. 2012. Local expression of interleukin-2 by B16 melanoma cells results in decreased tumour growth and long-term tumour dormancy. *Immunology* 138 (3): 280-292.
- Gerez L, Arad G, Efrat S, Ketzinel M, Kaempfer R. 1995. Post-transcriptional regulation of human interleukin-2 gene expression at processing of precursor transcripts. *J. Biol. Chem.* 270 (33): 19569-19575.
- Gerspach J, Pfizenmaier K, Wajant H. 2009. Improving TNF as a cancer therapeutic: tailor-made TNF fusion proteins with conserved antitumor activity and reduced systemic side effects. *Biofactors* 35 (4): 364-372.
- Gillbro J.M. & Olsson M.J. 2011. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents-existing and new approaches. *Int. J. Cosmet. Sci.* 33 (3): 210-221.
- Gillis S. & Smith K.A. 1977. Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature* 268: 154-156.
- Godar S, Ince T.A, Bell G.W, Feldser D, Donaher J.L, Bergh J, Liu A, Miu K, Watnick R.S, Reinhardt F, McAllister S.S, Jacks T, Weinberg R.A. 2008. Growth-inhibitory and tumor-suppressive functions of p53 depend on its repression of CD44 expression. *Cell* 134: 62-73.
- Goebel J, Forrest K, Wills-Karp M, Roszman T.L. 2006. Tubulin polymerization modulates interleukin-2 receptor signal transduction in human T cells. *J. Recept Signal Transduct Res.* 26 (1-2): 87-106.
- Goodfison S, Urquidi V, Tarin D. 1999. CD44 cell adhesion molecules. *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.* 52: 189-196.
- Goossens V, Grooten J, De Vos K, Fiers W. 1995. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 (18): 8115-8119.
- Gore Y, Starlets D, Maharshak N, Becker-Herman S, Kaneyuki U, Leng L, Bucala R, Shachar I. 2008. Macrophage migration inhibitory factor induces B cell survival by activation of a CD74-CD44 receptor complex. *J. Biol. Chem.* 283 (5): 2784-2791.
- Gough D.R. & Cotter T.G. 2011. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signaling molecule. *Cell Death Dis.* Oct 6; 2: e213.

- Grahovac J, Becker D, Wells A. 2013. Melanoma cell invasiveness is promoted at least in part by the epidermal growth factor-like repeats of tenascin-C. *J. Invest. Dermatol.* 133 (1): 210-220.
- Gray-Schopfer V.C, Cheong S.C, Chong H, Chow J, Moss T, Abdel-Malek Z.A, Marais R. 2006. Cellular senescence in naevi and immortalization in melanoma: a role for p16? *Br. J. Cancer* 95 (4): 496-505.
- Gray-Schopfer V.C, Karasarides M, Hayward R, Marais R. 2007. Tumor Necrosis Factor- α blocks apoptosis in melanoma cells when BRAF signaling is inhibited. *Cancer Res.* 67 (1): 122-129.
- Gray-Schopfer V.C, Wellbrock C, Marais R. 2007(a). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445 (7130): 851-857.
- Green D.M, Trial J, Birdsall H.H. 1998. TNF- α released by comigrating monocytes promotes transendothelial migration of activated lymphocytes. *J. Immunol.* 161: 2481-2489.
- Grell M, Zimmermann G, Gottfried E, Chen C.M, Grünwald U, Huang D.C.S, Wu Lee Y.H, Dürkop H, Engelmann H, Scheurich P, Wajant H, Strasser A. 1999. Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J.* 18 (11): 3034-3043.
- Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu G-Y, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. 2009. IL-6 and STAT3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 15: 103-113.
- Gross J.W, Brant C.S, Jaspers S.R. 2000. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* 404: 995-999.
- Grünhagen D.J, van Etten B, Brunstein F, Graveland W.J, van Geel A.N, de Wilt J.H.W, Eggermont A.M.M. 2005. Efficacy of repeat isolated limb perfusions with tumor necrosis factor α and melphalan for multiple in-transit metastases in patients with prior isolated limb perfusion failure. *Ann. Surg. Oncol.* 12 (8): 609-615.
- Gruss H.J, Scott C, Rollins B.J, Brach M.A, Herrmann F. 1996. Human fibroblasts express functional IL-2 receptors formed by the IL-2R α - and β -chain subunits. *J. Immunol.* 157: 851-857.
- Gu Y, Turck C.W, Morgan D.O. 1993. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 366 (6456): 707-710.
- Guarino M, Rubino B, Ballabio G. 2007. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 39 (3): 305-318.
- Gulbins E. 2003. Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. *Pharmacol. Res.* 47: 393-399.
- Guo Y, Ma J, Wang J, Che X, Narula J, Bigby M, Wu M, Sy M-S. 1994. Inhibition of human melanoma growth and metastasis in vivo by anti-CD44 monoclonal antibody. *Cancer Res.* 54: 1561-1565.
- Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. 2012. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treatment Rev.* 38: 904-910.
- Haapajarvi T, Kivinen L, Heiskanen A, des Bordes C, Datto M.B, Wang X.F, Laiho M. 1999. UV radiation is a transcriptional inducer of p21^{Cip1/WAF1} cyclin-kinase inhibitor in a p53-independent manner. *Exp. Cell Res.* 248: 272-279.
- Hagemann T, Robinson S.C, Schulz M, Trümper L, Balkwill F.R, Binder C. 2004. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF- α dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* 25 (8): 1543-1549.

- Halaban R, Cheng E, Zhang Y, Mandigo C.E, Miglarese M.R. 1998. Release of cell cycle constraints in mouse melanocytes by overexpressed mutant E2F1_{E132}, but not by depletion of p16^{INK4A} or p21^{WAF1/CIP1}. *Oncogene*. 16: 2489-2501.
- Halaban R, Miglarese M.R, Smicum Y, Puig S. 1998(a). Melanomas, from the cell cycle point of view (Review). *Int. J. Mol. Med*. 1 (2): 419-444.
- Halfter H, Friedrich M, Resch A, Kullmann M, Stögbauer F, Ringelstein E.B, Hengst L. 2006. Oncostatin M induces growth arrest by inhibition of Skp2, Cks1, and Cyclin A expression and induced p21 expression. *Cancer Res*. 66: 6530-6539.
- Hallek M, Bergsagel P.L, Anderson K.C. 1998. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 91 (1): 3-21.
- Hamai A, Meslin F, Benlalam H, Jalil A, Mehrpour M, Faure F, Lecluse Y, Vielh P, Avril M-F, Robert C, Chouaib S. 2008. ICAM-1 has a critical role in the regulation of metastatic melanoma tumor susceptibility to CTL lysis by interfering with PI3K/AKT pathway. *Cancer Res*. 68 (23): 9854-9864.
- Han D, Pottin-Clemenceau C, Imro M.A, Scudeletti M, Doucet C, Puppo F, Brouty-Boye D, Vendrenne J, Sahraoui Y, Brailly H, Poggi A, Jasmin C, Azzarone B, Indiveri F. 1996. IL2 triggers a tumor progression process in a melanoma cell line MELP, derived from a patient whose metastasis increased in size during IL2/INF α biotherapy. *Oncogene* 12: 1015-1023.
- Han W.S, Yoo J.Y, Youn S.W, Kim D.S, Park K.C, Kim S.Y, Kim K.H. 2002. Effects of C₂-ceramide on the Malme-3M melanoma cell line. *J. Dermatol. Sci*. 30 (1): 10-19.
- Hanahan D. & Coussens L.M. 2012. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21: 309-322.
- Hanahan D. & Weinberg R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1): 57-70.
- Hanahan D. & Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (5): 646-674.
- Hanna A.N, Berthiaume L.G, Kikuchi Y, Begg D, Bourgoin S, Brindley D.N. 2001. Tumor necrosis factor- α induces stress fiber formation through ceramide production: role of sphingosine kinase. *Mol. Biol. Cell* 12 (11): 3618-3630.
- Hannun Y.A. & Luberto C. 2000. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol*. 10 (2): 73-80.
- Hannun Y.A. & Obeid L.M. 2008. Principles of bioactive lipid signaling: lessons from sphingolipids. *Nature Rev*. 9: 139-150.
- Hannun Y.A. 1996. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274 (5294): 1855-1859.
- Hao J, Chen H, Madigan M.C, Cozzi P.J, Beretov J, Xiao W, Delprado W.J, Russell P.J, Li Y. 2010. Co-expression of CD147 (EMMPRIN), CD44v3-10, MDRI and monocarboxylate transporters is associated with prostate cancer drug resistance and progression. *Br. J. Cancer*. 103: 1008-1018.
- Harper J.W, Adami G.R, Wei N, Keyomarsi K, Eledge S.J. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75 (4): 805-816.
- Hattori T, Hayashi H, Chiba T, Onozaki K. 2001. Activation of two distinct anti-proliferative pathways, apoptosis and p38 MAP kinase-dependent cell cycle arrest, by tumor necrosis factor in human melanoma cell line A375. *Eur. Cytokine Netw*. 12 (2): 244-252.

- Hauzenberger D, Klominek J, Holgersson J, Bergström S.E, Sundqvist K.G. 1997. Triggering of motile behavior in T lymphocytes via cross-linking of alpha 4 beta 1 and alpha L beta 2. *J. Immunol.* 158 (1): 76-84.
- Hegerfeldt Y, Tusch M, Bröcker E-B, Friedl P. 2002. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, β 1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res.* 62: 2125-2130.
- Heikkilä K, Ebrahim S, Lawlor D.A. 2008. Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. *Eu. J. Cancer* 44: 937-945.
- Heinrich M, Neumeyer J, Jakob M, Hallas C, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Wickel M, Schneider-Brachert W, Trauzold A, Hethke A, Schütze S. 2004. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death and Differentiation* 11: 550-563.
- Heinrich M, Wickel M, Schneider-Brachert W, Sandberg C, Gahr J, Schwandner R, Weber T, Brunner J, Krönke M, Schütze S. 1999. Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *EMBO J.* 18 (19): 5252-5263.
- Helige C, Zellnig G, Hofmann-Wellenhof R, Filk-Puches R, Smolle J, Tritthart H.A. 1997. Interrelation of motility, cytoskeletal organization and Gap junctional communication with invasiveness of melanocytic cells in vitro. *Invasion & Metastasis* 17: 26-41.
- Heller R.A. & Krönke M. 1994. Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J. Cell Biol.* 126 (1): 5-9.
- Hennet T, Richter C, Peterhans E. 1993. Tumor necrosis factor- α induces anion generation in mitochondria of L929 cells. *Biochem. J.* 289: 587-592.
- Herblot S, Chastagner P, Samady L, Moreau J-L, Demaison C, Froussard P, Liu X, Bonnet J, Thèze J. 1999. IL-2-Dependent expression of genes involved in cytoskeleton organization, oncogene regulation, and transcriptional control. *J. Immunol.* 162: 3280-3288.
- Hernández D, Miquel-Serra L, Docampo M-J, Marco-Ramell A, Cabrera J, Fabra A, Bassols A. 2011. V3 versican isoform alters the behavior of human melanoma cells by interfering with CD44/ErbB-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* 286 (2): 1475-1485.
- Hia T. & Dannenberg A.J. 2012. Sphingolipid signaling in metabolic disorders. *Cell Metabolism* 16: 420-434.
- Hibino S, Shibuya M, Engbring J.A, Mochizuki M, Nomizu M, Kleinman H.K. 2004. Identification of an active site on the laminin α 5 chain globular domain that binds to CD44 and inhibits malignancy. *Cancer Res.* 64: 4810-4816.
- Higashiyama A, Watanabe H, Okumara K, Yagita H. 1996. Involvement of tumor necrosis factor α and very late activation antigen4/vascular cell adhesion molecule 1 interaction in surgical-stress-enhanced experimental metastasis. *Cancer Immunol. Immunother.* 42: 231-236.
- Hill H.Z. 1992. The function of melanin or six blind people examine an elephant. *BioEssays* 14: 49-56.
- Himeno T, Watanabe N, Yamauchi N, Maeda M, Tsuji Y, Okamoto T, Neda H, Niitsu Y. 1990. Expression of endogenous tumor necrosis factor as a protective protein against the cytotoxicity of exogenous tumor necrosis factor. *Cancer Res.* 50: 4941-4945.
- Hirano T. 1998. Interleukin 6 and its receptor: Ten years later. *Int. Rev. Immunol.* 16: 249-284.

- Hirose M, Yade H, Hakoi K, Takahashi S, Ito N. 1993. Modification of carcinogenesis by alpha-tocopherol, t-butylhydroquinone, propyl gallate and butylated hydroxytoluene in a rat multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis* 14 (11): 2359-2364.
- Ho H, Soto Hopkin A, Kapadia R, Vasudeva P, Schilling J, Ganesan A.K. 2012. RhoJ modulates melanoma invasion by altering actin cytoskeletal dynamics. *Pigment Cell Mel. Res.* 26: 218-225.
- Hobeika A.C, Subramaniam P.S, Johnson H.M. 1997. IFN α induces the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human prostate cancer cells. *Oncogene* 14: 1165-1170.
- Hodge D.R, Hurt E.M, Farrar W.L. 2005. The role of IL-6 and Stat3 in inflammation and cancer. *Eur. J. Cancer* 41: 2502-2512.
- Hodis E, Watson I.R, Kryukov G.V, Arold S.T, Imielinski M, Theurillat J.P, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, Dicara D, Ramos A.H, Lawrence M.S, Cibulskis K, Sivachenko A, Voet D, Saksena G, Stransky N, Onofrio R.C, Winckler W, Ardle K, Wagle N, Wargo J, Chong K, Morton D.L, Stenke-Hale K, Chen G, Noble M, Meyerson M, Ladbury J.E, Davies M.A, Gershenwald J.E, Wagner S.N, Hoon D.S, Schaderdorf D, Lander E.S, Gabriel S.B, Getz G, Garraway L.A, Chin L. 2012. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 150 (2): 251-263.
- Hoejberg L, Bastholt L, Johansen J.S, Christensen I.J, Gehl J, Schmidt H. 2012. Serum interleukin-6 as a prognostic biomarkers in patients with metastatic melanoma. *Melanoma Res.* 22 (4): 287-293.
- Hoejberg L, Bastholt L, Schmidt H. 2012(a). Interleukin-6 and melanoma. *Melanoma Res.* 22 (5): 327-333.
- Hofmann U.B, Westphal J.R, Van Muijen G.N.P, Ruiter D.J. 2000. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 115: 337-344.
- Holzmann B, Gossler U, Bittner M. 1998. α 4 integrins and tumor metastasis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 231: 125-141.
- Homsy J, Messina J, Cubitt C, Maunglay S, Scalf L, Komaria A, Yu H, Jove R, Daud A. 2006. Targeting Src/Stat3 pathway in malignant melanoma. *J. Clin. Oncology.* 24 (18S): 8025.
- Hood J.D. & Cheresch D.A. 2002. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer* 2 (2): 91-100.
- Hoon D.S.B, Wen D-R, Stene M, Gupta R.K, Cochran A.J. 1986. Inhibition of lymphocyte motility by interleukin 2. *Clin. Exp. Immunol.* 66: 566-573.
- Hordijk P.L. 2006. Regulation of NADPH oxidases. The role of Rac proteins. *Circ. Res.* 98: 453-462.
- Hou B, Eren M, Painter C.A, Covington J.W, Dixon J.D, Schoenhard J.A, Vaughan D.E. 2004. Tumor necrosis factor alpha activates the human plasminogen activator inhibitor-1 gene through a distal nuclear factor kappaB site. *J. Biol. Chem.* 279 (18): 18127-18136.
- Hsu C.P. & Chung Y.C. 2006. Influence of interleukin-6 on the invasiveness of human colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 26 (6B): 4607-4614.
- Hsu H, Shu H-B, Pan M-G, Goeddel D.V. 1996. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84: 299-308.
- Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, Le Sage C, Nagel R, Nair S, Egan D.A, Li A, Huang G, Klein-Szanto A.J, Gimolty P.A, Katsaros D, Couskos G, Zhang L, Puré E, Agami R. 2008. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nature Cell Biology* 10: 202-210.
- Huang S. 2007. Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications. *Clin. Cancer Res.* 13 (5): 1362-1366.

- Huber A.V, Saleh L, Bauer S, Husslein P, Knöfler M. 2006. TNF- α -mediated induction of PAI-1 restricts invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells. *Placenta* 27: 127-136.
- Huhtala P, Humphries M.J, McCarthy J.B, Tremble P.M, Werb Z, Damsky C.H. 1995. Cooperative signaling by $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblast adhering to fibronectin. *J. Cell Biol.* 129 (3): 867-879.
- Huijzer J.C, Uhlenkott C.E, Meadows G.G. 1995. Differences in expression of metalloproteinases and plasminogen activators in murine melanocytes and B16 melanoma variants: lack of association with in vitro invasion. *Int. J. Cancer.* 63 (1): 92-99.
- Hussain S.P. & Harris C.C. 2007. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int. J. Cancer* 121: 2373-2380.
- Idriss H.T. & Naismith J.H. 2000. TNF α and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc. Res. Tech.* 50: 184-195.
- Ihle J.N. 2001. The Stat family in cytokine signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (2): 211-217.
- Iliopoulos D, Hirsch H.A, Struhl K. 2009. An epigenetic switch involving NF- κ B, Lin28, Let-7 microRNA, and IL-6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 139 (4): 693-706.
- Inoue J, Ishida T, Tsukamoto N, Kobayashi N, Naito A, Azuma S, Yamamoto T. 2000. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp. Cell Res.* 254: 14-24.
- Isamat M, Rosell R, Ariza A. 1994. Regulación molecular de la invasión y las metástasis. *Sandorama* 2: 6-13.
- Itoh S, Hayashi H, Watanabe N, Kobayashi Y, Takii T, Onozaki K. 1996. Interleukin1 (IL-1) production is not essential for acquired resistance of human A375 melanoma cells to anti-proliferative effect of IL-1. *Int. J. Cancer* 65: 805-811.
- Itoh, Y, Masuyama N, Nakayama K, Nakayama K.I, Gotoh Y. 2006. The cyclin-dependent kinase inhibitors p57 and p27 regulate neuronal migration in the developing mouse neocortex. *J. Biol. Chem.* 282 (1): 390-396.
- Ivanov V.N, Kehrl J.H, Ronai Z. 2000. Role of TRAF2/GCK in melanoma sensitivity to UV-induced apoptosis. *Oncogene* 19 (7): 933-942.
- Jansen B, Schlagbauer-Wadl H, Brown B.D, Bryan R.N, Van Elsas A, Müller M, Wolff K, Eichler H-G, Pehamberger H. 1998. bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nature Medicine* 4 (2): 232-234.
- Jen E.Y, Poindexter N.J, Farnsworth E.S, Grimm E.A. 2012. Interleukin-2 regulates the expression of the tumor suppressor interleukin-24 in melanoma cells. *Melanoma Res.* 22 (1): 19-29.
- Jennings-Gee J.E, Tsuji Y, Pietsch E.C, Moran E, Mymryk J.S, Torti F.M. 2006. Coordinate inhibition of cytokine-mediated induction of ferritin H, manganese superoxide dismutase, and interleukin-6 by the adenovirus E1A oncogene. *J. Biol. Chem.* 281 (24): 16428-16435.
- Jiang Y, Woronicz J.D, Liu W, Goeddel D.V. 1999. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283: 543-546.
- Jiang Y. & Porter A.G. 1998. Prevention of Tumor Necrosis Factor (TNF)-Mediated Induction of p21^{WAF1/CIP1} Sensitizes MCF-7 Carcinoma Cells to TNF-Induced Apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245: 691-697.

