

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA  
FACULTAD DE CIENCIAS



*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética*

Papel dual del receptor de dioxina en el crecimiento  
y la metástasis del melanoma

Memoria de Tesis Doctoral presentada por

Dña. María Contador Troca

Enero 2014





Universidad de Extremadura

**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA  
Y BIOLOGIA MOLECULAR  
Y GENETICA**

**Unidad de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias**

PEDRO M. FERNANDEZ SALGUERO, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura,

**CERTIFICA:**

Que la presente Tesis Doctoral, titulada " Papel dual del receptor de dioxina en el crecimiento y la metástasis del melanoma", de la que es autora Dña. María Contador Troca ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura.

Que revisada la memoria presentada, el Director del trabajo considera que posee las condiciones requeridas para un trabajo de Tesis Doctoral. Por todo ello,

**AUTORIZA:**

Su presentación y defensa pública frente al tribunal designado al efecto de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 778/1998 de 30 de Abril.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Badajoz a 21 de Noviembre de 2013.

Fdo. Pedro M. Fernández Salguero



## RECONOCIMIENTOS

Para la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral hemos recibido ayuda de diferentes personas, Departamentos e Instituciones. Por ello, deseamos expresar nuestro agradecimiento:

Al Dr. Alberto Álvarez Barrientos por su asesoramiento en gran parte de la experimentación realizada.

Al Dr. Xosé Bustelo, por su colaboración en experimentos de extravasación.

Al Dr. Francisco Real, por su colaboración en la inmortalización de fibroblastos.

Al Dr. José Carlos García Borrón, por proporcionarnos diversas líneas celulares de melanoma humano.

Al Dr. Javier Oliver, por su colaboración en experimentos de seguimiento tumoral in vivo.

Al Dr. Javier Sáez de Santamaría por poner a nuestra disposición todo el equipamiento técnico del Área de Patología del Hospital Infanta Cristina.

A la Dra. Inmaculada Fernández por su colaboración en los experimentos con muestras de melanomas humanos.

María Contador Troca ha contado con la financiación de una beca de formación de personal investigador FPI del Ministerio de Educación y Ciencia.

### FINANCIACION:

Este trabajo ha sido financiado con proyectos del Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2005-00130), de la Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer RTICC (RD06/0020/1016) y del Plan de Ayuda a grupos de investigación de la Vicepresidencia Segunda y Consejería de Economía, Comercio e Innovación de la Junta de Extremadura (GRU07/007 y GRU08/012).





## INDICE

LA PIEL .....	15
EL MELANOMA .....	16
Histogénesis.....	17
Formas del melanoma.....	19
Diagnóstico del melanoma.....	21
Histopatología del melanoma .....	21
Estadaje del melanoma .....	22
Bases moleculares del melanoma.....	24
Células madre en melanoma.....	25
EL RECEPTOR DE DIOXINA (AHR).....	26
Estructura proteica del receptor de dioxina.....	29
Mecanismos de activación y de localización celular de AhR.....	31
AHR Y CANCER.....	36
Mecanismos por los que AhR puede participar en cáncer.....	37
Activación metabólica o detoxificación.....	38
Inhibición de supresores tumorales p53 y BRCA1 .....	38
Efecto sobre las células madre.....	38
Efecto sobre el ciclo celular.....	39
Función anti-apoptótica.....	39
Pérdida de la inhibición por contacto en la interacción célula-célula.....	39
Alteración de la remodelación de la matriz celular y la interacción célula-matriz.....	40
Regulación de la angiogénesis.....	40
Modulación de la inflamación.....	40
ALDEHIDO DESHIDROGENASA (ALDH1A1).....	41
ALDH1a1 y AhR.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
1. Cultivo de líneas celulares.....	47
2. Modelos animales.....	47
3. Producción de líneas celulares conteniendo diferentes niveles de expresión de AhR y de Aldh1a1 por transducción retroviral.....	47
4. Transfección de células en cultivo.....	49
5. Inmunocitoquímica.....	49
6. Cultivos primarios de endotelio de aorta de ratón.....	50