- Jirik F.R, Podor T.J, Hirano T, Kishimoto T, Loskutoff D.J, Carson D.A, Lotz M. 1989. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J. Immunol.* 142 (1): 144-147.
- Jo S.H, Son M.K, Koh H.J, Lee S.M, Song I.H, Kim Y.O, Lee Y.S, Jeong K.S, Kim W.B, Park J.W, Song B.J, Huh T.L. 2001. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *J.Biol. Chem.* 276 (19): 16168-16176.
- Johnson J.P, Stade B.G, Holzmann B, Schwäble W, Riethmüller B.G. 1989. De novo expression of intercellular-adhesion molecule-1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 641-644.
- Jones R.G. & Thompson C.B. 2009. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & Dev.* 23: 537-548.
- Joseph W.R, Cao Z, Mountjoy K.G, Marshall E.S, Baguley B.C, Ching L.M. 1999. Stimulation of tumors to synthesize tumor necrosis factor- α in situ using 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid: a novel approach to cancer therapy. *Cancer Res.* 59: 633-638.
- Jovanovic M. & Vicovac L. 2009. Interleukin-6 stimulates cell migration, invasion and integrin expression in HTR-8/SVneo cell line. *Placenta* 30 (4): 320-328.
- Kaiser G.C, Yan F, Brent Polk D. 1999. Conversion of TNF α from antiproliferative to proliferative ligand in mouse intestinal epithelial cells by regulating mitogen-activated protein kinase. *Exp. Cell Res.* 249: 349-358.
- Kandel E.S. & Hay N. 1999. The regulation and activities of the multifunctional Serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp. Cell Res.* 253: 210-229.
- Kang K.W, Wagley Y, Kim K.W, Pokharel Y.R, Chung Y.Y, Chang I.Y, Kim J.J, Moon Js, Kim Y.K, Nah SY, Kang H.S, Oh J.W. 2007. Novel role of IL-6/SIL-6R signaling in the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in murine B16 metastatic melanoma clone F10.9, cells. *Free Radic. Biol. Med.* 42 (2): 215-227.
- Kant S, Swat W, Zhang S, Zhang Z-Y, Neel B.G, Flavell R.A, Davis R.J. 2011. TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho family GTPase signaling pathway. *Genes Dev.* 25 (9): 2069-2078.
- Kanto T, Kalinski P, Hunter O.C, Lotze M.T, Amoscato A.A. 2001. Ceramide mediates tumor-induced dendritic cell apoptosis. *J. Immunol.* 167: 3773-3784.
- Karin M. 2005. Inflammation and cancer: the long reach of Ras. *Nature Med.* 11: 20-21.
- Karjalainen J.M, Tammi R.H, Tammi M.I, Eskelinen M.J, Agren U.M, Parkkinen J.J, Alhava E.M, Kosma V-M. 2000. Reduced level of CD44 and hyaluronan associated with unfavorable prognosis in clinical stage I cutaneous melanoma. *Am. J. Pathol.* 157 (3): 957-965.
- Karst A.M, Gao K, Nelson C.C, Li G. 2009. Nuclear factor kappa B subunit p50 promotes melanoma angiogenesis by upregulating interleukin-6 expression. *Int. J. Cancer* 124: 494-501.
- Kashani-Sabet M. 2008. Skin cancer: Melanoma. *On the Knol* (July 24), page 1-8.
- Kastenbauer S, Löms Ziegler-Heitbrock H.W. 1999. NF- κ B1 (p50) is upregulated in lipopolysaccharide tolerance and can block tumor necrosis factor gene expression. *Infection and Immunity* 67: 1553-1559.

- Katerinaki E, Evans G.S, Lorigan P.C, MacNeil S. 2003. TNF- α increases human melanoma cells invasion and migration in vitro: the role of proteolytic enzymes. *Br. J. Cancer* 89: 1123-1129.
- Katz A, Shulman L.M, Porgador A, Revel M, Feldman M, Eisenbach L. 1993. Abrogation of B16 melanoma metastases by long-term low-dose interleukin-6 therapy. *J. Immunother.* 13: 98-109.
- Kesanakurti D, Chetty C, Bhoopathi P, Lakka S.S, Gorantla B, Tsung A.J, Rao J.S. 2011. Suppression of MMP-2 attenuates TNF- α induced NF- κ B activation and leads to JNK mediated cell death in glioma. *PLoS ONE* 6 (5): e19341.
- Kesanakurti D, Chetty C, Dinh D.H, Gujrati M, Rao J.S. 2012. Role of MMP-2 in the regulation of IL-6/Stat3 survival signaling via interaction with α 5 β 1 integrin in glioma. *Oncogene* 32 (3): 327-340.
- Kil I.S, Kim S.Y, Lee S.J, Park J-W. 2007. Small interfering RNA-mediated silencing of mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase enhances the sensitivity of HeLa cells toward tumor necrosis factor- α and anticancer drugs. *Free Rad. Biol. Med.* 43: 1197-1207.
- Kim D-S, Hwang E-S, Lee J-E, Kim S-Y, Kwon S-B, Park K-C. 2003. Shingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained EKR activation and subsequent MITF degradation. *J. Cell Sci.* 116: 1699-1706.
- Kim D-S, Kim S-Y, Moon S-J, Chung J-H, Kim K-H, Cho K-H, Park K-C. 2001. Ceramide inhibits cell proliferation through Akt/PKB inactivation and decreases melanin synthesis in Mel-Ab cells. *Pigment Cell Res.* 14: 110-115.
- Kim J.E, Stones C, Joseph W.R, Leung E, Finlay G.J, Shelling A.N, Philips W.A, Shepherd P.R, Baguley B.C. 2012. Comparison of growth factor signaling pathway utilization in cultured normal melanocytes and melanoma cell lines. *BMC Cancer* 12 (141): 1-10.
- Kim M, Gans J.D, Nogueira C, Wang A, Paik J-H, Feng B, Brennan C, Hahn W.C, Cordon-Cado C, Wagner S.N, Flotte T.J, Duncan L.M, Granter S.R, Chin L. 2006. Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell* 125 (7): 1269-1281.
- Kim M.Y, Linaudic C, Obeid L, Hannum Y. 1991. Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 266 (1): 484-489.
- Kim M-Y, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen D.X, Zhang X.H.-F, Norton L, Massagué J. 2009. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 139 (7): 1315-1326.
- Kim S, Takahashi H, Lin W.W, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo J.L, Karin M. 2009. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 457 (7225): 102-106.
- Kim Y.S, Morgan M.J, Choksi S, Liu Z.G. 2007. TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. *Mol. Cell* 26 (5): 675-687.
- Kishimoto T. 2010. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int. Immunol.* 22 (5): 347-352.
- Kishore R, Qin G, Luedemann C, Bord E, Hanley A, Silver M, Gavin M, Goukassain D, Losordo D.W. 2005. The cytoskeletal protein ezrin regulates EC proliferation and angiogenesis via TNF- α -induced transcriptional repression of cyclin A. *J. Clin. Invest.* 115 (7): 1785-1796.
- Kitayama J, Juji T, Atomi Y, Kuroda A, Muto T, Kobayashi M, Mitsui Y, Minami M. 1993. Transendothelial migration activity of lymphokine-activated killer (LAK) cells. *J. Immunol.* 151 (3): 1663-1672.
- Kjoller L, Kanse S.M, Kirkegaard T, Rodenburg K.W, Ronne E, Goodman S.L, Preissner K.T, Ossowski L, Andreasen P.A. 1997. Plasminogen activator inhibitor-1 represses integrin-and vitronectin-

- mediated cell migration independently of its function as an inhibitor of plasminogen activation. *Exp. Cell Res.* 232: 420-429.
- Klein R.M. & Aplin A.E. 2009. Rnd3 regulation of the actin cytoskeleton promotes melanoma migration and invasive outgrowth in three dimensions. *Cancer Res.* 69 (6): 2224-2233.
- Klemke M, Weschenfelder T, Konstandin M.H, Samstag Y. 2007. High affinity interaction of integrin alpha4beta1 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers. *J. Cell Physiol.* 212 (2): 368-374.
- Klingbeil P, Marhaba R, Jung T, Kirmse R, Ludwig T, Zöller M. 2009. CD44 variant isoforms promote metastasis formation by a tumor cell-matrix cross-talk that supports adhesion and apoptosis resistance. *Mol. Cancer Res.* 7: 168-179.
- Kobayashi N, Takada Y, Hachiya M, Ando K, Nakajima N, Akashi M. 2000. TNF- α induced p21^{WAF1} but not Bax in colon cancer cells WiDr with mutated p53: important role of protein stabilization. *Cytokine* 12 (12): 1745-1754.
- Kolesnick R. & Golde D.W. 1994. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* 77: 325-328.
- Kondo T. & Hearing V.J. 2011. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Rev. Dermatol.* 6 (1): 97-108.
- Kong L-Y, Gelbard A, Wei J, Reina-Ortiz C, Wang Y, Yang E.C, Hailemichael Y, Fokt I, Jayakumar A, Qiao W, Fuller G.N, Overwijk W.W, Priebe W, Heimberger A.B. 2010. Inhibition of p-STAT3 enhances IFN- α efficacy against metastatic melanoma in a murine model. *Clin. Cancer Res.* 16: 2550-2561.
- Kontermann R.E, Münkler S, Neumeyer J, Müller D, Branschädel M, Scheurich P, Pfizenmaier K. 2008. A humanized tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1)-specific antagonistic antibody for selective inhibition of tumor necrosis factor (TNF) action. *J. Immunother* 31 (3): 225-234.
- Korkaya H, Kim G, Davis A, Malik F, Henry L, Ithimakin S, Quraishi A.A, Tawakkol N, D'Angelo R, Paulson A.K, Chung S, Luther T, Paholak H.J, Liu S, Hassan K.A, Zen Q, Clouthier S.G, Wicha M.S. 2012. Activation of an IL-6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. *Mol. Cell* 47: 1-15.
- Kornfeld H, Berman J.S, Beer D. J, Center D.M. 1985. Induction of human T lymphocyte motility by interleukin 2. *J. Immunol.* 134 (6): 3887-3890.
- Kortylewski M, Jove R, Yu H. 2005. Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts. *Cancer Met. Rev.* 24: 315-327.
- Koss M, Pfeiffer G.R. 2nd, Wang Y, Thomas S.T, Yerukhimovich M, Gaarde W.A, Doerschuk C.M, Wang Q. 2006. Ezrin/radixin/moesin proteins are phosphorylated by TNF-alpha and modulate permeability increases in human pulmonary microvascular endothelial cells. *J. Immunol.* 176 (2): 1218-1227.
- Kossakowska A.E, Edwards D.R, Prusinkiewicz C, Zhang M.C, Guo D, Urbanski S.J, Grogan T, Marquez L.A, Janowska-Wieczorek A. 1999. Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 94 (6): 2080-2089.
- Koul D, Takada Y, Shen R, Aggarwal B.B, Yung W.K.A. 2006. PTEN enhances TNF-induced apoptosis through modulation of nuclear factor-kappa B signaling pathway in humBoichem. *Biophys. Res. Commun.* 350 (2): 463-471.

- Kovacks E.M, Makar R.S, Gertler F.B. 2006. Tuba stimulates intracellular N-WASP-dependent actin assembly. *J. Cell Sci.* 119: 2715-2726.
- Krieg C, Létourneau S, Pantaleo G, Boyman O. 2010. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *PNAS* 107 (26): 11906-11911.
- Kuehl W.M. & Bergsagel P.L. 2012. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J. Clin. Invest.* 122 (10): 3456-3463.
- Kumar P.S, Shiras A, Das G, Jagtap J.C, Prasad V, Shastry P. 2007. Differential expression and role of p21^{Cip1/waf1} and p27^{Kip1} in TNF- α -induced inhibition of proliferation in human glioma cells. *Mol. Cancer.* 6:42. Pages 1-12. doi:10.1186/1476-4598-6-42.
- Kuninaka S, Yano T, Yokoyama H, Fukuyama Y, Terazaki Y, Uehara T, Kanematsu T, Asoh H, Ichinose Y. 2000. Direct influences of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6) on the proliferation and cell-surface antigen expression of cancer cells. *Cytokine* 12 (1): 8-11.
- Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff A.K. 2005. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 24: 195-222.
- Kuphal S, Palm H.G, Poser I, Bosserhoff A.K. 2005. Snail-regulated genes in malignant melanoma. *Melanoma Res.* 15 (4): 305-313.
- Kurusu S, Suetsugu S, Yamazaki D, Yamaguchi H, Takenawa T. 2005. Rac-WAVE2 signaling is involved in the invasive and metastatic phenotypes of melanoma cells. *Oncogene* 24: 1309-1319.
- Kushiro K, Chu R.A, Verma A, Núñez N.P. 2012. Adipocytes promote B16BL6 melanoma cell invasion and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Microenvironment* 5: 73-82.
- Kushiro K. & Núñez N.P. 2011. Ob/ob serum promotes a mesenchymal cell phenotype in B16-BL6 melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 28 (8): 877-886.
- Kushiro K. & Núñez N.P. 2012. Ethanol inhibits B16-BL6 melanoma metastasis and cell phenotypes associated with metastasis. *In Vivo* 26 (1): 47-58.
- Kuwano Y, Tominaga K, Kawahara T, Sasaki H, Takeo K, Nishida K, Masuda K, Kawai T, Teshima-Kondo S, Rokutan K. 2008. Tumor necrosis factor α activates transcription of the NADPH oxidase organizer 1 (NOXO1) gene and upregulates superoxide production in colon epithelial cells. *Free Rad. Biol. Med.* 45: 1642-1652.
- Kuzumaki T, Kobayashi T, Ishikawa K. 1998. Genistein induces p21^{Cip1/WAF1} expression and blocks the G1 to S phase transition in mouse fibroblast and melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251: 291-295.
- LaBadier J, Garrett M.D, Stevenson L.F, Slingerland J.M, Sandhu C, Chou H.S, Fattaey A, Harlow E. 1997. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes & Development* 11: 847-862.
- LaCasse E.C, Baird S, Korneluk R.G, MacKenzie A.E. 1998. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17: 3247-3259.
- LaCasse E.C, Mahoney D.J, Cheung H.H, Plenchette S, Baird S, Korneluk R.G. 2008. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 27: 6252-6275.
- Lachman L.B, Brown D.C, Dinarello C.A. 1987. Growth-promoting effect of recombinant interleukin 1 and tumour necrosis factor for a human astrocytoma cell line. *J. Immunol.* 138 (9): 2913-2916.

- Lakshmi M.S, Parker C, Sherbet G.V. 1997. Expression of the transmembrane glycoprotein CD44 and metastasis associated 18A2/MTS1 gene in B16 murine melanoma cells. *Anticancer Res.* 17 (5A): 3451-3455.
- Landsberg J, Kohlmeyer J, Renn M, Bald T, Rogava M, Cron M, Fatho M, Lennerz V, Wölfel T, Hölzel M, Tüting T. 2012. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* 490 (7420): 412-416.
- Langley R.R, Carlisle R, Ma L, Specian R.D, Gerritsen M.E, Granger D.N. 2001. Endothelial expression of vascular cell adhesion molecule-1 correlates with metastatic pattern in spontaneous melanoma. *Microcirculation* 8: 335-345.
- Lasek W, Wankovicz A, Kuc K, Feleszko W, Golab J, Giermasz A, Wiktor-Jedrzejczak W, Jakóbisiak M. 1995. Potentiation of antitumor effects of tumor necrosis factor α and interferon γ by macrophage-colony-stimulating factor in a MmB16 melanoma model in mice. *Cancer Immunol. Immunother.* 40: 315-321.
- Lawson C. & Wolf S. 2009. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol. Rep.* 61 (1): 22-32.
- Lázár-Molnár E, Hegyesi H, Tóth S, Falus A. 2000. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 12 (6): 547-554.
- Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F. 2001. ER β inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology* 142 (9): 4120-4130.
- Ledda M.F, Adris S, Bravo A.I, Bover L, Carbone C, Paleolog E, Mordoh J, Chernajovsky Y, Podhajcer O.L. 1996. Tumor cells engineered to express interleukin-6 exhibit a reduced tumorigenicity depending on the tumor cell model. *Cell Mol. Biol.* 42 (5): 769-778.
- Lederle W, Depner S, Schnur S, Obermueller E, Catone N, Just A, Fusening N.E, Mueller M.M. 2011. IL-6 promotes malignant growth of skin SCCs by regulating a network of autocrine and paracrine cytokines. *Int. J. Cancer* 128: 2803-2814.
- Ledezma E, Apitz-Castro R, Cardier J. 2004. Apoptotic and anti-adhesion effect of ajoene, a garlic derived compound, on the murine melanoma cells: possible role a caspase-3 and the $\alpha 4\beta 1$ integrin. *Cancer Letters* 206: 35-41.
- Ledgerwood E.C, Pober J.S, Bradley J.R. 1999. Recent advances in the molecular basis of TNF signal transduction. *Lab. Invest.* 79 (9): 1041-1050.
- Ledgerwood E.C, Prins J.B, Bright N.A, Johnson D.R, Wolfreys K, Pober J.S, O'Rahilly S, Bradley J.R. 1998. Tumor necrosis factor is delivered to mitochondria where a tumor necrosis factor-binding protein is localized. *Lab. Invest.* 78 (12): 1583-1589.
- Lee B. & Moon S.K. 2005. Resveratrol inhibits TNF-alpha-induced proliferation and matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells. *J. Nutr.* 135 (12): 2767-2773.
- Lee C-h, Kakinuma T, Wang J, Zhang H, Palmer D.C, Restifo N.P, Hwang S.T. 2006. Sensitization of B16 tumor cells with a CXCR4 antagonist increases the efficacy of immunotherapy for established lung metastases. *Mol. Cancer Ther.* 5 (10): 2592-2599.
- Lee J, Hong J, Nam T-G, Peters E.C, Orth A.P, Geierstanger B.H, Goldfinger L.E, Ginsberg M.H, Cho C.Y, Schultz P.G. 2009. A small molecule inhibitor of $\alpha 4$ integrin-dependent cell migration. *Bioorg Med. Chem.* 17 (3): 977-980.
- Lee J.D, Sievers T.M, Skotzko M, Chandler C.F, Morton D.L, McBride W.H, Economou J.S. 1992. Interleukin-6 production by human melanoma cells lines. *Lymphokine Cytokine Res.* 11 (3): 161-166.

- Lee Y-R, Yu H-N, Noh E-M, Youn H.J, Song E-K, Han M-K, Park C-S, Kim B-S, Park Y-S, Park B-K, Lee S-H, Kim J-S. 2007. TNF- α upregulates PTEN via NF- κ B signaling pathways in human leukemic cells. *Exp. Mol. Med.* 39 (1): 121-127.
- Leir S-H, Baker J.E, Holgate S.T, Lackie P.M. 2000. Increased CD44 expression in human bronchial epithelial repair after damage or plating at low cell density. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 278: L1129-L1137.
- Lejeune F.J, Liénard D, Eggermont A, Schraffordt Koops H, Rosenkaimer F, Gérain J, Klaase J, Kroon B, Vanderveken J, Schmitz P. 1994. Rationale for using TNF alpha and chemotherapy in regional therapy of melanoma. *J. Cell Biochem.* 56 (1): 52-61.
- Lejeune F.J, Liénard D, Matter M, Rüegg C. 2006. Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy. *Cancer Immunity* 6 (p 6): 1-17.
- Lejeune F.J, Rüegg C, Liénard D. 1998. Clinical applications of TNF- α in cancer. *Curr. Op. Immunol.* 10: 573-580.
- Lejeune F.J. & Rüegg C. 2006. Recombinant human tumor necrosis factor: an efficient agent for cancer treatment. *Bull Cancer* 93 (8): 90-100.
- Leonardi A, Ellinger-Ziegelbauer H, Franzoso G, Brown K, Siebenlist U. 2000. Physical and functional interaction of filamin (actin-binding protein-280) and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *J. Biol. Chem.* 275 (1): 271-278.
- Leong K.G. & Karsan A. 2000. Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor α . *Histol. & Histopathol.* 15 (4): 1303-1325.
- Leslie N.R, Yang X, Downes C.P, Weijer C.J. 2005. The regulation of cell migration by PTEN. *Biochem. Soc. Trans.* 33 (Pt 6): 1507-1508.
- Létourneau S, van Leeuwen E.M.M, Krieg C, Martin C, Pantaleo G, Sprent J, Surh C.D, Boyman O. 2010. IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor α subunit CD25. *PNAS* 107 (5): 2171-2176.
- Levesque M.C. & Haynes B.F. 1997. Cytokine induction of the ability of human monocyte CD44 to bind hyaluronan is mediated primarily by TNF- α and is inhibited by IL-4 and IL-13. *J. Immunol.* 159: 6184-6194.
- Levesque M.C. & Haynes B.F. 1999. TNF α and IL-4 hyaluronan binding to monocyte CD44 involves posttranslational modification of CD44. *Cell. Immunol.* 193: 209-218.
- Levin A.M, Bates D.L, Ring A.M, Krieg C, Lin J.T, Su L, Moraga I.L, Raeber M.E, Bowman G.R, Novick P, Pande V.S, Garrison Fathman C, Boyman O, Christopher García K. 2012. Exploiting a natural conformational switch to engineer an interleukin-2 superkine. *Nature* 484 (7395): 529-533.
- Levine A.J. 1993. Normal and neoplastic growth and development. A.A.C.R. Special Conference in Cancer Research. *Cancer Res.* 53: 929-930.
- Levkau B, Garton K.J, Ferri N, Kloke K, Nofer J-R, Baba H.A, Raines E.W, Breithardt G. 2001. New survival pathway disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial cells. *Circ. Res.* 88: 282-290.
- Levy C, Khaled M, Fisher D.E. 2006. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *TRENDS Mol. Med.* 12 (9): 406-414.
- Levy M, Thaïss C.A, Elinav E. 2013. The microbiota: a new player in the etiology of colorectal cancer. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* (doi: 10.1007/s11888-013-0196-z).

- Lewis G.D, Aggarwal B.B, Eessalu T.E, Sugarman B.J, Shepard H.M. 1987. Modulation of growth of transformed cell by human tumor necrosis factor- α and interferon- γ . *Cancer Res.* 47: 5382-5385.
- Li H. & Lin X. 2008. Positive and negative signaling components involved in TNF α -induced NF- κ B activation. *Cytokine* 41: 1-8.
- Li L, Dragulev B, Zigrino P, Mauch C, Fox J.W. 2009. The invasive potential of human melanoma cell lines correlates with their ability to alter fibroblast gene expression in vitro and the stromal microenvironment in vivo. *Int. J. Cancer* 125 (8): 1796-1804.
- Li Y, Dowbenko D, Lasky L.A. 2002. AKT/PKB phosphorylation of p21^{Cip/WAF1} enhances protein stability of p21^{Cip/WAF1} and promotes cell survival. *J. Biol. Chem.* 277 (13): 11352-11361.
- Li Y, Li S, Qin X, Hou W, Dong H, Yao L, Xiong L. 2014. The pleiotropic roles of sphingolipid signaling in autophagy. *Cell Death and Disease* 5, e1245. doi: 10.1038/cddis.2014.215.
- Liang S. & Dong C. 2008. Integrin VLA-4 enhances sialyl-Lewisx/a-negative melanoma adhesion to and extravasation through the endothelium under low flow conditions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295 (3): C701-C707.
- Liénard D, Eggermont A.M, Koops H.S, Kroon B, Towse G, Hiemstra S, Schmitz P, Clarke J, Steinmann G, Rosenkaimer F, Lejeune F.J. 1999. Isolated limb perfusion with tumour necrosis factor-alpha and melphalan with or without interferon-gamma for the treatment of in-transit melanoma metastases: a multicentre randomized phase II study. *Melanoma Res.* 9 (5): 491-502.
- Liénard D, Eggermont A.M, Schraffordt Koops H, Kroon B.B, Rosenkaimer F, Autier P, Lejeune F.J. 1994. Isolated limb perfusion with high-dose tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interferon-gamma (IFN-gamma) and melphalan for melanoma stage III. Results of a multi-centre pilot study. *Melanoma Res.* 4 Suppl 1: 21-26.
- Lin M-T, Lin B-R, Chang C-C, Chu C-Y, Su H-J, Chen S-T, Jeng Y-M, Kuo M-L. 2007. IL-6 induces AGS gastric cancer cell invasion via activation of the c-Src/RhoA/ROCK signaling pathway. *Int. J. Cancer* 120: 2600-2608.
- Lin P-Y, Fosmire S.P, Park S-H, Park J-Y, Baksh S, Modiano J.F, Weiss R.H. 2007. Attenuation of PTEN increases p21 stability and cytosolic localization in kidney cancer cells: a potential mechanism of apoptosis resistance. *Mol. Cancer* 6 (16): 14 pages.
- Lin W-C, Yasumura S, Suminami Y, Sung M-W, Nagashima S, Stanson J, Whiteside T.L. 1995. Constitutive production of IL-2 by human carcinoma cells, expression of IL-2 receptor, and tumor cell growth. *J. Immunol.* 155: 4805-4816.
- Lindemann M.J, Benczik M, Gaffen S.L. 2003. Anti-apoptotic signaling by the interleukin-2 receptor reveals a function for cytoplasmic tyrosinase residues within the common γ (γ c) receptor subunit. *J. Biol. Chem.* 278 (12): 10239-10249.
- Linder S. 2009. Invadosomes at a glance. *J.Cell Sci.* 122: 3009-3013.
- Lindsay C.R, Lawn S, Campbell A.D, Faller W.J, Rambow F, Mort R.L, Timpson P, Li A, Cammareri P, Ridgway R.A, Morton J.P, Doyle B, Hegarty S, Rafferty M, Murphy I.G, McDernott E.W, Sheaman K, Pedone K, Finn A.J, Groben P.A. 2011. P-Rex1 is required for efficient melanoblast migration and melanoma metastasis. *Nature Communications* 2, article number 555 doi: 10.1038/ncomms1560.
- Liu F, Fu Y, Meyskens F.L. 2009. MITF regulates cellular response to reactive oxygen species through transcriptional regulation of APE-1/Ref-1. *J. Invest. Dermatol.* 129: 422-431.

- Liu F, Gomez Garcia A.M, Meyskers Jr F.L. 2012. NADPH oxidase 1 overexpression enhances invasion via matrix metalloproteinase-2 and epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 132: 2033-2041.
- Liu F, Singh A, Yang Z, Garcia A, Kong Y, Meyskens F.L. 2010. MITF links Erk1/2 kinase and p21^{CIP1/WAF1} activation after UVC radiation in normal human melanocytes and melanoma cells. *Mol. Cancer* 9 (214) doi:10.1186/1476-4598-9-214.
- Liu G. & Lozano G. 2005. p21 stability: linking chaperones to a cell cycle checkpoint. *Cancer Cell* 7: 113-114.
- Liu J, Beckman B.S, Foroozesh M. 2013. A review of ceramide analogs as potential anticancer agents. *Future Med. Chem.* 5 (12): 1405-1421.
- Liu J, Suresh Kumar K.G, Yu D, Motton S.A, McMahon M, Herlyn M, Thomas-Tickhonenko A, Fuchs S.Y. 2007. Oncogenic BRAF regulated β -trcp expression and NF- κ B activity in human melanoma cells. *Oncogene* 26: 1954-1958.
- Liu J-D, Chen S-H, Lin C-L, Tsai S-H, Liang Y-C. 2001. Inhibition of melanoma growth and metastasis by combination with (-)-epigallocatechin-3-gallate and dacarbazine in mice. *J. Cell Biochem.* 83: 631-642.
- Liu S, Kiosses W.B, Rose D.M, Slepak M, Salgia R, Griffin J.D, Turner C.E, Schwartz M.A, Ginsberg M.H. 2002. A fragment of paxillin binds the α 4 integrin cytoplasmic domain (tail) and selectively inhibits α 4-mediated cell migration. *J. Biol. Chem.* 277: 20887-20894.
- Liu Z-G, Hsu H, Goeddel D.V, Karin M. 1996. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell* 87: 565-576.
- Lo C-W, Chen M-W, Hsiao M, Wang S, Chen C-A, Hsiao S-M, Chang J-S, Lai T-C, Rose-John S, Kuo M-L, Wei L-H. 2011. IL-6 trans-signaling in formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer. *Cancer Res.* 71 (2): 424-434.
- Locksley R.M, Killeen N, Lenardo M.J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104 (4): 487-501.
- Loercher A.E, Tank E.M.H, Delston R.B, Harbour J.W. 2005. MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *J. Cell Biol.* 168 (1): 35-40.
- Lokhorst H.M, Lamme T, de Smet M, Klein S, de Weger R.A, van Oers R, Bloem A.C. 1994. Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures. *Blood* 84 (7): 2269-2277.
- Lorentzen A, Bamber J, Sadok A, Elson-Schwab I, Marshall C.J. 2010. An ezrin-rich, rigid uropod-like structure directs movement of amoeboid blebbing cells. *J. Cell Sci.* 124: 1256-1267.
- Lorusso G. & Rüegg C. 2008. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem. Cell Biol.* 130: 1091-1103.
- Louderbough J.M.V. & Schroeder J.A. 2011. Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. *Mol. Cancer Res.* 9 (12): 1573-1586.
- Lozano J.A. & Solano F. 1989. Bioquímica de la pigmentación en mamíferos. *Investigación y Ciencia* 157: 86-93.
- Lu C, Vickers M.F, Kerbel R.S. 1992. Interleukin 6: a fibroblast-derived growth inhibitor of human melanoma cells from early but not advanced stages of tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 9215-9219.

- Lu C. & Kerbel R.S. 1993. Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression. *J. Cell Biol.* 120 (5): 1281-1288.
- Lu X, Chen J, Malumbres R, Cubedo Gil E, Helfman D.M, Lossos I.S. 2007. HGAL, a lymphoma prognostic biomarker, interacts with the cytoskeleton and mediates the effects of IL-6 on cell migration. *Blood* 110 (13): 4269-4277.
- Lu Y.D, Chen P, Fan J.F, 2000. Measurements of IL-6 and TNF-alpha in tuberculosis and malignant effusion. *Human Yi. Ke. Da. Xue Xue Bao* 25 (3): 306.
- Lucas A.D. & Greaves D.R. 2001. Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages. *Expert. Rev. Mol. Med.* 3 (25): 1-18.
- Lupetti R, Mortarini R, Panceri P, Sensi M, Anichini A. 1996. Interaction with fibronectin regulates cytokine gene expression in human melanoma cells. *Int. J. Cancer* 66 (1): 110-116.
- Ma A, Koka R, Burkett P. 2006. Diverse functions of IL-2, IL-15 and IL-17 in lymphoid homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 657-679.
- MacDougall J.R, Bani M.R, Lin Y, Muschel R.J, Kerbel R.S. 1999. "Proteolytic switching": opposite patterns of regulation of gelatinase B and its inhibitor TIMP-1 during human melanoma progression and consequences of gelatinase B overexpression. *Br. J. Cancer* 80 (3-4): 504-512.
- MacGill R.S, Davis T.A, Macko J, Mauceri H.J, Weichselbaum R.R, King C.R. 2007. Local gene delivery of tumor necrosis factor alpha can impact primary tumor growth and metastases through a host-mediated response. *Clin. Exp. Metastasis* 24 (7): 521-531.
- Mackiewicz A, Wiznerowicz M, Roeb E, Karczewska A, Nowak J, Heinrich P.C, Rose-John S. 1995. Soluble interleukin 6 receptor is biologically active in vivo. *Cytokine* 7 (2): 142-149.
- Maellaro E, Dominici S, Del Bello B, Valentini M.A, Pieri L, Perego P, Supino R, Zunino F, Lorenzini E, Paolicchi A, Comporti M, Pompella A. 2000. Membrane gamma-glutamyl trnaspeptidase activity of malanoma cells: effects on celular H(2)O(2) production, cell surface protein thiol oxidation and NF-kappaB activation status. *J.Cell Sci.* 113 (Pt 15): 2671-2678.
- Maher K, Konjar S, Watts C, Turk B, Kopitar-Jerala N. 2014. Cystatin F regulates proteinase activity in IL-2-activated natural killer cells. *Protein Pept. Lett.* Apr 3.
- Mahoney D.J, Cheung H.H, Mrad R.L, Plenchette S, Simard C, Enwere E, Arora V, Mak T.W, Lacasse E.C, Waring J, Korneluk R.G. 2008. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Proc. Natl. Acad Sci.* 105 (33): 11778-11783.
- Maiti A, Maki G, Johnson P. 1998. TNF- α induction of CD44-mediated leukocyte adhesion by sulfation. *Science* 282: 941-943.
- Makondo K, Kimura K, Nitamura T, Yamaji D, Dong Junq B, Shibata H, Saito M. 2004. Hepatocyte growth factor/scatter factor suppresses TNF-alpha-induced E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1644 (1): 9-15.
- Malek T.R. & Bayer A.L. 2004. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat. Rev. Immunol.* 4 (9): 665-674.
- Malek T.R. & Castro I. 2010. Interleukin-2 receptor signaling: At the interface between tolerance and immunity. *Immunity* 33: 153-165.
- Malek T.R. 2008. The biology of interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 453-479.
- Malik S.T.A, Naylor M.S, East N, Oliff A, Balkwill F.R. 1990. Cells secreting tumour necrosis factor show enhanced metastasis in nude mice. *Eur. J. Cancer* 26 (10): 1031-1034.

- Manna S.K, Sah N.K, Aggarwall B.B. 2000. Protein tyrosine kinase p56^{lck} is required for ceramide-induced but not tumor necrosis factor-induced activation of NF-κB, AP-1, JNK, and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275 (18): 13297-13306.
- Männel D.N, Oro P, Hafner M, Falk W. 1994. Mechanisms involved in metastasis enhanced by inflammatory mediators. *Circulatory Shock* 44: 9-13.
- Manola J, Atkins M, Ibrahim J, Kirkwood J. 2000. Factores pronósticos del melanoma metastásico. Análisis agrupado de los Ensayos del Grupo Oncológico Cooperativo del Este. *J. Clin. Oncol.* 18 (22): 3782-3793.
- Manten-Horst E, Danen E.H, Smit L, Snoek M, Le Poole I.C, Van Muijen G.N, Pals S.T, Ruiter D.J. 1995. Expression of CD44 splice variants in human cutaneous melanoma and melanoma cell lines is related to tumor progression and metastatic potential. *Int. J. Cancer* 64 (3): 182-188.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. 2008. Review article cancer-related inflammation. *Nature* 454: 436-444.
- Mantovani A. 2005. Inflammation by remote control. *Nature* 435 (9): 752-753.
- Mantovani A. 2009. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* 457: 36-37.
- Mantovani A. 2010. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr. Mol. Med.* 10 (4): 369-373(5).
- Marchetti L, Klein M, Schlett K, Pfizenmaier K, Eisel U.L.M. 2004. TNF mediated neuroprotection against glutamate induced excitotoxicity is enhanced by NMDA receptor activation: essential role of a TNF receptor 2 mediated, P13 kinase dependent NF-κB pathway. *J. Biol. Chem.* DOI: 10.1074/jbc.M311766200.
- Marhaba R. & Zöller M. 2004. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J. Mol. Histol.* 35 (3): 211-231.
- Marí M, Colell A, Morales A, Caballero F, Moles A, Fernández A, Terrones O, Basañez G, Antosson B, García-Ruiz C, Fernández-Checa J.C. 2008. Mechanism of mitochondrial glutathione-dependent hepatocellular susceptibility to TNF despite NF-kappa B activation. *Gastroenterology* 134 (5): 1507-1520.
- Martinez T.N, Chen X, Bandyopadhyay S, Merrill A.H, Tansey M.G. 2012. Ceramide sphingolipid signaling mediated tumor necrosis factor (TNF)-dependent toxicity via caspase signaling in dopaminergic neurons. *Mol. Neurodegeneration* 7:45 pages 1-19. doi: 10.1186/1750-1326-7-45.
- Mathew S.J, Haubert D, Krönke M, Leptin M. 2009. Looking beyond death: a morphogenetic role for the TNF signalling pathway. *J. Cell Sci.* 122: 1939-1946.
- Mattei S, Colombo M.P, Melani C, Silvani A, Parmiani G, Herlyn M. 1994. Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *Int. J. Cancer* 58: 853-857.
- McFarland B.C, Hong S.W, Rajbhandari R, Twitty G.B. Jr. Gray G.K, Yu H, Benveniste E.N, Nozell S.E. 2013. NF-κB-induced IL-6 ensures STAT3 activation and tumor aggressiveness in glioblastoma. *PLoS One* 8 (11): e78728. doi: 10.1371/journal.pone.0078728.
- McKenzie J.A, Liu T, Goodson A.G, Grossman D. 2010. Survivin enhances motility of melanoma cells by supporting Akt activation and α5 integrin upregulation. *Cancer Res.* 70 (20): 7927-7937.
- McKenzie J.A. & Grossman D. 2012. Role of the apoptotic and mitotic regulator surviving in melanoma. *Anticancer Res.* 32: 397-404.

- McKenzie J.A. & Ridley A.J. 2007. Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF- α -induced changes in endothelial morphology and permeability. *J. Cell Physiol.* 213 (1): 221-228.
- McKenzie R.C, Park E-S, Brown W.R, Shivji G.S, Sauder D.N. 1994. Effect of ultraviolet-inducible cytokines on melanoma growth in vivo: stimulation of melanoma growth by interleukin-1 and -6. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 10: 74-79.
- McMahon G.A, Petitclerc E, Stefansson S, Smith E, Wong M.K.K, Westrick R.J, Ginsburg D, Brooks P.C, Lawrence D.A. 2001. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 276 (36): 33964-33968.
- McMillan D.N, Kernohan N.M, Flett M.E, Heys S.D, Deehan D.J, Sewell H.F, Walker F, Eremin O. 1995. Interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 localisation in human solid tumor cells in situ and in vitro: evidence for a direct role in the regulation of tumour cell proliferation. *Int. J. Cancer* 60 (6): 766-772.
- Menter D.G, Fitzgerald L, Patton J.T, McIntire L.V, Nicolson G.L. 1995. Human melanoma integrins contribute to arrest and stabilization potential while flowing over extracellular matrix. *Immunology Cell Biol.* 73 (6): 575-583.
- Merino-Martín J.J. & Cordero-Campaña M.I. 1998. Apoptosis: Implicaciones funcionales de la proteína p53 en el proceso de muerte celular programada. *BIO* 14: 12-14.
- Messina J.L, Yu H, Riker A.I, Munster P.N, Jove R.L, Daud A.I. 2008. Activated Stat-3 in melanoma. *Cancer Control* 15 (3): 196-201.
- Mielgo A, van Driel M, Bloem A, Landmann L, Günthert U. 2006. A novel antiapoptotic mechanism based on interference of Fas signaling by CD44 variant isoforms. *Cell Death and Differentiation* 13: 465-477.
- Min A, Hasuma T, Yano Y, Matsui-Yuasa I, Otani S. 1995. Regulation of apoptosis of interleukin 2-dependent mouse T-cell line by protein tyrosine phosphorylation and polyamines. *J. Cell. Physiol.* 165: 615-623.
- Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T. 1993. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annual Rev. Immunol.* 11: 245-268.
- Mirmohammadsadegh A, Marina A, Nambiar S, Hassan M, Tannapfel A, Ruzicka T, Hengge U.R. 2006. Epigenetic silencing of PTEN gene in melanoma. *Cancer Res.* 66 (13): 6546-6552.
- Misra S, Ghatak S, Toole B.P. 2005. Regulation of MDR1 expression and drug resistance by a positive feedback loop involving hyaluronan, phosphoinositide 3-kinase, and ErbB2. *J. Biol. Chem.* 280 (21): 20310-20315.
- Mocellin S. & Nitti D. 2008. TNF and cancer: the two sides of the coin. *Front Biosci.* 13: 2774-2783.
- Mong P. Y-T, Petruccio C, Kaufman H.L, Wang Q. 2008. Activation of Rho kinase by TNF- α -induced activation TNF- α is required for JNK activation in human pulmonary microvascular endothelial cells. *J. Immunol.* 180: 550-558.
- Montfort A, de Badts B, Douin-Echinard V, Martin P.G.P, Iacovoni J, Nevoit C, Therville N, Garcia V, Bertrand M-A, Bessières M-H, Trombe M-C, Levade T, Benoist H, Ségui B. 2009. FAN stimulates TNF α -induced gene expression, leukocyte recruitment, and humoral response. *J. Immunol.* 183: 5369-5378.
- Moore R.J, Owens D.M, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, Holdsworth H, Turner L, Rollins B, Pasparakis M, Kollias G, Balkwill F. 1999. Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. *Nat. Med.* 5 (7): 828-831.