7. Medida de los niveles de expresión génica. ....	50
8. Western blot. ....	52
9. Inyección de células tumorales en ratón (Ensayo de xenografts) .....	54
10. Inducción de metástasis y extravasación.....	55
11. Seguimiento de metástasis tumoral in vivo.....	55
12. Ensayos de invasión en matrigel y de migración en colágeno.....	56
13. Ensayo de herida en placa. ....	56
14. Ensayos de formación de clones.....	56
15. Formación de melanoesferas.....	57
16. Inmunohistoquímica. ....	57
17. Medida de la actividad aldehído deshidrogenasa. ....	58
18. Medida de la activación de integrina $\beta 1$ .....	58
19. Construcción de microarrays de tejido (TMA).....	59
20. Análisis de células con fenotipo cancer stem-like por citometría de flujo .....	59
21. Separación de células activadas por fluorescencia.....	60
22. Análisis del ciclo celular mediante el método de Vindelof. ....	60
23. Medida de la proliferación celular. ....	60
24. Tratamiento estadístico de los datos.....	60
CAPÍTULO I .....	63
OBJETIVOS.....	65
RESULTADOS I .....	67
1. Producción y caracterización de líneas de melanoma murino con diferentes niveles de AhR .....	69
2. El silenciamiento de AhR promueve el crecimiento y la metástasis tumoral.....	71
3. El silenciamiento de AhR provoca una mayor migración e invasión de células de melanoma. ....	73
4. El fenotipo inducido por la deficiencia en AhR sugiere una transición epitelio-mesénquima. ....	75
5. AhR modula la expresión de proteínas de señalización implicadas en adhesión y migración celular.....	77
6. La depleción de los niveles de AhR aumenta el número de células con fenotipo cancer stem. ....	78
7. AhR actúa como promotor tumoral cuando se expresa en el estroma.....	80
8. Las líneas de melanoma humano más invasivas tienen una expresión reducida de AHR. ....	84
9. Los melanomas humanos avanzados tienen una expresión reducida de AHR.....	86



DISCUSION .....	91
CAPÍTULO II.....	99
OBJETIVOS .....	101
RESULTADOS II.....	103
1.- AhR controla la expresión y la actividad de Aldh1a1 en líneas de melanoma murino y humano. ....	105
2. El silenciamiento de ALDH1a1 provoca una menor migración e invasión .....	108
3.- La supresión de Aldh1a1 reduce el número de células con características <i>de célula madre tumoral</i> . ....	111
4.-La supresión de la actividad Aldh1a1 retrasa el crecimiento y la metástasis de células de melanoma.....	113
DISCUSION II .....	117
CONCLUSIONES .....	123
BIBLIOGRAFIA .....	127



## ABREVIATURAS

**AhR:** *Aryl hydrocarbon (dioxin) Receptor*, Receptor de dioxina

**ARNT:** Translocador nuclear de AhR

**Hsp90:** Proteína de estrés de 90 KDa; *Heat Shock Protein 90*

**TCDD:** 2,3,7,8-tetraclorodibenzo[*p*]dioxina

**β-ME:** beta-mercaptoetanol

**BSA:** *bovine serum albumin*; albúmina de suero bovino

**dNTPs:** desoxi-nucleótidos tri-fosfato

**EDTA:** *ethylenediaminetetraacetic acid*; ácido etilen-diamino-tetraacético

**EGTA:** *ethylene glycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*; ácido etilen-glicol-bis-(β-aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraacético

**PBS:** *phosphate buffer saline*; tampón fosfato salino

**PCR:** *polymerase chain reaction*; reacción en cadena de la polimerasa

**RT:** *reverse transcription*; transcripción reversa

**SDS:** *sodium dodecyl sulfate*; dodecil sulfato sódico

**SDS-PAGE:** *sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel*

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametil etilendiamino

**Tris:** tris(hidroximetil)aminometano

**EMT:** *Epithelial to mesenchymal transition*, transición epitelio-mesenquima

**CSC:** *Cancer stem cell*, células madre cancerígenas.

**TGF-β:** *Transforming Growth Factor beta*; factor de crecimiento transformante beta.

**HGF:** *hepatocyte growth factor*; factor de crecimiento de hepatocitos

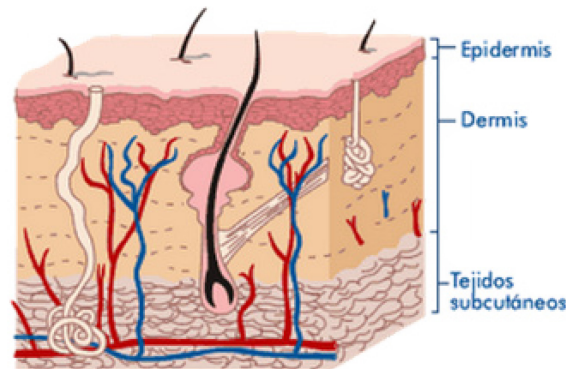


## INTRODUCCIÓN



## LA PIEL

La piel constituye el mayor órgano del cuerpo humano. Su principal función es la de actuar como barrera protectora del organismo frente al medio exterior y se divide principalmente en dos capas: la epidermis y la dermis (Prost-Squarcioni 2006).



*Figura 1.1. Estructura de la piel*

La epidermis, capa más externa de la piel, se divide a su vez en diferentes estratos que son, de más externo a más interno: estrato córneo, estrato granular, estrato espinoso y membrana basal. Los principales componentes celulares de la epidermis son los queratinocitos. Estos llevan a cabo un proceso de migración desde la membrana basal hasta el estrato córneo, durante el cual pierden gran parte del contenido celular.

En la membrana basal, en una proporción de 1:5 a 1:10 con respecto a los queratinocitos, encontramos los melanocitos. Los melanocitos son las células encargadas de producir el pigmento melanina que, además de dar color a la piel, la protege de las radiaciones ultravioletas. Esta melanina es distribuida por los melanocitos hasta los queratinocitos, a los cuales rodean mediante la emisión de dendritas (Kanitakis 2002). Otros tipos celulares que encontramos en la epidermis son las células de Langerhans, linfocitos y las células de Merckel

Justo debajo de la epidermis encontramos la dermis, con un grosor de 20 a 30 veces mayor que la primera y a la que proporciona soporte, nutrición y defensa. Está

compuesta por diferentes tipos de proteínas entre las que se incluyen el colágeno (componente mayoritario), la elastina y los proteoglicanos. Como tipo celular predominante se encuentran los fibroblastos, además de células endoteliales que forman los vasos sanguíneos y células del sistema inmune como macrófagos y linfocitos.

## **EL MELANOMA**

El melanoma se define como la neoplasia originada por la malignización de las células productoras de melanina o melanocitos. La mayoría de los melanomas se localizan en la piel, y menos frecuentemente en las mucosas. No obstante, dado el origen embrionario de los melanocitos (derivan de la cresta neural), estos pueden observarse en otras localizaciones tales como la retina y las meninges.

Al desarrollo del melanoma contribuyen factores genéticos, familiares y ambientales. Los factores familiares y genéticos incluyen el fototipo de piel, el número de nevus melanocíticos, la presencia de nevus atípicos y la historia familiar de cáncer cutáneo. Dentro de los factores ambientales, que están también relacionados con los factores familiares, se incluyen la exposición a la radiación ultravioleta, la reducción de la capa de ozono, las enfermedades y/o medicaciones que impliquen inmunosupresión y el estatus económico.

La radiación solar ultravioleta es el factor etiopatogénico más importante en el desarrollo del melanoma maligno (Armstrong and Krickler 2001). Esta conclusión está apoyada por diversas observaciones que muestran una mayor frecuencia en personas con fototipos de piel claros, especialmente si han emigrado hacia zonas de clima soleado, y entre aquellas que tienen exposiciones solares intermitentes e intensas. La fotosensibilidad con desarrollo de quemaduras solares de rápida aparición en ausencia de pigmentación, que se observa en personas de fototipo claro, está determinada por polimorfismos en el receptor de la melanocortina 1 (MCR1). En dichas personas, la presencia de eumelanina (pigmento marrón) o de feomelanina (pigmento rojo o amarillo) viene determinada por variantes en el gen del receptor de la melanocortina. De hecho, la feomelanina puede tener un efecto amplificador del daño mutagénico de la radiación ultravioleta, contribuyendo al aumento del riesgo de cáncer cutáneo que se observa en los individuos pelirrojos.