- Morad S.A. & Cabot M.C. 2013. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* 13 (1): 51-65.
- Morinaga Y, Suzuki H, Takatsuki F, Akiyama Y, Taniyama T, Matsushima K, Onozaki K. 1989. Contribution of IL-6 to the antiproliferative effect of IL-1 and tumor necrosis factor on tumor cell lines. *J. Immunol.* 143 (11): 3538-3542.
- Moschos S.J, Drogowski L.M, Reppert S.L, Kirkwood J.M. 2007. Integrins and cancer. *Oncology* 21 (9 Suppl 3): 13-20.
- Mostafavi-Pour Z, Askari J.A, Parkinson S.J, Parker P.J, Ng T.T, Humphries M.J. 2003. Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J. Cell Biol.* 161 (1): 155-167.
- Mouawad R, Benhammouda A, Rixe O, Antoine E.C, Borel C, Weil M, Khayat D, Soubrane C. 1996. Endogenous interleukin 6 levels in patients with metastatic malignant melanoma: correlation with tumor. *Clin. Cancer Res.* 2: 1405-1409.
- Moyano J.V, Maqueda A, Casanova B, García-Pardo A. 2003. $\alpha 4\beta 1$ integrin/ligand interaction inhibits $\alpha 5\beta 1$ -induced stress fibers and focal adhesions via down-regulation of RhoA and induces melanoma cell migration. *Mol. Biol. Cell.* 14: 3699-3715.
- Mullen T.D, Jenkins R.W, Clarke C.J, Bielawski J, Hannun Y.A, Obeid L.M. 2011. Ceramide synthase-dependent ceramide generation and programmed cell death. *J. Biol. Chem.* 286 (18): 15929-15942.
- Mummert M.E, Mummert D.I, Ellinger L, Takashima A. 2003. Functional roles of hyaluronan in B16-F10 melanoma growth and experimental metastasis in mice. *Mol. Cancer Therap.* 2: 295-300.
- Muñoz-Fernández M.A. & Fresno M. 1998. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous systems. *Progress in Neurobiology* 56 (3): 307-340.
- Murata J, Ayukawa K, Ogasawara M, Fujii H, Saiki I. 1997. α -Melanocyte-stimulating hormone blocks invasion of reconstituted basement membrane (Matrigel) by murine B16 melanoma cells. *Invasion & Metastasis* 17: 82-93.
- Muthukumar N, Miletti-González K.E, Ravindranath A.K, Rodríguez-Rodríguez L. 2006. Tumor necrosis factor- α differentially modulates CD44 expression in ovarian cancer cells. *Mol. Cancer Res.* 4 (8): 511-520.
- Muthusamy V. & Piva T.J. 2011. Melanoma cell signaling: looking beyond RAS-RAF-MEK, skin cancers-risk factors, prevention and therapy, Prof. Caterina La Porta (Ed.), ISBN 978-953-307-722-2. www.intechopen.com.
- Nagakawa Y, Melville Williams G, Zheng Q, Tsuchida A, Aoki T, Montgomery R.A, Klein A.S, Sun Z. 2005. Oxidative mitochondrial DNA damage and deletion in hepatocytes of rejecting liver allografts in rats: Role of TNF- α . *Hepatology* 42: 208-215.
- Nakahara H, Otani T, Sasaki T, Miura Y, Takai Y, Kogo M. 2003. Involvement of Cdc42 and Rac small G proteins in invadopodia formation of RPMI7951 cells. *Genes to Cells* 8 (12): 1019-1027.
- Naor D, Sionov R.V, Ish-Shalom D. 1997. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv. Cancer Res.* 71: 241-319.
- Natali P, Nicotra M.R, Cavaliere R, Bigotti A, Romano G, Temponi M, Ferrone S. 1990. Differential expression of intercellular adhesion molecule 1 in primary and metastatic melanoma lesions. *Cancer Res.* 50: 1271-1278.

- Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya R.C, Lee H, Chen Z, Lee M-K, Attar N, Sagezar H, Codon T, Nelson S.F, McArthur G, Sosman J, Ribas A, Lo R.S. 2010. Melanoma acquire resistance to B-RAF (V600E) inhibition by RTK on N-RAS upregulation. *Nature* 468 (7326): 973-977.
- Nemethova M, Avinger S, Small J.V. 2008. Building the actin cytoskeleton: filopodia contribute to the construction of contractile bundles in the lamella. *J. Cell Biol.* 180 (6): 1233-1244.
- Neuner P, Klosner G, Pourmojib M, Trautinger F, Knobler R. 1994. Selective release of tumor necrosis factor binding protein II by malignant human epidermal cells reveals protection from tumor necrosis factor α -mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* 54: 6001-6005.
- Newton Bishop J.A. 1997. Molecular pathology of melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 16: 141-154.
- Nicholas C. & Lesinski G.B. 2011. The Jak-STAT signal transduction pathway in melanoma (chapter 14). *Breakthroughs in Melanoma Research*, Dr. Yohei Tanaka (Ed) pages 283-307. ISBN: 978-953-307-291-3 www.intechopen.com.
- Nicholson K.M. & Anderson N.G. 2002. The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14 (5): 381-395.
- Nicolson G.L. 1993. Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 12: 325-343.
- Nilsson M.B, Langley R.R, Fidler I.J. 2005. Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine. *Cancer Res.* 65 (23): 10794-10800.
- Nimnual A.S, Taylor L.J, Bar-Sagi D. 2003. Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat. Cell Biol.* 5 (3): 236-241.
- Niu G, Bowman T, Huang M, Shivers S, Reintgen D, Daud A, Chang A, Kraker A, Jove R, Yu H. 2002. Role of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene* 21: 7001-7010.
- Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, Coppola D, Jaroszeski M, Dalton W, Jove R, Yu H. 1999. Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 in vivo. *Cancer Res.* 59 (20): 5059-5063.
- Niu G, Shain K.H, Huang M, Ravi R, Bedi A, Dalton W.S, Jove R and Yu H. 2001. Overexpression of a dominant-negative signal transducer and activator of transcription 3 variant in tumor cells leads to production of soluble factors that induce apoptosis and cell cycle arrest. *Cancer Res.* 61: 3276-3280.
- Noda A, Ning Y, Venable S.F, Pereira-Smith O.M, Smith T.R. 1994. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res.* 211 (1): 90-98.
- Norris J.G, Tang L-P, Sparicio S.M, Benveniste E.N. 1994. Signal transduction pathways mediating antricyte IL-6 induction by IL-1 β and tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.* 152: 841-850.
- Novgorodov S.A, Szule Z.M, Luberto C, Jones J.A, Bielawski J, Bielawska A, Hannun Y.A, Obeid L.M. 2005. Positively charged ceramide is a potent inducer of mitochondrial permeabilization. *J. Biol. Chem.* 280 (16): 16096-16105.
- Nürnberg A, Kitzing T, Grosse R. 2011. Nucleating actin for invasion. *Nature Rev. Cancer* 11: 177-187.
- Obata N.H, Tamakoshi K, Shibata K, Kikkawa F, Tomoda Y. 1997. Effects of interleukin-6 on in vitro cell attachment, migration and invasion of human ovarian carcinoma. *Anticancer Res.* 17 (1A): 337-342.

- Oberoi T.K, Dogan T, Hocking J.C, Scholz R-P, Mooz J, Anderson C.L, Karreman C, zu Heringdorf D.M, Schmidt G, Ruonala M, Namikawa K, Harms G.S, Carpy A, Macek B, Köster R.W, Rajalingam K. 2012. IAPs regulate the plasticity of cell migration by directly Rac1 for degradation. *EMBO J.* 31: 14-28.
- Oberoi-Khanuja T.K, Karreman C, Larisch S, Rapp U.R, Rajalingam K. 2012. Role of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP) protein, a member of the baculoviral IAP repeat (BIR) domain family, in the regulation of C-RAF kinase and cell migration. *J. Biol. Chem.* 287 (34): 28455-28455.
- Obrador E, Benlloch M, Pellicer J.A, Asensi M, Estrela J.M. 2011. Intertissue flow of glutathione (GSH) as a tumor growth-promoting mechanism: interleukin 6 induces GSH release from hepatocytes in metastatic B16 melanoma-bearing mice. *J. Biol. Chem.* 286 (18): 15716-15727.
- Oguma K, Oshima H, Aoki M, Uchio R, Naka K, Nakamura S, Hirao A, Saya H, Takedo M.M, Oshima M. 2008. Activated macrophages promote Wnt signaling through tumour necrosis factor- α in gastric tumour cells. *EMBO J.* 27: 1671-1681.
- Okada T, Hawley R.G, Kodaka M, Okumo H. 1999. Significance of VLA-4-VCAM-1 interaction and CD44 for transendothelial invasion in a bone marrow metastatic myeloma model. *Clin. Exp. Metastasis* 17: 623-629.
- Okahara H, Yagita H, Miyake K, Okumura K. 1994. Involvement of very late activation antigene 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis. *Cancer Res.* 54: 3233-3236.
- Old L.J. 1985. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230: 630-632.
- Old L.J. 1988. El factor de necrosis tumoral. *Investigación y Ciencia* 142: 28-37.
- Olson M.F. & Sahai E. 2009. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin. Exp. Metastasis.* 26: 273-287.
- Orange J.S, Roy-Ghanta S, Mace E.M, Maru S, Rak G.D, Sanborn K.B, Fasth A, Saltzman R, Paisley A, Monaco-Shawver L, Banerjee P.P, Pandey R. 2011. IL-2 induces a WAVE2-dependent pathway for actin reorganization that enables WASp-independent human NK cell function. *J. Clin. Invest.* doi: 10.1172/JCI44862.
- Orgaz J.L. & Sanz-Moreno V. 2012. Emerging molecular targets in melanoma invasion and metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 26 (1): 39-57.
- Orosz P, Echtenacher B, Falk W, Rüschoff J, Weber D, Männel D.N. 1993. Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 177: 1391-1398.
- Ortega A.L, Ferrer P, Carretero J, Obrador E, Asensi M, Pellicer J.A, Estrela J.M. 2003(a). Down-regulation of glutathione and Bcl-2 synthesis in mouse B16 melanoma cells avoids their survival during interaction with the vascular endothelium. *J. Biol. Chem.* 278 (41): 39591-39599.
- Ortega A.L, Mena S, Estrela J.M. 2011. Glutathione in cancer cell death. *Cancers* 3: 1285-1310.
- Osada A, Nukashima H, Furue M, Tamaki K. 1995. Up-regulation of CD44 expression by tumor necrosis factor- α is neutralized by interleukin-10 in Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 105: 124-127.
- Osiak A-E, Zenner G, Linder S. 2005. Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp. Cell Res.* 307: 342-353.
- Osinalde N, Moss H, Arrizabalaga O, Omaetxebarria M.J, Blagoev B, Zubiaga A.M, Fullaondo A, Arizmendi J.M, Kratchmarova. 2011. Interleukin-2 signaling pathway analysis by quantitative phosphoproteomics. *J. Proteomics* 75: 177-191.

- Ossowski L. & Aguirre-Ghiso J.A. 2010. Dormancy of metastatic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 23 (1): 41.
- Özbek S, Peters M, Breuhahn K, Mann A, Blessing M, Fischer M, Schirmacher P, Mackiewicz A, Rose-John S. 2001. The designer cytokine hyper-IL-6 mediates growth inhibition and GM-CSF-dependent rejection of B16 melanoma cells. *Oncogene* 20: 972-979.
- Paget S. 1889. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 133 (3421): 571-573.
- Pani G, Galeotti T, Chiarugi P. 2010. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev.* 29: 351-378.
- Pani G, Giannoni E, Galeotti T, Chiarugi P. 2009. Redox-based escape mechanism from death: the cancer lesson. *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (11): 2791-2806.
- Pankonin G, Reipert B, Ager A. 1992. Interactions between interleukin-2-activated lymphocytes and vascular endothelium: binding to and migration across specialized and non-specialized endothelia. *Immunology* 77: 51-60.
- Papaharalambus C, Sajjad W, Syed A, Zhang C, Bergo M.O, Alexander R.W, Ahmad M. 2005. Tumor necrosis factor α stimulation of Rac1 activity. *J. Biol. Chem.* 280 (19): 18790-18796.
- Paraiso K.H.T, Xiang Y, Rebecca V.W, Abel E.V, Chen Y.A, Munko A.C, Wood E, Fedorenko I.V, Sondak V.K, Anderson A.R.A, Ribas A, Palma M.D, Nathanson K.L, Koomen J.M, Messina J.L, Smalley K.S.M. 2011. PTEN loss confer BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer Res.* 71 (7): 2750-2760.
- Park S.-J, Kim Y.-Y, Lim J.-Y, Seo G.-J, Kim J, Park S.-I, Park B.-J. 2001. Opposite role of Ras in tumor necrosis factor- α -induced cell cycle regulation: Competition for Raf kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287: 1140-1147.
- Parri M, Taddei M.L, Bianchini F, Calorini L, Chiarugi P. 2009. EphA2 reexpression prompts invasion of melanoma cells shifting from mesenchymal to amoeboid-like motility style. *Cancer Res.* 69 (5): 2078-2081.
- Parri M. & Chiarugi P. 2010. Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell. Commun. Signaling* 8 (23): 1-14.
- Pastorino J.G, Simbula G, Yamamoto K, Glascott P.A, Rothman R.J, Farber J.L. 1996. The cytotoxicity of tumor necrosis factor depends on induction of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 271 (47): 29792-29798.
- Pedersen P-H, Ness G.O, Engebraaten O, Bjerkvig R, Lillehaug J.R, Laerum O.D. 1994. Heterogeneous response to the growth factors (EGF, PDGF (bb), TGF- α , bFGF, IL-2) on glioma spheroid growth, migration and invasion. *Int. J. Cancer* 56: 255-261.
- Peignen P. 1995. ¿Jaque a las metástasis? *Mundo Científico* 156 (15): 368-369.
- Penning L.C, Denecker G, Vercaemmen D, Declercq W, Schipper R.G, Vandenabeele P. 2000. A role for potassium in TNF-induced apoptosis and gene-induction in human and rodent tumour cell lines. *Cytokine* 12 (6): 747-750.
- Pennisi E. 2013. Cancer therapies use a little help from microbial friends 342: 921.
- Peppelenbosh M, Boone E, Jones G.E, van Deventer S.J, Haegeman G, Fiers W, Grooten J, Ridley A.J. 1999. Multiple signal transduction pathways regulate TNF-induced actin reorganization in macrophages: inhibition of Cdc42-mediated filopodium formation by TNF. *J. Immunol.* 162 (2): 837-845.

- Peterson J.A, Sheibani N, David G, Garcia-Pardo A, Peters D.M. 2005. Heparin II domain of fibronectin uses alpha4beta1 integrin to control focal adhesion and stress fiber formation, independent of syndecan-4. *J. Biol. Chem.* 280 (8): 6915-6922.
- Pham C.G, Bubici C, Zazzeroni F, Papa S, Jones J, Alvarez K, Jayawardena S, De Smacle E, Cong R, Beaumont C, Torti F.M, Torti S.V, Franzoso G. 2004. Ferritin heavy chain upregulation by NF- κ B inhibits TNF α -induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. *Cell.* 119: 529-542.
- Piecyk M, Wax S, Beck A.R.P, Kedersha N, Gupta M, Maritim B, Chen S, Gueydan C, Krays V, Streuli M, Anderson P. 2000. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF- α . *EMBO J.* 19 (5): 4154-4163.
- Pilati P, Rossi C.R, Mocellin S. 2008. Strategies to enhance the anticancer potential of TNF. *Front Biosci.* 13: 3181-3193.
- Pillet A.H, Juffroy O, Mazard-Pasquier V, Moreau J.L, Gesbert F, Chastagner P, Colle J.H, Thèze J, Rose T. 2008. Human IL-Rbeta chains form IL-2 binding homodimers. *Eur. Cytokine Netw.* 19 (1): 49-59.
- Pillet A.H, Lavergne V, Pasquier V, Gesbert F, Thèze J, Rose T. 2010. IL-2 induces conformational changes in its preassembled receptor core, which then migrates in lipid raft and binds to the cytoskeleton meshwork. *J. Mol. Biol.* 403: 671-692.
- Pinner S. & Sahai E. 2008. Imaging amoeboid cancer cell motility in vivo. *J. Microscopy* 231 (3): 441-445.
- Plaisance S, Alileche A, Ham D.S, Rubinstein E, Sahraoui Y, Jasmin C, Azzarone B. 1994. How interleukin-2 can affect human fibroblast behavior. *Pathol. Res. Pract.* 190 (9-10): 942-949.
- Plaisance S, Rubinstein E, Alileche A, Ham D.S, Sahraoui Y, Mingari M.C, Bellomo R, Rimoldi D, Colombo M.P, Jasmin C, Carrel S, Azzarone B. 1993. Human melanoma cells express a functional interleukin-2 receptor. *Int. J. Cancer* 55 (1): 164-170.
- Pollak N, Niere M, Ziegler M. 2007. NAD kinase levels control the NADPH concentration in human cells. *J. Biol. Chem.* 282: 33562-33571.
- Ponnusamy S, Meyers-Needham M, Senkal C.E, Saddoughi S.A, Sentelle D, Panneer Selvam S, Salas A, Ogretmen B. 2010. Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. *Future Oncol.* 6 (10): 1603-1624.
- Ponta H, Sherman L, Herrlich P.A. 2003. CD44: from adhesion molecules to signaling regulators. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 33-45.
- Porter J.C. & Hogg N. 1997. Integrin cross talk: activation of lymphocyte function-associated antigen-1 on human T cells alters alpha4beta1- and alpha5beta1-mediated function. *J. Cell Biol.* 138 (6): 1437-1447.
- Poyraz A, Akyürek N, Gönül I.I, Erdem O. 2004. p21 and Bax expression in cutaneous malignant melanomas: correlation with histologic prognostic parameters. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 23 (4): 625-631.
- Qian B-Z. & Pollard J.W. 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141 (1): 39-51.
- Qian F, Vaux D.L, Weissman I.L. 1994. Expression of the integrin α 4 β 1 on melanoma cells can inhibit the invasive stage of metastasis formation. *Cell* 77: 335-347.

- Qin H, Moellinger J.D, Wells A, Windsor L.J, Sun Y, Benveniste E.N. 1998. Transcriptional suppression of matrix metalloproteinase-2 gene expression in human astrogloma cells by TNF-alpha and IFN-gamma. *J. Immunol.* 161 (12): 6664-6673.
- Qu Y, Oyan A.M, Liu R, Hua Y, Zhang J, Hovland R, Popa M, Liu X, Brokstad K.A, Simon R, Molven A, Lin B, Zhang W-d, McCormack E, Kalland K-H, Ke X-S. 2013. Generation of prostate tumor-initialing cells is associated with elevation of reactive oxygen species and IL-6/STAT3 signaling. *Cancer Res.* 73 (23): 7090-7100.
- Raaschou P, Simard J.F, Holnqvist M, Askling J. 2013. Rheumatoid arthritis, anti-tumour necrosis factor therapy, and risk of malignant melanoma: nationwide population based prospective cohort study from Sweden. *BMJ* 346: f1939.
- Radeff-Huang J, Seasholtz T.M, Chang J.W, Smith J.M, Walsh C.T, Brown J.H. 2007. Tumor necrosis factor- α -stimulated cell proliferation is mediated through sphingosine kinase-dependent Akt activation and cyclin D expression. *J. Biol. Chem.* 282 (2): 863-870.
- Rahman A. & Fazal F. 2009. Hug tightly and say goodbye: role of endothelial ICAM-1 in leukocyte transmigration. *Antioxid. Redox Signal* 11 (4): 823-839.
- Raisova M, Bektas M, Wieder T, Daniel P, Eberle J, Orfanos C.E, Geilen C.C. 2000. Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lettters* 473 (1): 27-32.
- Ranjan P. & Boss J.M. 2006. C/EBP β regulates TNF induced MnSOD expression and protection against apoptosis. *Apoptosis* 11: 1837-1849.
- Ranuncolo S.M, Ladeda V, Gorsotidy S, Morandi A, Varela M, Lastiri J, Loria D, Del Aguila R, Joffé E.B, Pallotta G, Puricelli L. 2002. Expression of CD44s and CD44 splice variants in human melanoma. *Oncol. Rep.* 9 (1): 51-56.
- Ratner S, Patrick P, Bora G. 1992. Lymphocyte development of adherence and motility in extracellular matrix during IL-2 stimulation. *J. Immunol.* 149 (2): 681-688.
- Rattigan Y, Hsu J-M, Mishra P.J, Glod J, Banerjee D. 2010. Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu. *Exp. Cell Res.* 316: 3417-3424.
- Rebollo A, Pitton C, García A, Gómez J, Silva A. 1995. A role for the intermediate affinity IL-2R in the protection against glucocorticoid-induced apoptosis. *Immunology* 84: 388-395.
- Reed K.B, Brewer J.D, Lohse C.M, Bringe K.E, Pruitt C.N, Gibson L.E. 2012. Increasing incidence of melanoma among young adults: an epidemiological study in Olmsted country, Minnesota. *Mayo Clinic Proceedings* 87 (4): 328-334.
- Reichert T.E, Nagashima S, Kashii Y, Stanson J, Gao G, Dou Q.P, Whiteside T.L. 2000. Interleukin-2 expression in human carcinoma cell lines and its role in cell cycle progression. *Oncogene* 19: 514-525.
- Ridley A.J. 2001(a). Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* 114: 2713-2722.
- Ridley A.J. 2001. Rho family proteins: coordinating cell responses. *TRENDS Cell Biol.* 11 (12): 471-477.
- Rieber M, Strasberg-Rieber M. 1998. Induction of p53 and melanoma cell death is reciprocal with down-regulation of E2F, cyclin D1 and pRB. *Int. J. Cancer* 76: 757-760.
- Rincon M. 2012. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunol.* 33 (11): 571-577.

- Robbs B.K, Lucena P.I, Viola J.P.B. 2013. The transcription factor NFAT1 induces apoptosis through cooperation with Ras/Raf/MEK/ERK pathway and upregulation of TNF- α expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 2016-2028.
- Rodeck U. & Herlyn M. 1991. Growth factors in melanoma. *Cancer Metast. Rev.* 10: 89-101.
- Rodier F, Coppé J-P, Patil C.K, Hoeijmakers W.A.M, Muñoz D.P, Raza S.R, Freund A, Campeau E, Davalos A.R, Campisi J. 2009. Persistent DNA damage signaling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* 11 (8): 973-979.
- Roebuck K.A. & Finnegan A. 1999. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J. Leukoc. Biol.* 66: 876-888.
- Rogers R.J, Monnier J.M, Nick H.S. 2001. Tumor necrosis factor- α selectively induces MnSOD expression via mitochondria-to-nucleus signaling, whereas interleukin1 β utilizes an alternative pathway. *J. Biol. Chem.* 276 (23): 20419-20427.
- Romanov V.S, Abramova M.V, Svetlikova S.B, Bykova T.V, Zubova S.G, Aksenov N.D, Fornace A.J, Pospelova T.V, Pospelov V.A. 2010. p21^{Waf1} is required for cellular senescence but not for cell cycle arrest induced by the HDAC inhibitor sodium butyrate. *Cell Cycle* 9 (19): 3945-3955.
- Ronai Z, Yang Y.M, Fuchs S.Y, Adler V, Sardana M, Herlyn M. 1998. ATF2 confers radiation resistance to human melanoma cells. *Oncogene* 16 (4): 523-531.
- Rondepierre F, Bouchon B, Bonnet M, Moins N, Chezal J.M, D'Incan M, Degoul F. 2010. B16 melanoma secretomes and in vitro invasiveness: synthesis as an invasion modulator. *Melanoma Res.* 20 (2): 77-84.
- Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones S.A. 2006. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J. Leukoc. Biol.* 80: 227-236.
- Rose-John S, Waetzig G.H, Scheller J, Grötzinger J, Seegert D. 2007. The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 11 (5): 613-624.
- Rosenberg S.A, Packard B.S, Aebersold P.M, Solomon D.D, Topalian S.L, Toy S.T, Simon P, Lotze M.T, Yang J.C, Seipp C.A, Simpson C, Carter C, Bock S, Schwartzentruber D, Wei J.P, White D.E. 1988. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 319 (25): 1676-1680.
- Rosenberg S.A. 1988. Immunotherapy of cancer using interleukin 2: current status and future prospects. *Immunol. Today* 9 (2): 58-62.
- Rosenberg S.A. 1990. Inmunoterapia del cáncer. *Investigación y Ciencia* 166: 26-34.
- Rosenberg S.A. Restifo N.P, Yang J.C, Morgan R.A, Dudley M.E. 2008. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 8 (4): 299-308.
- Rosette C, Roth R.B, Oeth P, Braun A, Kammerer S, Ekblom J, Denissenko M.F. 2005. Role of ICAM-1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 26 (5): 943-950.
- Rossi C.R, Foletto M, Mocellin S, Pilati P, Lise M. 2004. Hyperthermic isolated limb perfusion with low-dose tumor necrosis factor-alpha and melphalan for bulky in-transit melanoma metastases. *Ann. Surg. Oncol.* 11 (2): 173-177.
- Rüegg C, Yilmaz A, Bieler G, Bamat J, Chaubert P & Lejeune F.J. 1998. Evidence for the involvement of endothelial cell integrin α V β 3 in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN- γ . *Nature Med.* 4 (4): 408-414.

- Rusciano D. & Burger M.M. 1992. Why do cancer cells metastasize into particular organs? *BioEssays* 14: 185-194.
- Ruth M.C, Xu Y, Maxwell I.H, Ahn N.G, Norris D.A, Shellman Y.G. 2006. RhoC promotes human melanoma invasion in a PI3K/Akt-dependent pathway. *J. Inv. Dermatol.* 126: 862-868.
- Ruvolo P.P. 2001. Ceramide regulates cellular homeostasis via diverse stress signaling pathways. *Leukemia* 15 (8): 1153-1160.
- Saddoughi S.A. & Ogretmen B. 2013. Diverse functions of ceramide in cancer cell death and proliferation. *Adv. Cancer Res.* 117: 37-58.
- Sáenz S, Conejo-Mir J, Cayuela A. 2005. Epidemiología del melanoma en España (Melanoma epidemiology in Spain). *Actas Dermo-sifiliográficas* 96 (7): 411-418.
- Sahai E. & Marshall C.J. 2003. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signaling and extracellular proteolysis. *Nat. Cell Biol.* 5 (8): 711-719.
- Saini A, Seller Z, Davies D, Marshall J.F, Hart I.R. 1997. Activation status and function of the VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) integrin expressed on human melanoma cell lines. *Int. J. Cancer.* 73: 264-270.
- Salmena L, Carracedo A, Pandolfi P.P. 2008. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 133: 403-413.
- Salomon J-C. 1991. Le tissu déchiré. *Propos sur la diversité des cancers.* Ed Seuil. Paris.
- Sans E, Delachanal E, Duperray A. 2001. Analysis of the roles of ICAM-1 in neutrophil transmigration using a reconstituted mammalian cell expression model: implication of ICAM-1 cytoplasmic domain and Rho-dependent signaling pathway. *J. Immunol.* 166: 544-551.
- Santer F.R, Malinowska K, Culig Z, Cavarretta I.T. 2010. Interleukin-6 trans-signaling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and maspin expression in human prostate cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* 17 (1): 241-253.
- Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, Paterson H, Marra P, Pinner S, Sahai E, Marshall C.J. 2008. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 135: 510-523.
- Sanz-Moreno V. & Marshall C.J. 2009. Rho-GTPase signaling drives melanoma cell plasticity. *Cell Cycle* 8 (10): 1484-1487.
- Sanz-Moreno V. 2012. Tumour invasion: a new twist on Rac-driven mesenchymal migration. *Curr Biol.* 22 (11): R499-R451.
- Sass G, Shembade N.D, Haimerl F, Lamoureux N, Hashemolhosseini S, Tannapfel A, Tiegs G. 2007. TNF pretreatment interferes with mitochondrial apoptosis in the mouse liver by A20-mediated down-regulation of Bax. *J. Immunol.* 179: 7042-7049.
- Sawada M, Kiyono T, Nakashima S, Shinoda J, Naganawa T, Hara S, Iwama T, Sakai N. 2004. Molecular mechanisms of TNF- α -induced ceramide formation in human glioma cells: p53 mediated oxidant stress-dependent and -independent pathways. *Cell Death and Differentiation* 11: 997-1008.
- Schadendorf D, Heidel J, Gawlik C, Suter L, Czarnetzki B.M. 1995. Association with clinical outcome of expression of VLA-4 in primary cutaneous malignant melanoma as well as P-selectin and E-selectin on intratumoral vessels. *J. Nat. Cancer Institute.* 87 (5): 366-371.
- Schaider H, Soyer H.P, Heider K.H, Hofmann-Wellnhof R, Zatioukat K, Smolle J, Kerl H. 1998. CD44 and variants in melanocytic skin neoplasia. *J. Cutan. Pathol.* 25 (4): 199-203.

- Schatton T, Murphy G.F, Frank N.Y, Yamaura K, Waaga-Gasser A.M, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan L.M, Weishaupt C, Fuhlbrigge R.C, Kupper T.S, Sayegh M.H, Frank M.H. 2008. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451 (7176): 345-349.
- Schenck M, Carpinteiro A, Grassmé H, Lang F, Gulbins E. 2007. Ceramide: physiological and pathophysiological aspects. *Arch. Biochem. Biophys.* 462: 171-175.
- Schioppa T, Moore R, Thompson R.G, Rosser E.C, Kulbe H, Nedospasov S, Mauri C, Coussens L.M, Balkwill F.R. 2011. B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. *PNAS* 108 (26): 10662-10667.
- Schlesinger M, Schmitz P, Zeisig R, Naggi A, Torri G, Casu B, Bendas G. 2012. The inhibition of the integrin VLA-4 in MV3 melanoma cell binding by non-anticoagulant heparin derivatives. *Thrombosis Res.* 129: 603-610.
- Schmitmeier S, Markland F.S, Chen T.C. 2000. Anti-invasive effect of contortrostatin, a snake venom disintegrin, and TNF-alpha on malignant glioma cells. *Anticancer Res.* 20 (6B): 4227-4233.
- Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G, Fiers W. 1993. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *EMBO J.* 12 (8): 3095-3104.
- Schwartzentruber D.J, Lawson D.H, Richards J.M, Conry R.M, Miller D.M, Treisman J, Gailani F, Riley L, Conlon K, Pockaj B, Kendra K.L, White R.L, Gonzalez R, Kuzel T.M, Curti B, Leming P.D, Whitman E.D, Balkissoon J, Eeintgen D.S, Kaufman H, Marincola F.M, Merino M.J, Rosenberg S.A, Choyke P, Vena D, Hwu P. 2011. Gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* 364 (22): 2119-2127.
- Scott A.M, Wolchok J.D, Old L.J. 2012. Antibody therapy of cancer. *Nature Rev. Cancer* 12: 278-287.
- Scott G. & Leopardi S. 2003. The cAMP signaling pathway has opposing effects on Rac and Rho in B16F10 cells: implications for dendrite formation in melanocytic cells. *Pigment Cell Res.* 16: 139-148.
- Screaton G. & Xu X-N. 2000. T cell life and death signalling via TNF-receptor family members. *Curr. Op. Immunol.* 12: 316-322.
- Scudiero D.A, Shoemaker R.H, Paull K.D, Monks A, Tierney S, Nofziger T.H, Currens M.J, Seniff D, Boyd M.R. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48: 4827-4833.
- Sedgwick J.D, Riminton D.S, Cyster J.G, Körner H. 2000. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol. Today* 21 (3): 110-113.
- Seeger H, Wallwiener D, Mueck A.O. 2006. Different effects of estradiol and various antiestrogens on TNF- α -induced changes of biochemical markers for growth and invasion of human breast cancer cells. *Life Sciences* 78: 1464-1468.
- Seftor R.E.B, Seftor E.A, Hendrix M.J.C. 1999. Molecular role(s) for integrins in human melanoma invasion. *Cancer Metast. Rev.* 18 (3): 359-375.
- Seiter S, Schadendorf D, Herrmann K, Schneider M, Rösel M, Arch R, Tilgen W, Zöller M. 1996. Expression of CD44 variant isoforms in malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2: 447-456.
- Selleri C, Sato T, Anderson S, Young N.S, Maciejewski J.P. 1995. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha suppress both early and late stages of hematopoiesis and induce programmed cell death. *J.Cell Physiol.* 165 (3): 538-546.
- Senchenkov A, Litvak D.A, Cabot M.C. 2001. Targeting ceramide metabolism-a strategy for overcoming drug resistance. *J. Natl. Cancer Inst.* 93: 347-357.

- Sestáková B, Ondrusová L, Vachtenheim J. 2010. Cell cycle inhibitor p21/WAF1/CIP1 as a cofactor of MITF expression in melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 23 (2): 238-251.
- Sethi G, Sung B, Aggarwal B.B. 2008. TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci.* 13: 5094-5107.
- Sever N, Filipic M, Brzin J, Lah T.T. 2002. Effect of cysteine preteinase inhibitors on murine B16 melanoma cell invasion in vitro. *Biol. Chem.* 383: 839-842.
- Seynhaeve A.L.B, Hoving S, Schipper D, Vermeulen C.E, de Wiel-Ambagtsheer G.a, van Tiel S.T, Eggermont A.M.M, ten Hagen T.L.M. 2007. Tumor necrosis factor α mediates homogeneous distribution of liposomes in murine melanoma that contributes to a better tumor response. *Cancer Res.* 67 (19): 9455-9462.
- Shah M, Bhoumik A, Goel V, Dewing A, Breitweiser W, Kluger H, Krajewski S, Krajewska M, DeHart J, Lau E, Kallenberg D.M, Jeong H, Eroshkin A, Bennett E, Chin L, Bosenberg M, Jones N, Ronai Z.A. 2010. A role for ATF2 in regulating MITF and melanoma development. *PLoS Genetics* 6 (12): e1001258.
- Shellman Y.G, Makela M, Norris D.A. 2006. Induction of secreted matrix metalloproteinase-9 activity in human melanoma cells by extracellular matrix proteins and cytokines. *Melanoma Res.* 16 (3): 207-211.
- Sherr C.J. & Roberts J.M. 1995. CDK inhibitors positive and negative regulators of G₁-phase progression. *Genes & Development* 13: 1501-1512.
- Shi Y, Simmons M.N, Seki T, Oh S.P, Sugrue P. 2001. Change in gene expression subsequent to induction of Pnn/DRS/memA: increase in p21^{cip1/waf1}. *Oncogene* 20: 4007-4018.
- Shinohara M, Shang W-H, Kubodera M, Harada S, Mitsushita J, Kato M, Miyazaki H, Susimoto H, Kamata T. 2007. Nox1 redox signaling mediates oncogenic Ras-induced disruption of stress fiber and focal adhesions by down-regulating Rho. *J. Biol. Chem.* 282 (24): 17640-17648.
- Shiohara M, Akashi M, Gombart A.F, Yang R, Koeffler H.P. 1996. Tumor necrosis factor α : Posttranscriptional stabilization of WAF1 mRNA in p53-deficient human leukemic cells. *J. Cell. Physiol.* 166 (3): 568-576.
- Shrayer D.P, Cole B, Hearing V.J, Wolf S.F & Wanebo H.J. 1999. Immunotherapy of mice with an irradiated melanoma vaccine coupled with interleukin-12. *Clin. Exp. Metastasis* 17: 63-70.
- Shulga N. & Pastorino J.G. 2012. GRIM-19-mediated translocation of STAT3 to mitochondria is necessary for TNF-induced necroptosis. *J. Cell Sci.* 125 (Pt 12): 2995-3003.
- Silvani A, Ferrari G, Paonessa G, Toniatti C, Parmiani G, Colombo M.P. 1995. Down-regulation of interleukin 6 receptor α chain in interleukin 6 transduced melanoma cells causes selective resistance to interleukin 6 but not to oncostatin M. *Cancer Res.* 55 (10): 2200-2205.
- Siskind L.J. 2005. Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37 (3): 143-153.
- Siwik D.A, Chang D.L, Colucci W.S. 2000. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblast in vitro. *Circ. Res.* 86 (12): 1259-1265.
- Skobin V, Jelkmann W, Morschakova E, Paulov A.D, Schlenke P. 2000. Tumor necrosis factor-alpha and TNF-beta inhibit clonogenicity of mobilized human hematopoietic progenitors. *J. Interferon Cytokine Res.* 20 (5): 507-510.

- Slipicevic A, Holm R, Nguyen M.T.P, Bohler P.J, Davidson B, Florenes V.A. 2005. Expression of activated Akt and PTEN in malignant melanomas: relationship with clinical outcome. *Am. J. Clin. Pathol.* 124 (4): 528-536.
- Smith C.A, Farrah T, Goodwin R.G. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death. *Cell* 76: 959-962.
- Smith E.L. & Schuchman E.H. 2008. Acid sphingomyelinase overexpression enhances the antineoplastic effects of irradiation in vitro and in vivo. *Mol. Ther* 16 (9): 1565-1571.
- Smith K.A. 1990. Interleucina-2. *Investigación y Ciencia* 164: 14-22.
- Smith K.A. 2001. In *Cytokine Reference*, Oppenheim J. and Feldman M. ed., Academic Press. London: 113-125.
- Smith P.C, Hobisch A, Lin D-L, Culig Z, Keller E.T. 2001. Interleukin-6 and prostate cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12: 33-40.
- Smolková K. & Jezek P. 2012. The role of mitochondrial NADPH-dependent isocitrate dehydrogenase in cancer cells. *Int. J. Cell Biol.* Volume 2012. Article ID: 273947, 12 pages.
- Soengas M.S, Capodieci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman J.G, Gerald W.L, Lazebnik Y.A, Cerdón-Cardó C, Lowe S.W. 2001. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409: 207- 211.
- Song G, Ouyang G, Bao S. 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell Mol. Med.* 9 (1): 59-71.
- Song M.S, Salmena L, Pandolfi P.P. 2012. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 283-296.
- Sporn M.B. & Roberts A.B. 1985. Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 313: 745-747.
- Springer T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314.
- Srivastava A.K, Qin X, Wedhas N, Arnush M, Linkhart T.A, Chadwick R.B, Kumar A. 2007. Tumor necrosis factor- α augments matrix metalloproteinase-9 production in skeletal muscle cells through the activation of transforming growth factor- β -activated kinase 1 (TAK1)-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 282 (48): 35113-35124.
- Stahl J.M, Cheung M, Sharma A, Trivedi N.R, Shanmugam S, Robertson G.P. 2003. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res.* 63: 2881-2890.
- Stefansson S. & Lawrence D.A. 1996. The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature* 383 (6599): 441-443.
- Suda T, Murray R, Fischer M, Yokota T, Zlotnik A. 1990. Tumor necrosis factor- α and p40 induce day 15 murine fetal thymocyte proliferation in combination with IL-2. *J. Immunol.* 144 (5): 1783-1787.
- Suganuma M, Okabe S, Marino M.W, Sakai A, Sueoka E, Fujiki H. 1999. Essential role of tumor necrosis factor α (TNF- α) in tumor promotion as revealed by TNF- α -deficient mice. *Cancer Res.* 59: 4516-4518.
- Sugarman B.J, Aggarwall B.B, Hass P.E, Figari I.S, Palladino M.A Jr, Shepard H.M. 1985. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230 (4728): 943-945.

- Sun W.H, Kreisle R.A, Phillips A.W, Ershler W.B. 1992. In vivo and in vitro characteristics of interleukin 6-transfected B16 melanoma cells. *Cancer Res.* 52: 5412-5415.
- Sunday G.S. 2008. Is chronic inflammation the key to unlocking the mysteries of cancer? *Scientific American.* November 9; 1-5.
- Swope V.B, Abdel-Malek Z, Kassem L.M, Nordlund J.J. 1991. Interleukins 1 α and 6 and tumour necrosis factor- α are paracrine inhibitors of human melanocyte proliferation and melanogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 96 (2): 180-185.
- Szlosarek P, Charles K.A, Balkwill F.R. 2006. Tumour necrosis factor- α as a tumour promoter. *Eur. J. Cancer* 42: 745-750.
- Szlosarek P.W, Grimshaw M, Kulbe H, Wilson J.L, Wilbanks G.D, Burke F, Balkwill F.R. 2006(a). Expression and regulation of tumor necrosis factor α in normal and malignant ovarian epithelium. *Mol. Cancer Ther.* 5(2): 382-390.
- Taguchi Y, Kondo T, Watanabe M, Miyaji M, Umehara H, Kozutsumi Y, Okazaki T. 2004. Interleukin-2-induced survival of natural killer (NK) cells involving phosphatidylinositol-3 kinase-dependent reduction of ceramide through acid sphingomyelinase, sphingomyelinase synthase, and glucosylceramide synthase. *Blood* 104: 3285-3293.
- Takahashi K, Eto H, Tanabe K.K. 1999. Involvement of CD44 in matrix metalloproteinase-2 regulation in human melanoma cells. *Int. J. Cancer* 80: 387-395.
- Tam W.L. & Weinberg R.A. 2013 The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature Med.* 19 (11): 1438-1449.
- Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Yamaguchi S, Lida H, Dohi S, Kozawa O. 2010. Mechanisms of tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. *J. Neuroinflammation* 7 (16): 1-8.
- Tang C-H, Chen C-F, Chen W-M, Fong Y-C. 2011. IL-6 increases MMP-13 expression and motility in human chondrosarcoma cells. *J. Biol. Chem.* 286 (13): 11056-11066.
- Taniguchi S, Tatsuka M, Nakamatsu K, Inoue M, Sadano H, Okazaki H, Iwamoto KH, Baba T. 1989. High invasiveness associated with augmentation of motility in a fos-transferred highly metastatic rat 3Y1 cell line. *Cancer Res.* 49: 6738-6744.
- Tanimura Y, Kokuryo T, Tsumoda N, Yamazaki Y, Oda K, Nimura Y, Mon N.N, Huang P, Nakanuma Y, Chen M-F, Jan Y-Y, Yeh T-S, Chiu C-T, Hsieh L-L, Hamaguchi M. 2005. Tumor necrosis factor α promotes invasiveness of cholangiocarcinoma cells via its receptor, TNFR2. *Cancer Letters* 219: 205-213.
- Tannock I.F, Hill R.P, Morgan J. 1998. *The Basic Science of Oncology*, 3rd. ed. Metastasis. Mc Graw Hill, Health Professions Division (New York): 160-175.
- Tartaglia L.A, Ayres T.M, Wong G.H.W, Goeddel D.V. 1993. A novel domain within the 55 Kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74: 845-853.
- Tartaglia L.A, Pennica D, Goeddel D.V. 1993(a). Ligand passing: The 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J. Biol. Chem.* 268: 18542-18548.
- Tartaglia L.A. & Goeddel D.V. 1992. Two TNF receptors. *Inmunol. Today* 13 (5): 151-153.
- Teague T.K, Marrack P, Kappler J.W, Vella A.T. 1997. IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *J. Immunol.* 158: 5791-5796.

- Temkin V. & Levi-Schaffer F. 2001. Mechanism of tumour necrosis factor alpha mediated eosinophil survival. *Cytokine* 15 (1): 20-26.
- Terai M, Eto M, Young G.D, Berd D, Mastrangelo M.J, Tamura Y, Harinaga K, Sato T. 2012. Interleukin 6 mediates production of interleukin 10 in metastatic melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 61 (2): 145-155.
- Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. 2001. Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor- α in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylation state. *Diabetes* 50: 2563-2571.
- Thomas J, Liu T, Cotter M.A, Florell S.R, Robinette K, Hanks A.N, Grossman D. 2007. Melanocyte expression of surviving promotes development and metastasis of UV-induced melanoma in HGF-transgenic mice. *Cancer Res.* 67 (11): 5172-5178.
- Thomas T, Balabhadrapathruni S, Gardner C.R, Hong J, Faaland C.A, Thomas T.J. 1999. Effects of epidermal growth factor on MDA-MB-468 breast cancer cells: Alterations in polyamine biosynthesis and the expression of p21/CIP1/WAF1. *J. Cell. Physiol.* 179: 257-266.
- Thorne R.F, Legg J.W, Isacke C.M. 2004. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in coordinating adhesive and signaling events. *J. Cell Sci.* 117: 373-380.
- Torka R, Thuma F, Herzog V, Kirfel G. 2006. ROCK signaling mediates the adoption of different modes of migration and invasion in human mammary epithelial tumor cells. *Exp. Cell Res.* 312: 3857-3871.
- Tran M.A, Smith C.D, Kester M, Robertson G.P. 2008. Combining nanoliposomal ceramide with sorafenib synergistically inhibits melanoma and breast cancer cell survival to decrease tumor development. *Clin. Cancer Res.* 14 (11): 3571-3578.
- Trikha M, Corringham R, Klein B, Rossi J-F. 2003. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clin. Cancer Res.* 9: 4653-4665.
- Triozzi P.L, Eicher D.M, Rinehart J.J. 1992. Modulation of adhesion molecules on human large granular lymphocytes by interleukin-2 in vivo and in vitro. *Cell Immunol.* 140 (2): 295-303.
- Trotter M.J, Tang L, Tron V.A. 1997. Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1) in human cutaneous malignant melanoma. *J. Cutan. Pathol.* 24 (5): 265-271.
- Tsao H, Chin L, Garraway L.A, Fisher D.E. 2012. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev.* 26: 1131-1155.
- Tse J.C. & Kalluri R. 2007. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J. Biol. Chem.* 101 (4): 816-829.
- Tseng W-P, Su C-M, Tang C-H. FAK activation is required for TNF- α -induced IL-6 production in myoblast. *J. Cell Physiol.* 223: 389-396.
- Tsenova L, Bergtold A, Freedman V.H, Young R.A, Kaplan G. 1999. Tumor necrosis factor α is a determinant of pathogenesis and disease progression in mycobacterial infection in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5657-5662.
- Tsutsumi Y, Tsunoda S, Kaneda Y, Kamada H, Kihira T, Nakagawa S, Yamamoto Y, Horisawa Y, Mayumi T. 1996. In vivo anti-tumor efficacy of polyethylene glycol-modified tumor necrosis factor- α against tumor necrosis factor-resistant tumors. *Jpn. J. Cancer Res.* 87 (10): 1078-1085.
- Turley E.A, Noble P.W, Bourguignon L.Y.W. 2002. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J. Biol. Chem.* 277 (7): 4589-4592.

- Tuszynski G.P, Gasic T.B, Rothman V.L, Knudsen K.A, Gasic G.J. 1987. Thrombospondin, a potentiator of tumor cell metastasis. *Cancer Res.* 47: 4130-4133.
- Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento M. 2009. The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Cur. Cancer Drug Targets* 9: 32-71.
- Underhill C. 1992. CD44: hyaluronan receptor. *J. Cell Sci.* 103: 293-298.
- Valcárcel M, Carrascal T, Crende O, Vidal-Vanaclocha F. 2014. IL-18 regulates melanoma VLA-4 integrin activation through a hierarchized sequence of inflammatory factors. *J. Invest. Dermatol.* 134 (2): 470-480.
- Valles S.L, Benlloch M, Rodríguez M.L, Mena S, Pellicer T.A, Asensi M, Obrador E, Estrela J.M. 2013. Stress hormones promote growth of B16-F10 melanoma metastases: an interleukin 6-and glutathione-dependent mechanism. *J. Transl. Med.* 11; 72. doi: 10.1186/1479-5876-11-72.
- Van Antwerp D.J, Martin S.J, Verma I.M, Green D.R. 1998. Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF- κ B. *Trends Cell Biol.* 8: 107-111.
- Van der Heinen K, Egorova A.D, Poelmann R.E, Wentzell J.J, Hierck B.P. 2011. Role of primary cilia as flow detectors in the cardiovascular system. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 290: 87-119.
- Van Etten B, de Vries M.R, van Ijken M.G.A, Lans T.E, Guetens G, Ambagtsheer G, van Tiel S.T, de Boeck G, de Bruijn E.A, Eggermont A.M.M, ten Hagen T.L.M. 2003. Degree of tumour vascularity correlates with drug accumulation and tumour response upon TNF- α -based isolated hepatic perfusión. *Br. J. Cancer* 88: 314-319.
- Van Horssen R, Ten Hagen T.L.M, Eggermont A.M.M. 2006. TNF- α in cancer treatment: Molecular insights, antitumor effects, and Clinical utility. *The Oncologist* 11: 397-408.
- Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Lienhard M, Schmitz, Fiers W, Haegeman G. 1998. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor- κ B p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 273 (6): 3285-3290.
- Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. 1995 Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol.* 5: 392-399.
- Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. 2012. PI3K signaling: the path to discovery and understanding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (3): 195-203.
- Varfolomeev E, Goncharov T, Fedorova A.V, Dynek J.N, Zobel K, Deshayes K, Fairbrother W.J, Vucic D. 2008. c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 283 (36): 24295-24299.
- Varfolomeev E.E. & Ashkenazi A. 2004. Tumor necrosis factor: an apoptosis JunKie? *Cell* 116: 491-497.
- Vassalli P. 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 411-452.
- Vaux D.L. 2009. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins as drug targets for the treatment of cancer. *F1000 Biology Reports* 1:79 (doi: 10.3410/BI-79).
- Venkataraman K. & Futerman A.H. 2000. Ceramide as a second messenger: sticky solutions to sticky problems. *Trends Cell Biol.* 10 (10): 408-412.
- Vestweber D. 2007. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation through endothelial cells contacts. *Ernst Schering Found Symp. Proc.* 3: 151-167.

- Viaud S, Saccheri F, Mignot G, Yamazaki T, Daillère R, Hannani D, Enot D.P, Pfirschke C, Engblom C, Pittet M.J, Schlitzer A, Ginhoux F, Apetoh L, Chachaty E, Woerther P-L, Eberl G, Bérard M, Ecobichon C, Clermont D, Bizet C, Gaboriau-Routhiau V, Cerf-Bensussan N, Opolon P, Yessaad N, Vivier E, Ryffel B, Elson C.O, Doré J, Kroemer G, Lepage P, Gomperts Boneca I, Ghiringhelli F, Zitvogel L. 2013. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphatide. *Science* 342: 971-976.
- Villareal M.O, Han J, Ikuta K, Isoda H. 2012. Mechanism of Mitf inhibition and morphological differentiation effects of hirsein A on B16 melanoma cells revealed by DNA microarray. *J. Dermatol. Sci.* 67: 26-36.
- Voelkel-Johnson C, Thorne T.E, Laster S.M. 1996. Susceptibility to TNF in the presence of inhibitors of transcription or translation is dependent on the activity of cytosolic phospholipase A₂ in human melanoma tumor cells. *J. Immunol.* 156: 201-207.
- von Felbert V, Córdoba F, Weissenberger J, Vallan C, Kato M, Nakashima I, Braathen L.R, Weis J. 2005. Interleukin-6 gene ablation in a transgenic mouse model of malignant skin melanoma. *Am. J. Pathol.* 166 (3): 831-841.
- Wagley Y, Yoo Y.C, Seo H.G, Rhee M.H, Kim T.H, Kang K.W, Nah S.Y, Oh J.W. 2007. The IL-6/sIL-6R treatment of a malignant melanoma cell line enhances susceptibility to TNF-alpha-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354 (4): 985-991.
- Wajant H. & Scheurich P. 2011. TNFR1-induced activation of the classical NF-κB pathway. *FEBS J.* 278: 862-876.
- Wajant H.K, Pfizenmaier K, Scheurich P. 2003. Tumor necrosis factor signaling (Review). *Cell Death and Differentiation* 10: 45-65.
- Walczak H. 2011. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunol. Rev.* 244: 9-28.
- Waldmann T.A. 2006. Effective cancer therapy through immunomodulation. *Annu. Rev. Med.* 57: 65-81.
- Wallach D, Vanfolomeev E.E, Malinin N.L, Goltsev Y.V, Kovalenko A.V, Boldin M.P. 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 331-367.
- Wallach D. & Kovalenko A. 2009. 12th International TNF conference: the good, the bad and the scientists. *Cytokine & Growth Factor Rev.* 20: 259-269.
- Wang C-Y, Mayo M.W, Korneluk R.G, Goeddel D.V, Baldwin A.S. 1998. NF-κB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281: 1680-1688.
- Wang H.H, McIntosh A.R, Hasinoff B.B, Rector E.S, Ahmed N, Nance D.M, Orr F.W. 2000. B16 melanoma cell arrest in the mouse liver induces nitric oxide release and sunusoidal cytotoxicity: a natural hepatic defense against metastasis. *Cancer Res.* 60: 5862-5869.
- Wang L, Du F, Wang X. 2008. TNF-α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133: 693-703.
- Wang L, Reinach P, Lu L. 2005. TNF-alpha promotes cell survival through stimulation of K⁺ channel and NF-kappaB activity in corneal epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 311 (1): 39-48.
- Wang L, Shirure V.S, Burdick M.M, Wu S. 2011. UVB-irradiation regulates VLA-4-mediated melanoma cells adhesion to endothelial VCAM-1 under flow conditions. *Mol. Carcinog.* 50 (1): 58-65.
- Wang W, Goswami S, Sahai E, Wyckoff J.B, Segall J.E, Condeelis J.S. 2005. Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility. *TRENDS Cell Biol.* 15 (3): 138-145.

- Wang X. & Lin Y. 2008. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol. Sin.* 29 (11): 1275-1288.
- Wang Y, Li L, Guo X, Jin X, Sun W, Zhang X, Xu R.C. 2012. Interleukin-6 signaling regulates anchorage-independent growth, proliferation, adhesion and invasion in human ovarian cancer cells. *Cytokine* 59: 228-236.
- Wang Z, Kishimoto H, Bhat-Nakshatri P, Crean C, Nakshatri H. 2005. TNF α resistance in MCF-7 breast cancer cells is associated with altered subcellular localization of p21^{CIP1} and p27^{KIP1}. *Cell Death and Differentiation* 12: 98-100.
- Watanabe Y, Osaki H, Akaike T. 1997. TNF- α bifunctionally induces proliferation in primary hepatocytes. *J. Immunol.* 159: 4840-4847.
- Waterson A. & Bower M. 2004. TNF and cancer: good or bad? *Cancer Therapy* 2: 131-148.
- Waterson A.M, Salway F, Andreakos E, Butler D.M, Feldmann M, Coombes R.C. 2004. TNF autovaccination induces self anti-TNF antibodies and inhibits metastasis in a murine melanoma model. *Br. J. Cancer* 90 (6): 1279-1284.
- Waysbort N, Russ D, Chain B.M, Friedman N. 2013. Coupled IL-2-dependent extracellular feedbacks govern two distinct consecutive phases of CD4 T cell activation. *J. Immunol.* 191: 5822-5830.
- Wehrli P, Viard I, Bullani R, Tschopp J, French L.E. 2000. Death receptors in cutaneous biology and disease. *J. Invest. Dermatol.* 115: 141-148.
- Weidle U.H, Klostermann S, Eggle D, Krüger A. 2010. Interleukin 6/interleukin 6 receptor interaction and it's role as a therapeutic target for treatment of cachexia and cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 7 (6): 287-302.
- Weidmann E, Sacchi M, Plaisance S, Heo D.S, Yasumura S, Lin W-C, Johnson J.T, Herberman R.B, Azzarone B, Whiteside T.L. 1992. Receptors for interleukin 2 on human squamous cell carcinoma cell lines and tumor in situ. *Cancer Res.* 52: 5963-5970.
- Weinberg R.A. 1991. Tumor suppressor genes. *Science* 254: 1138-1146.
- Weinberg R.A. 1996. Así se produce el cáncer. *Investigación y Ciencia* 242: 10-18.
- Weiss A, Wiskocil R.L, Stobo J.D. 1984. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL-2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J. Immunol.* 133 (1): 123-128.
- Weiss L, Orr F.W, Honn K.V. 1989. Interactions between cancer cells and the microvasculature: a rate-regulator for metastasis. *Clin. Expl. Met.* 7: 127-167.
- Weiss L. 1985. Metastatic inefficiency. En *Principles of metastasis*. Harcourt Brace Jovanovich Publishers. Academic Press Inc. pp 151-155.
- Weissenbach M, Clahsen T, Weber C, Spitzer D, Wirth D, Vestweber D, Heinrich P.C, Schaper E. 2004. Interleukin-6 is a direct mediator on T cell migration. *Eur. J. Immunol.* 34 (10): 2895-2906.
- Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, Karasarides M, Martin J, Niculescu-Duvaz D, Springer C.J, Marais R. 2004. ^{V599E}B-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res.* 64: 2338-2342.
- Wells A, Grahovac J, Wheeler S, Ma B, Lauffenburger D. 2013. Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis. *TRENDS Pharmacol Sci.* 34 (5): 283-289.
- Westweber D. 2007. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol. Rev.* 218: 178-196.

- Widlund H.R. & Fisher D.E. 2003. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* 22: 3035-3041.
- Wiegmann K, Schütze S, Machleidt T, Witte D, Krönke M. 1994. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 78: 1005-1015.
- Wilkinson P.C. & Newman I. 1994. Chemoattractant activity of IL-2 for human lymphocytes: a requirement for the IL-2 receptor β -chain. *Immunology* 82: 134-139.
- Williams L.M, Lali F, Willetts K, Balague C, Godessart N, Brennan F, Feldmann M, Foxwell B.J.M. 2008. Rac mediates TNF-induced cytokine production via modulation of NF- κ B. *Mol. Immunol* 45: 2446-2454.
- Wójciak-Stothard B, Entwistle A, Garg R, Ridley A.J. 1998. Regulation of TNF- α -induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 176: 150-165.
- Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Adrian U.H, Deryugina E.I, Strongin A.Y, Bröcker E-B, Friedl P. 2003. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J. Cell Biol.* 160 (2): 267-277.
- Wondrak G.T. 2009. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (12): 3013-3069.
- Woo C.H, Eom Y.W, Yoo M.H, You H.J, Han H.J, Song W.K, Yoo Y.J, Chun J.S, Kim J.H. 2000. Tumor necrosis factor- α generates reactive oxygen species via a cytosolic phospholipase A2-linked cascade. *J. Biol. Chem.* 275 (41): 32357-32362.
- Wu H, Goel V, Haluska F.G. 2003. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 22: 3113-3122.
- Wu P.C, Alexander H.R, Huang J, Hwu P, Gnant M, Berger A.C, Turner E, Wilson O, Libutti S.K. 1999. In vivo sensitivity of human melanoma to tumor necrosis factor (TNF)- α is determined by tumor production of the novel cytokine endothelial-monocyte activating polypeptide II (EMAPII). *Cancer Res.* 59 (1): 205-212.
- Wu R.C, Li X, Schönthal A.H. 2000. Transcriptional activation of p21WAF1 by PTEN/MMAC1 tumor suppressor. *Mol. Cell Biochem.* 203 (1-2): 59-71.
- Wu S, Boyer C.M, Whitaker R.S, Berchuck A, Wiener J.R, Weinberg J.B, Bast R.C. 1993. Tumor necrosis factor α as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor α expression. *Cancer Res.* 53: 1939-1944.
- Wu Y. & Zhou B.P. 2010. TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br. J. Cancer* 102 (4): 639-644.
- Wuerzberger-Davis S.M, Chang P-Y, Berchtold C, Miyamoto S. 2005. Enhanced G₂-M arrest by Nuclear Factor- κ B-dependent p21^{Waf1/Cip1} induction. *Mol. Cancer Res.* 3 (6): 345-353.
- Wysk M, Yang D.D, Lu H.T, Flavell R.A, Davis R.J. 1999. Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3763-3768.
- Xia M, Knezevic D, Vassilev L.T. 2011. p21 does not protect cancer cells from apoptosis induced by nongenotoxic p53 activation. *Oncogene* 30 (3): 346-355.
- Xia M, Leppert D, Hauser S.L, Sreedharan S.P, Nelson P.J, Krensky A.M, Goetzl E.J. 1996. Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane. *J. Immunol.* 156: 160-167.

- Xia P, Gamble J.R, Rye K-A, Wang L, Hu C.S.T, Cockerill P, Khew-Goodall Y, Bert A.G, Barter P.J, Vadas M.A. 1998. Tumor necrosis factor- α induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 14196-14201.
- Xie T.X, Huang F-J, Aldape K.D, Kang S-H, Liu M, Gershenwald J.E, Xie K, Sawaya R, Huang S. 2006. Activation of STAT3 in human melanoma promotes brain metastasis. *Cancer Res.* 66 (6): 3188-3196.
- Xie T.X, Wei D, Liu M, Gao A.C, Ali-Osman F, Sawaya R, Huang S. 2004. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* 23 (20): 3550-3560.
- Xiong Y, Hannon G.J, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366: 701-704.
- Xu F, Carlos T, Li M, Sanchez-Sweetman O, Khokha R, Gorelik E. 1998. Inhibition of VLA-4 and up-regulation of TIMP-1 expression in B16BL6 melanoma cell transfected with MHC class I genes. *Clin. Exp. Metastasis* 16: 358-370.
- Xu S-Q. & El-Deiry W.S. 2000. p21^{WAF1/CIP1} inhibits initiator caspase cleavage by TRAIL death receptor DR4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269: 179-190.
- Yadav A, Kumar B, Datta J, Teknos T.N, Kumar P. 2011. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the Jak-STAT3-Snail signaling pathway. *Mol. Cancer Res.* 9 (12): 1658-1667.
- Yajima I, Kumasaka M.Y, Thang N.D, Goto Y, Takeda K, Lida M, Ohgami N, Tamura H, Yamanoshita O, Kawamoto Y, Furukawa K, Kato M. 2011. Molecular network associated with MITF in skin melanoma development and progression. *J. Skin Cancer.* Article ID 730170, 7 pages.
- Yamada K.M. & Araki M. 2001. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J. Cell Sci.* 114: 2375-2382.
- Yamada M, Yanaba K, Hasegawa M, Matsushita Y, Horikawa M, Komura K, Matsushita T, Kawasuji A, Fujita T, Takehara K, Steeber D.A, Tedder T.F, Sato S. 2005. Regulation of local and metastatic host-mediated anti-tumour mechanisms by L-selectin and intercellular adhesion molecule-1. *Clin. Exp. Immunol.* 143: 216-227.
- Yamaguchi H. & Condeelis J. 2007. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773: 642-652.
- Yamaguchi T, Naruishi K, Arai H, Nishimura F, Takashiba S. 2008. IL-6/sIL-6R enhances cathepsin B and L production via caveolin-1-mediated JNK-AP-1 pathway in human gingival fibroblasts. *J. Cell Physiol.* 217 (2): 423-432.
- Yamaura M, Mitsushita J, Furuta S, Kiniwa Y, Ashida A, Goto Y, Shang W.H, Kubodera M, Kato M, Takata M, Saida T, Kamata T. 2009. NADPH oxidase 4 contributes to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G₂-M cell cycle progression. *Cancer Res.* 69 (6): 2647-2654.
- Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. 2005. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci.* 96 (7): 379-386.
- Yan C, Han R. 1997. Suppression of adhesion-induced protein tyrosine phosphorylation decreases invasive and metastatic potentials of B16-BL6 melanoma cells by protein tyrosine kinase inhibitor genistein. *Invasion & Metastasis* 17: 189-198.
- Yan E.V, Kim S-j, Donovan E.L, Chen M, Gross A.C, Webster Marketon J.L, Barsky S.H, Glaser R. 2009. Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: implications for stress-related enhancement of tumor progression. *Brain Behav. Immun.* 23 (2): 267-275.

- Yan K, Tang Y, Habermehl G.K, Iczkowski K.A. 2010. Stable alterations of CD44 isoform expression in prostate cancer cells decrease invasion and growth and alter ligand binding and chemosensitivity. *BMC Cancer* 10 (16): 1-12.
- Yanase M, Tsukamoto T, Kumamoto Y. 1995. Cytokines modulate in vitro invasiveness of renal cell carcinoma cells through action on the process of cell attachment to endothelial cells. *J. Urology* 153: 844-848.
- Yang C.H, Fan M, Slominski A.T, Yue J, Pfeffer L.M. 2010. The role of constitutively activated STAT3 in B16 melanoma cells. *Int. J. Interferon, Cytokine and Mediator Res.* 2: 1-7.
- Yang H, Magilnick N, Ou X, Lu S.C. 2005. Tumour necrosis factor alpha induces co-ordinated activation of rat GSH synthetic enzymes via nuclear factor kappaB and activator protein-1. *Biochem J.* 391 (Pt 2): 399-408.
- Yasumura S, Lin W.C, Weidmann E, Hebda P, Whiteside T.L. 1994. Expression of interleukin 2 receptors on human carcinoma cell lines and tumor growth inhibition by interleukin 2. *Int. J. Cancer* 59 (2): 225-234.
- Ye Z, Shi M, Chan T, Sas S, Xu S, Xiang J. 2007. Engineered CD8⁺ cytotoxic T cells with fiber-modified adenovirus-mediated TNF- α gene transfection counteract immunosuppressive interleukin-10-secreting lung metastasis and solid tumors. *Cancer Gene Ther.* 14: 661-675.
- Yilmaz M. & Christofori G. 2010. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol. Cancer Res.* 8 (5): 629-642.
- You M, Flick L.M, Yu D, Feng G-S. 2001. Modulation of nuclear factor κ B pathway by Shp-2 tyrosine phosphatase in mediating the induction of interleukin (IL)-6 by IL-1 or tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 193 (1): 101-109.
- Yu H, Kortyleski M, Pardoll D. 2007. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature Rev Immunol.* 7: 41-51.
- Yu H. & Jove R. 2004. The STATs of cancer-new molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer* 4 (2): 97-105.
- Zaballos-Diego P, Garrido-Calvo A.M, Rodero-Garrido J, Ara-Martín M. 2001. Los tumores cutáneos faciales. *Medicina Integral* 37 (6): 270-278.
- Zabierowski S.E. & Herlyn M. 2008. Melanoma stem cells: The dark seed of Melanoma. *J. Clin. Oncol.* 26 (17): 2890-2894.
- Zamorano J, Wang H.Y, Wang R, Shi Y, Longmore G.D, Keegan A.D. 1998. Regulation of cell growth by IL-2: role of STAT5 in protection from apoptosis but not in cell cycle progression. *J. Immunol.* 160: 3502-3512.
- Zhang J, Johnston G, Stebler B, Keller E.T. 2001. Hydrogen peroxide activates NFkappaB and the interleukin-6 promoter through NFkappaB-inducing kinase. *Antioxid. Redox Signal* 3 (3): 493-504.
- Zhang Y, Fujita N, Tsuruo T. 1999. Caspase-mediated cleavage of p21^{Waf1/Cip1} converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene* 18: 1131-1138.
- Zhang Y, Harada A, Bluethmann H, Wang J.B, Nakao S, Mukaida N, Matsushima K. 1995. Tumor necrosis factor (TNF) is a physiologic regulator of hematopoietic progenitors cells: increase of early hematopoietic progenitors cells in TNF receptor p55-deficient mice in vivo and potent inhibition of progenitor cell proliferation by TNF-alpha in vitro. *Blood* 86 (8): 2930-2937.
- Zhang Y, Yang P, Wang X-F. 2014. Microenvironmental regulation of cancer metastasis by miRNAs. *Trends Cell Biol.* 24 (3): 153-160.

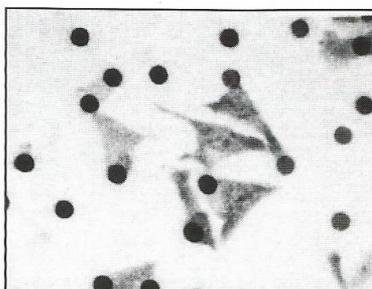
- Zhao X, Rong L, Zhao X, Li X, Liu X, Deng J, Wu H, Xu X, Erben U, Wu P, Syrbe U, Sieper J, Qin Z. 2012. TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J. Clin. Invest* 122 (11): 4094-4104.
- Zhou B.P, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee M.H, Hung M.C. 2001. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat. Cell. Bio.* 3 (3): 245-252.
- Zhu N, Lalla R, Eves P, La H Brown T, King A, Kemp E.H, Haycock J.W, MacNeil S. 2004. Melanoma cell migration is upregulated by tumour necrosis factor- α and suppressed by α -melanocyte-stimulating hormone. *Br. J. Cancer.* 90: 1457-1463.
- Zhu S, Wurdak H, Wang Y, Galkin A, Tao H, Li J, Lyssiotis C.A, Yan F, Tu B.P, Miraglia L, Walker J, Sun F, Orth A, Schultz PG, Wu X. 2009. A genomic screen identifies TYRO3 as a MITF regulator in melanoma. *PNAS* 106 (40): 17025-17030.
- Zhu Z, Sanchez-Sweetman O, Huang X, Wiltout R, Khokha R, Zhao Q, Gorelik E. 2001. Anoikis and metastatic potential of coudman S91 melanoma cells. *Cancer Res.* 61 (4): 1707-1716.
- Zidi I, Mestiri S, Bartegi A, Amor N.B. 2010. TNF- α and its inhibitors in cancer. *Med. Oncol.* 27: 185-198.
- Zohlhöfer D, Brand K, Schipek K, Pogatsa-Murray G, Schömig A, Neumann F-J. 2000. Adhesion of monocyte very late antigen-4 to endothelial vascular cell adhesion molecule-1 induces interleukin-1 β -dependent expression of interleukin-6 in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.* 20: 353-359.
- Zubiaga A.M, Munoz E, Huber B.T. 1992. IL-4 and IL-2 selectively rescue Th cell subsets from glucocorticoid-induced apoptosis. *J. Immunol.* 149 (1): 107-112.

VIII. ANEXO

69 | 4 | 01

Released May 2002

Pathobiology



S. Karger
Medical and Scientific
Publishers
Basel • Freiburg
Paris • London
New York • New Delhi
Bangkok • Singapore
Tokyo • Sydney

KARGER

Effect of IL-2 and IL-6 on Parameters Related to Metastatic Activity in a Murine Melanoma

A. García de Galdeano J.C. Cruz-Conde M.D. Boyano M.D. García-Vázquez
M.L. Cañavate

Departamento de Biología Celular y Ciencias Morfológicas, Universidad del País Vasco, Leioa, España

Key Words

B16 melanoma · IL-2 · IL-6 · Metastasis

Abstract

Previous results have shown that the metastatic colonization with B16F10 melanoma *in vivo* increased after *in vitro* treatment of the cells with IL-2 or IL-6. To further investigate the mechanisms underlying this effect, we have studied adhesion, invasion, and proliferation properties of B16 melanoma, using two sublines with different metastatic ability. Adhesion of tumor cells to Matrigel coats increased using IL-6, which also induced upregulation of VLA-4 expression in both sublines. Unexpectedly, invasion through Matrigel filters was almost completely inhibited by IL-6 and decreased in the presence of IL-2. Cell growth was not affected by these interleukins; however, IL-6 could partially overcome the proliferation blockade induced by stress conditions. Taken together, these results suggest that upregulation of adhesion properties and/or the protective effect induced by IL-6 could account for the enhancement of metastasis exerted by this interleukin.

Copyright © 2002 S. Karger AG, Basel

Introduction

In spite of the numerous efforts in the last decades, no effective treatment has been found against metastatic melanoma. Among the new therapeutic approaches, one of the most extensively investigated has been the use of cytokines as antitumoral agents [1]. However, cytokines, as regulatory factors of cell function, may be directly implicated in the acquisition and modulation of metastatic ability of melanoma cells, as suggested in several reports [2, 3].

Using a murine melanoma model (B16F10), our own results demonstrated that *in vitro* treatment with two cytokines, IL-2 and IL-6, enhanced the metastatic colonization of tumor cells *in vivo* [4, 5]. The pattern of metastatic enhancement was different: IL-6 induced a higher colonization in the liver and the lungs, whereas the effect of IL-2 treatment was more specific, i.e., metastases being recorded only in the liver. This suggests that the mechanisms underlying the prometastatic effect of IL-2 and IL-6 might be different as well.

In an attempt to clarify the possible mechanisms involved in the enhancement of colonization induced by IL-2 and IL-6, we have studied adhesion, invasion, and proliferation properties of two sublines of B16 melanoma with different metastatic abilities. To investigate the or-

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2002 S. Karger AG, Basel
1015-2008/01/0694-0230\$17.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/journals/pat

Dr. Alicia García de Galdeano
Departamento de Biología Celular y Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco
E-48940 Leioa (Spain)
Tel. +34 946012822, Fax +34 944648966, E-Mail gcpgasaa@lg.chu.es

gan-specific effect of IL-2, the adhesion molecule ICAM-1 was studied, as this protein has been involved in adhesion to hepatic cells [6].

Material and Methods

Cell Culture

B16 murine melanoma cells (sublines: B16F1 and B16F10) were grown in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). For subculture, cell monolayers were removed from culture flasks using a 2 mM solution of PBS-EDTA. CTLL-2 cells were used as controls for ICAM-1 and IL-2R β expression. Cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml) and 10% FCS.

Adhesion Assay

The plastic surface of 96-well microtiter plates was coated with 0.5 μ g Matrigel and then blocked with 2% BSA/PBS. The cells were washed with PBS, resuspended at 4×10^5 cells/ml in DMEM, and 100 μ l were added to each well. After 30 min, the wells were washed with warm PBS to remove unattached cells and stained with 0.5% crystal violet in 20% methanol. Then cells were lysed in ethanol, and the absorbance of lysates was measured at 540 nm with a spectrometer.

Invasion Assay

The invasive activity of tumor cells was assayed using a modification of the Matrigel method. Briefly, polycarbonate membranes (8 μ m pore size) at the bottom of the upper compartment of the transwells (6.5 mm, collaborative) were coated with 10 μ g/well Matrigel (collaborative). The cells were harvested and then 2×10^5 cells in 200 μ l of 0.1% DMEM-BSA were placed on the Matrigel-coated polycarbonate. Conditioned medium (700 μ l) was added to the lower compartment. After incubation of the transwells at 37°C for 24 h, the upper compartment was removed and the cells sticking to the lower surface of the membrane were counted under a microscope in 5 predetermined fields at a magnification of $\times 200$. In addition, the cells that invaded the Matrigel and had entered the lower compartment were allowed to grow continuously in the incubator for 1 week. Then the cells were fixed with 0.5% crystal violet in 20% methanol, and the colonies were counted.

Flow Cytometry

B16F10 cells obtained from semiconfluent cultures were washed in PBS and then 5×10^5 cells per sample were incubated with the first antibody [antimouse VLA-4 ($\alpha 4$, Chemicon), ICAM-1 (RD Systems) and IL-2R β (Endogen)] diluted in 0.5% PBS-BSA solution for 30 min at 4°C. After two washes in PBS-BSA, the cells were incubated with FITC-conjugated rabbit antirat IgG (Dako) (1:30 dilution) for 30 min at 4°C. Then, the cells were washed again (three washes), resuspended in 0.5 ml PBS and analyzed using a Coulter EPICS 752. The percentage of positive cells and the fluorescence intensity were determined by the Immunotest analysis (Coulter). Nonspecific staining was determined from the cells incubated with a rat IgG2 (Boehringer Ingelheim). For ICAM-1 and IL-2R β expression, CTLL-2 cells were included as controls.

Proliferation Assay

Cell proliferation was determined in 96-well microplates. To test the effect of interleukins on cell growth, serial dilutions of IL-2 or IL-6 were performed before seeding the cells ($1-5 \times 10^3$ cells/well) in a final volume of 200 μ l of DMEM supplemented with 1 or 10% FCS. Cultures were incubated for 24, 48 and 72 h and the number of cells per well was revealed by the XTT assay (Boehringer Mannheim). To study the role of these factors under stress conditions, the cells previously treated with IL-2 (500 U/ml, 24 h) or IL-6 (200 U/ml, 48 h) were cultured without serum or in the presence of actinomycin-D for 24 and 48 h. After culture, the cells were recovered, frozen and stored at -20°C until tested.

Colony Assay

For colony formation, cells cultured with IL-2 (24 h) and IL-6 (48 h) were obtained and then seeded in 24-well macroplates (100 cells/well) in 1 ml of DMEM + 10% FCS. Alternatively, the assay was performed with untreated cells but in the presence of IL-2 or IL-6. Seven days later, the number of colonies was determined by crystal violet staining.

Determination of Soluble IL-2 and IL-6

B16 cells were cultured in DMEM supplemented with 1 or 5% FCS and in the presence of PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma) at a concentration of 10, 100 or 1,000 nM. Supernatants from nonstimulated or PMA-stimulated cultures were collected and immediately frozen and stored at -20°C until tested for their content in IL-2 or IL-6. IL-2 activity was determined by the CTLL-2 assay. The presence of IL-6 was assessed by immunoassay using a commercial kit for murine IL-6 (QuantikineTM, RD Systems).

Results

Modulation of Cell Adhesion and Invasion

Adhesion to Matrigel was not affected when the cells were seeded and cultured in microplate wells for 1 h in the presence of IL-2 or IL-6 (fig. 1). However, when the cells were treated with IL-6 prior to the adhesion assay, an increase in the number of B16 cells attached to Matrigel was observed compared with nontreated cells. Unexpectedly, the invasion activity of B16 cells (fig. 2) was clearly decreased when they were cultured in IL-2 or IL-6, this effect being more evident in the B16F10 subline. In fact, IL-6 treatment of B16F10 induced a loss of the invasion potential of the cells.

Cell Surface Expression: VLA-4, ICAM-1, IL-2R β

Flow cytometry analysis of VLA-4 expression on B16 melanoma cells showed that this integrin was present in almost every cell but with a low expression per cell, as indicated by the intensity of fluorescence. Culture in the presence of IL-6 induced an increment in this parameter on the cells of both sublines, B16F1 and B16F10 (table 1). The expression of ICAM-1 and IL-2R β was also analyzed

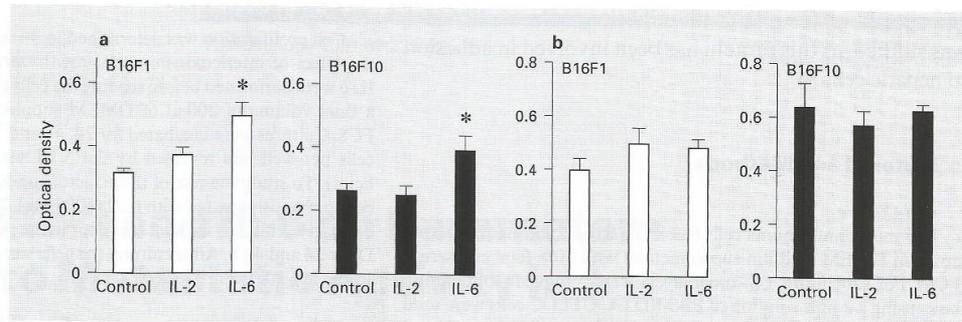


Fig. 1. Adhesion assay of B16 melanoma cells to Matrigel-coated wells. **a** The adhesion assay was performed with cells previously cultured in the presence of IL-2 (500 U/ml, 24 h) or IL-6 (200 U/ml, 48 h). **b** The adhesion assay was performed with nontreated cells in the presence of IL-2 or IL-6. To assess the level of statistical significance Student's t test was used (* $p < 0.05$).

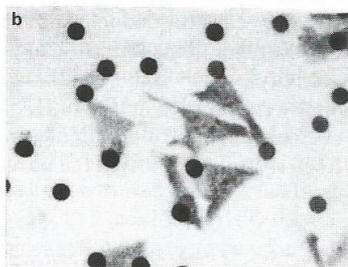
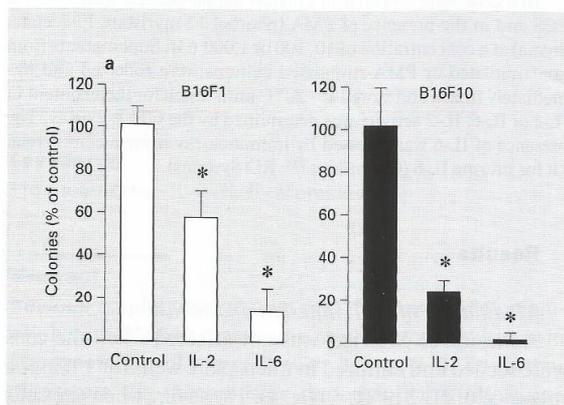


Fig. 2. Invasion of B16 melanoma cells into Matrigel. The cells were placed in the upper compartment of Matrigel transwells. After 24 h of incubation, the upper compartments were removed and the cells that had migrated were incubated for a further week. **a** Results are expressed as number of colonies/well. **b** Cells which have migrated through the filter are shown. To assess the level of statistical significance Student's t test was used (* $p < 0.05$).

Table 1. Modulation of VLA-4 expression on B16 melanoma cells by culture in the presence of IL-6

IL-6, U/ml	B16F1		B16F10	
None	93.90 ¹	30.1 ²	99.88	35.2
200	98.70	42.2	99.99	49.3
2,000	97.70	48.0	99.99	54.6

B16 cells were cultured for 48 h with IL-6 prior to the immunofluorescence assay.

¹ Percentages of cells positive for VLA-4.

² Mean fluorescence intensity was determined by flow cytometry.

in B16 melanoma cells, recording a small percentage of positive cells for both antigens (14 and 8%, respectively) compared with CTLL-2 cells (93 and 22%, respectively) which were used as controls. No difference was observed in regard to the metastatic potential. When the cells were treated with IL-2 (table 2), the expression of IL-2R β slightly increased; however, ICAM-1 expression became almost unnoticeable.

Cell Growth: Proliferation and Clonogenic Activity

The effect of IL-2 and IL-6 on the proliferation of B16 melanoma cells was determined by an XTT assay at 24, 48 and 72 h of culture. None of the different doses of both interleukins induced a significant change in the proliferation rate. The histograms in figure 3 show that the growth of both metastatic sublines B16F1 and B16F10 remained

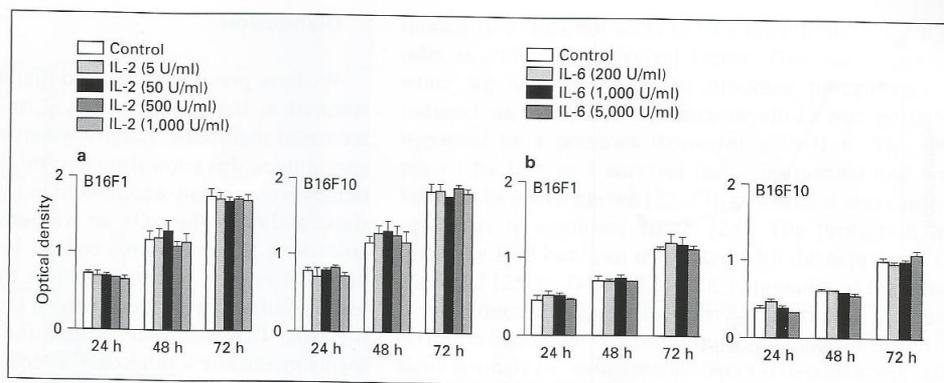


Fig. 3. Proliferative activity of B16F1 and B16F10 cells cultured in the presence of several doses of IL-2 (a) or IL-6 (b). After incubation for 24, 48 or 72 h, the number of cells was determined by the XTT assay.

unaffected, even at high doses of IL-2 or IL-6. Similar results were recorded when cultures were performed at a low concentration of FCS (1%) (data not shown). Results obtained in the colony formation assay confirmed the absence of effect of IL-2 and IL-6 on cell growth (table 3).

Effect of IL-2 and IL-6 on B16 Cells under Stress Conditions

IL-2 (500 U/ml, 24 h)- and IL-6 (2,000 U/ml, 48 h)-treated cells were serum-deprived or cultured in the presence of actinomycin-D in order to assess the role of these interleukins in the resistance of the tumor cells to unfavorable conditions. The results expressed in figure 4 show that IL-6 induced a partial reversion of the inhibition on cell proliferation caused by actinomycin-D in both sublines. This reversion, however, disappeared when the dose of actinomycin-D was higher than $0.1 \mu\text{M}$. No change was recorded when the cells were cultured in the absence of serum.

Induction of IL-2 and IL-6 Production

In order to induce a release of soluble IL-2 or IL-6, B16F1 and B16F10 cells were cultured in the presence of PMA for 24, 48 and 72 h and at different concentrations of FCS. Results from the CTLL-2 assay indicated the presence of IL-2 activity in B16 cell supernatants (fig. 5a); however, it could be demonstrated that the proliferation of CTLL-2 cells was due to the amount of PMA present in the culture medium (fig. 5b). Figure 6 shows the results obtained in the ELISA assay for IL-6 determination: B16F1 and B16F10 cells do not synthesize this interleukin either constitutively or after PMA induction.

Table 2. Modulation of ICAM-1 and IL-2R β expression on B16 melanoma cells by culture in the presence of IL-2

	Control	IL-2, 500 U/ml
ICAM-1	14.07 ± 5.33	4.33 ± 1.08
IL-2R β	8.70 ± 2.63	12.55 ± 3.12

B16 cells were cultured for 24 h with IL-2 prior to the immunofluorescence assay. Results expressed as percentages of cells positive for antigen expression were determined by flow cytometry.

Table 3. Clonogenic activity of metastatic variants of B16 melanoma cultured in the presence of IL-2 or IL-6

Treatment, U/ml	B16F1	B16F10
IL-2	0	30 (21–32) ¹
		39 (33–42) ²
	500	24 (18–27)
		28 (22–39)
IL-6	0	23 (21–25) ¹
		43 (40–47)
	200	25.3 (23–26)
	2,000	22 (20–25)
	53 (38–56)	
	55 (45–59)	
	37 (36–39)	
	36.6 (32–39)	

¹ Cells were seeded in macroplates (200 cells/well) and 7 days later colonies were counted.

² Cells were treated for 24 h with IL-2 prior to the colony assay. Results are expressed as mean and range.

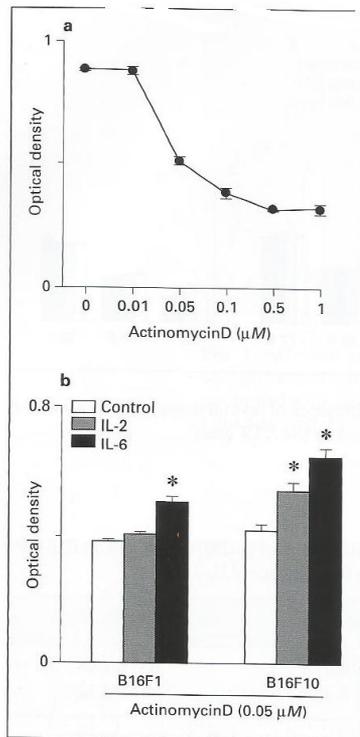


Fig. 4. Effect of IL-2 and IL-6 on the growth inhibition induced by actinomycin-D. **a** Effect of actinomycin-D on B16 cells as determined by the XTT assay. **b** After treatment with IL-2 (500 U/ml, 24 h) or IL-6 (200 U/ml, 48 h), B16 cells were cultured for 24 h in the presence of 0.05 μM actinomycin-D and cell proliferation was determined. To assess the level of statistical significance, Student's t test was used (* p < 0.05).

Discussion

We have previously reported that B16 melanoma cells cultured in the presence of IL-2 or IL-6 developed an increased metastatic activity when inoculated into syngeneic mice. Invasion through synthetic Matrigel membranes is commonly accepted to correlate with the metastatic ability of the cells, so we performed an invasion assay with B16 melanoma cells in the presence of these factors. Contrary to what could be expected, both interleukins induced a clear decrease in the invasion ability of the cells. This was more evident for IL-6 and when the highly metastatic subline of B16 melanoma, B16F10, was used. This result disagrees with the few data available that point to an enhancing effect of these interleukins on invasion. According to this, IL-2 has been reported to enhance migration of lymphocytes through basal membranes [7, 8], although it does not seem to affect invasion of melanoma [9] or other tumor cells [10]. IL-6 has been reported to stimulate invasion in physiological processes as cytotrophoblast invasion [11] and in tumors as lymphomas [12] through the production of metalloproteinases (MMPs). However, in other tumor cells, IL-6 has been shown to enhance the synthesis of the inhibitor of MMPs, TIMP-1 [13]. Taking into account that the overexpression of TIMP-1 in B16F10 cells has been correlated with the suppression of the invasion ability [14, 15], we can hypothesize that the downregulation of invasion induced by IL-6 on B16 melanoma cells could be due to the effect of this interleukin on TIMP-1 production.

In regard to adhesion, addition of IL-2 or IL-6 to the culture medium did not change the amount of B16 melanoma cells, which remained attached to the Matrigel-

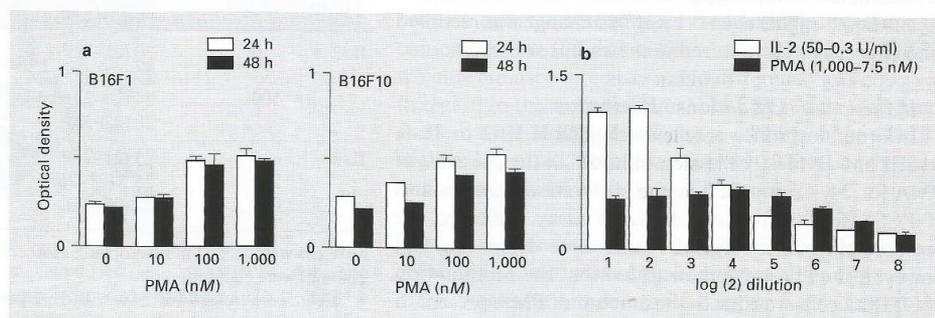


Fig. 5. PMA induction of IL-2 production in B16 melanoma cells. **a** Supernatants from cultures of B16F1 and B16F10 cells stimulated with PMA were collected and the presence of IL-2 was determined by the CTLL-2 bioassay. **b** Histograms showing the effect of PMA on the proliferation of CTLL-2 cells.

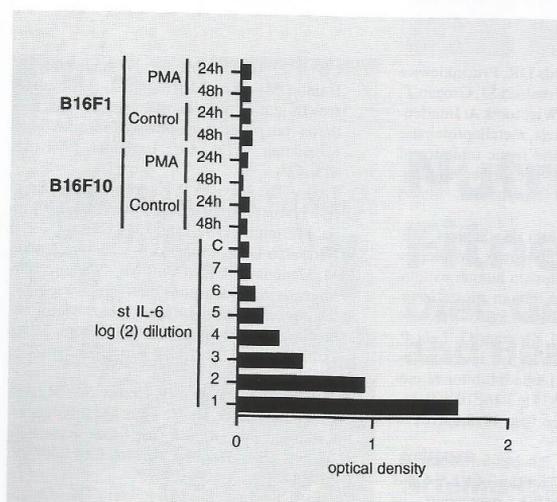


Fig. 6. PMA induction of IL-6 production in B16 melanoma cells. The presence of IL-6 in the supernatants from B16F1 and B16F10 cultures stimulated with PMA was determined by ELISA.

coated wells; however, IL-6-pretreated cells showed an increment in the adhesion rate. This increment could be due to the higher expression of the VLA-4 molecule which was enhanced both in B16F1 and B16F10. VLA-4 expression has been correlated with metastatic colonization both in the lungs [16] and the liver [6]. Thus, the upregulation of this adhesion molecule could account for the prometastatic effect induced by IL-6. In addition to VLA-4, ICAM-1 and IL-2R β were also studied. The expression of ICAM-1, an adhesion molecule of the immunoglobulin supergene family which has been correlated with a higher malignancy of melanoma [17, 18], has been proposed to be upregulated by IL-2 in lymphocytes [19, 20] and to be associated with the expression of IL-2 receptor [21]. Cytometric determinations showed that B16F1 and B16F10 cells express a low level of both receptors. After IL-2 treatment, the expression of IL-2 β slightly increased, but ICAM-1 expression became lower; so, it can be concluded that ICAM-1 does not seem to be involved in the prometastatic effect of IL-2 on B16 cells.

Cell growth and its modulation by IL-2 and IL-6 was also examined. Cell proliferation under normal culture conditions remained unaffected in the presence of IL-2 or IL-6 for both B16F1 and B16F10. Similarly, no effect was recorded when the cells were cultured in 1% FCS or when limited dilutions of culture cells were performed. Al-

though IL-6 does not seem to be a growth factor for B16 cells, it could be a survival factor. This was suggested when we observed that the blockade of cell growth induced on B16 cells by actinomycin-D was partially bypassed by a previous treatment with IL-6. The role played by IL-6 as a survival factor on normal and leukemic cells is well known [22, 23]; however, it also confers resistance to cytotoxic agents [24]. The protection induced by IL-6 has been correlated with the expression of the Bcl-2 [25] or Bcl-X_L [26], the expression of the latter being induced by IL-6 constitutive activation of the transcription factor Stat-3. Considering that overexpression of Bcl-2 strongly promotes metastasis of B16 melanoma cells [27] and that suppression of Stat-3 induces an antitumor effect on these cells [28], it can be speculated that IL-6 could be a survival factor for B16 melanoma cells through the upregulation of antiapoptotic proteins of the Bcl family. Moreover, the antideath effect of IL-6 has also been associated with an accumulation of TIMP-1 [26]; thus, the invasion and resistance induced by IL-6 could also be modulated by the same mechanism: the regulation of TIMP-1 expression.

Finally, we tested the possibility that B16 melanoma cells themselves could be producers of IL-2 or IL-6 and so use these factors in an autocrine way, as reported for other melanoma cells [29, 30]. However, this does not seem to apply for B16 melanoma: even when cells were stimulated with PMA, neither B16F10 nor B16F1 released soluble IL-2 or IL-6.

From these results, it can be concluded that the prometastatic effects of IL-2 or IL-6 on B16 melanoma cells are not related to an enhancement of the invasive ability of the cells; on the contrary, the invasion rate developed by interleukin-treated cells was clearly lower. Nevertheless, at least for IL-6, the inhibitory effect on invasion might be counteracted by the upregulation of cell adhesion together with the possible role of IL-6 as a survival factor for B16 melanoma cells.

Acknowledgements

We are grateful to Cristina Otamendi for photographic processing and Milagros Portuondo for technical assistance. This work was supported by grant UPV 075-327-EA205/96 awarded by the University of the Basque Country.

References

- 1 Falkson CI: Treatment of metastatic malignant melanoma. *Anticancer Drugs* 1995;6:709-716.
- 2 Mattei S, Colombo MP, Melani C, Silvani A, Parmiani G, Herlyn M: Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *Int J Cancer* 1994;56:853-857.
- 3 Lázár-Molnár E, Hegyesi H, Tóth S, Falus A: Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 2000;12:547-554.
- 4 Boyano MD, García de Galdeano A, Smith-Zubiaga I, Cañavate ML: IL-2 treatment of B16F10 melanoma cells stimulates metastatic colonization in the liver. *Anticancer Res* 1997;17:1135-1142.
- 5 García de Galdeano A, Boyano MD, Smith-Zubiaga I, Alvarez A, Cantón I, Cañavate ML: Involvement of interleukin-6 in the biology and metastatic activity of B16F10 melanoma cells. *Eur Cytokine Netw* 1998;9:187-192.
- 6 Kemperman H, Driessens M, La Riviere G, Meijne AML, Roos E: The role of integrins and integrin activation in liver metastasis. *Invasion Metastasis* 1994;14:98-108.
- 7 Wilkinson PC, Newman I: Chemoattractant activity of IL-2 for human lymphocytes: A requirement for the IL-2 receptor β -chain. *Immunology* 1994;82:134-139.
- 8 Xia M, Leppert D, Hauser SL, Sreedharan SP, Nelson PJ, Krensky AM, Goetzl EJ: Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane. *J Immunol* 1996;156:160-167.
- 9 Ladanyi A, Nagy JO, Jeney A, Timar J: Cytokine sensitivity of metastatic human melanoma cell lines - simultaneous inhibition of proliferation and enhancement of gelatinase activity. *Pathol Oncol Res* 1998;4:108-114.
- 10 Pedersen PH, Ness GO, Engebraaten O, Bjerkvig R, Lillehaug JR, Laerum OD: Heterogeneous response to the growth factor [EGF, PDGF (bb), TGF- α , bFGF, IL-2] on glioma spheroid growth, migration and invasion. *Int J Cancer* 1994;56:255-261.
- 11 Meisser A, Cameo P, Islami D, Campana A, Bischof P: Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. *Mol Hum Reprod* 1999;5:1055-1058.
- 12 Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiewicz C, Zhang MC, Guo D, Urbanski SJ, Grogan T, Marquez LA, Janowska-Wieczorek A: Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1999;94:2080-2089.
- 13 Wang M, Fudge K, Rhim JS, Stearns ME: Cytokine regulation of the matrix metalloproteinases and their inhibitors in human papillomavirus-18 transformed human prostatic tumor cell lines. *Oncol Res* 1996;8:303-315.
- 14 Khokha R, Zimmer MJ, Graham G, Lala P, Warehouse P: Suppression of invasion by inducible expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in B16F10 melanoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1017-1022.
- 15 Xu F, Carlos T, Li M, Sanchez-Sweetman O, Khokha R, Gorelik E: Inhibition of VLA-4 and up-regulation of TIMP-1 expression in B16BL6 melanoma cells transfected with MHC class I genes. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:358-370.
- 16 Garofalo A, Chirivi RG, Foglieni C, Pigott R, Mortarini R, Martin-Padura I, Anichini A, Gearing AJ, Sanchez-Madrid F, Dejana E, Giavazzi R: Involvement of the very late antigen 4 integrin on melanoma in interleukin 1-augmented experimental metastases. *Cancer Res* 1995;55:414-418.
- 17 Johnson JP, Stade BG, Holzmann B, Schwäble W, Riethmüller G: De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:641-644.
- 18 Natali P, Nicotra MR, Cavaliere R, Bigotti A, Romano G, Temponi M, Ferrone S: Differential expression of intercellular adhesion molecule 1 in primary and metastatic melanoma lesions. *Cancer Res* 1990;50:1271-1278.
- 19 Buckle AM, Hogg N: Human memory T cells express intercellular adhesion molecule-1 which can be increased by interleukin 2 and interferon- γ . *Eur J Immunol* 1990;20:337-341.
- 20 Triozzi PL, Eicher DM, Rinehart JJ: Modulation of adhesion molecules on human large granular lymphocytes by interleukin-2 in vivo and in vitro. *Cell Immunol* 1992;140:295-303.
- 21 Burton J, Goldman CK, Moos M, Waldmann TA: Association of intercellular adhesion molecule 1 with the multichain high-affinity interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7329-7333.
- 22 Liu J, Li H, De Tribolet N, Jauferally R, Hamou MF, Van Meir WG: IL-6 stimulates growth and inhibits constitutive, protein synthesis-independent apoptosis of murine B-cell hybridoma 7TD1. *Cell Immunol* 1994;155:428-435.
- 23 Teague TK, Marrack P, Kappler JW, Vella AT: IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *J Immunol* 1997;158:5791-5796.
- 24 Dedoussis GVZ, Mouzaki A, Theodoropoulou M, Menounos P, Kyrtonis MC, Karameris A, Maniatis A: Endogenous interleukin 6 conveys resistance to cis-diamminedichloroplatinum-mediated apoptosis of the K562 human leukemic cell line. *Exp Cell Res* 1999;249:269-278.
- 25 Ward NS, Waxman AB, Homer RJ, Mantell LL, Einarsson O, Du Y, Elias JA: Interleukin-6-induced protection in hyperoxic acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:535-542.
- 26 Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS, Jove R: Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999;10:105-115.
- 27 Takaoka A, Adachi M, Okuda H, Sato S, Yawata A, Hinoda Y, Takayama S, Reed JC, Imai K: Anti-cell death activity promotes pulmonary metastasis of melanoma cells. *Oncogene* 1997;14:2971-2977.
- 28 Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, Coppola D, Jaroszeski M, Dalton W, Jove R, Yu H: Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res* 1999;59:5059-5063.
- 29 García-Vázquez MD, Boyano MD, Cañavate ML, Gardeazabal J, García de Galdeano A, López-Michelena T, Ratón JA, Izu R, Díaz-Ramón JL, Díaz-Pérez JL: Interleukin-2 enhances the growth of human melanoma cells derived from primary but not from metastatic tumours. *Eur Cytokine Netw* 2000;11:654-661.
- 30 Lu C, Kerbel RS: Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression. *J Cell Biol* 1993;120:1281-1288.