Los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de melanoma son la presencia de antecedentes familiares, un número elevado de nevus e historia de melanoma previo. La existencia de casos de melanoma familiar representa un factor de riesgo importante para el desarrollo de la enfermedad. En un porcentaje de casos el melanoma es hereditario y se encuentra asociado con mutaciones en el gen *CDKN2A*, y menos frecuentemente, en el gen *CDK4*. El gen *CDKN2A* codifica para 2 proteínas de supresión tumoral, p16 (P16/INK4A) y p14 (P14/ARF). El desarrollo de melanoma familiar asociado a estas mutaciones probablemente representa menos del 1% del total de casos de melanoma. La existencia previa de la enfermedad incrementa el riesgo relativo de desarrollar un segundo melanoma unas 70 veces con respecto al primero. Los nevus melanocíticos congénitos y los nevus múltiples adquiridos representan también un factor de riesgo importante dada su posible evolución hacia melanoma maligno.

Otros factores de riesgo que se consideran relevantes incluyen agentes químicos, físicos e inmunológicos. El desarrollo de melanoma es más frecuente y más agresivo en los pacientes sometidos a inmunosupresión. La causa de la inmunosupresión es variable y puede incluir inmunodeficiencias primarias, linfomas, tratamientos inmunosupresores o la infección por el virus de inmunodeficiencia humana.

## **Histogénesis**

Los melanocitos derivan de la cresta neural y durante el desarrollo embrionario se diferencian hacia melanoblastos, los cuales migran hacia la presunta piel. Tras alcanzar la dermis, los melanoblastos migran a la epidermis o al folículo piloso y bien se diferencian hacia melanocitos epidérmicos o foliculares, o bien se quedan en la dermis y se diferencian hacia nevo-melanocitos. Las funciones de los melanocitos epidérmicos son la de producir melanina y la de transferirla a los queratinocitos que los rodean. Además de producir melanina, los melanocitos dan lugar a uno de los tumores más frecuentes del organismo: los nevus melanocíticos. Según estudios clínicos, histopatológicos, inmunológicos y genéticos, existen 5 niveles de progresión desde el nevus melanocítico hasta el melanoma metastático (Tabla I). El modelo de progresión de lesiones melanocíticas se basa en la acumulación de alteraciones genéticas que están relacionadas con los diferentes niveles de diferenciación. El melanoma resultaría de la acumulación de mutaciones en genes involucrados en la regulación, proliferación, diferenciación y apoptosis celular.

Estadio de progresión	Hallazgo histológico	Comportamiento biológico	Lesión molecular
1.Nevus melanocítico benigno	Aumento del número de melanocitos basales dispuestos en nidos en la unión	Lesión benigna	Mutación BRAF
2.Nevus atípico	Células névicas atípicas de distribución irregular	Lesión pre-maligna	Mutación CDKN2A/PTEN
3.Melanoma de crecimiento radial	Marcada atipia, crecimiento intraepidérmico	Disminución diferenciación, proliferación clonal	Aumento Ciclina D1
4.Melanoma de crecimiento vertical	Invasión dérmica de células tumorales	Ruptura de membrana basal	Pérdida de E-Cadherina
5.Melanoma metastásico	Proliferación tumoral a distancia del tumor primario y en otros órganos	Crecimiento disociado del tumor primario. Crecimiento a distancia	Expresión de N-cadherina Expresión de integrinas Expresión de MMP-2 Survivina Reducción y ausencia de TRMP1

Tabla 1.1: Cambios histológicos, biológicos y moleculares en la progresión del melanoma maligno

El melanoma tiene un comportamiento biológico que determina su pronóstico ya que presenta dos fases de crecimiento: una radial (intraepidérmica) y otra vertical

(intradérmica) (Fig. I2). En la fase de crecimiento radial, que puede durar meses o años, la tumoración está limitada a la epidermis, sin que exista capacidad para producir metástasis; en esta situación la extirpación quirúrgica es curativa. En la fase de crecimiento vertical, la tumoración invade la dermis y presenta capacidad para producir metástasis linfáticas o sanguíneas. Estos tipos de crecimiento hacen necesario que una vez que se establece el diagnóstico, se deba determinar en qué fase de crecimiento se encuentra la enfermedad, de manera que se puedan precisar el pronóstico y el tratamiento.

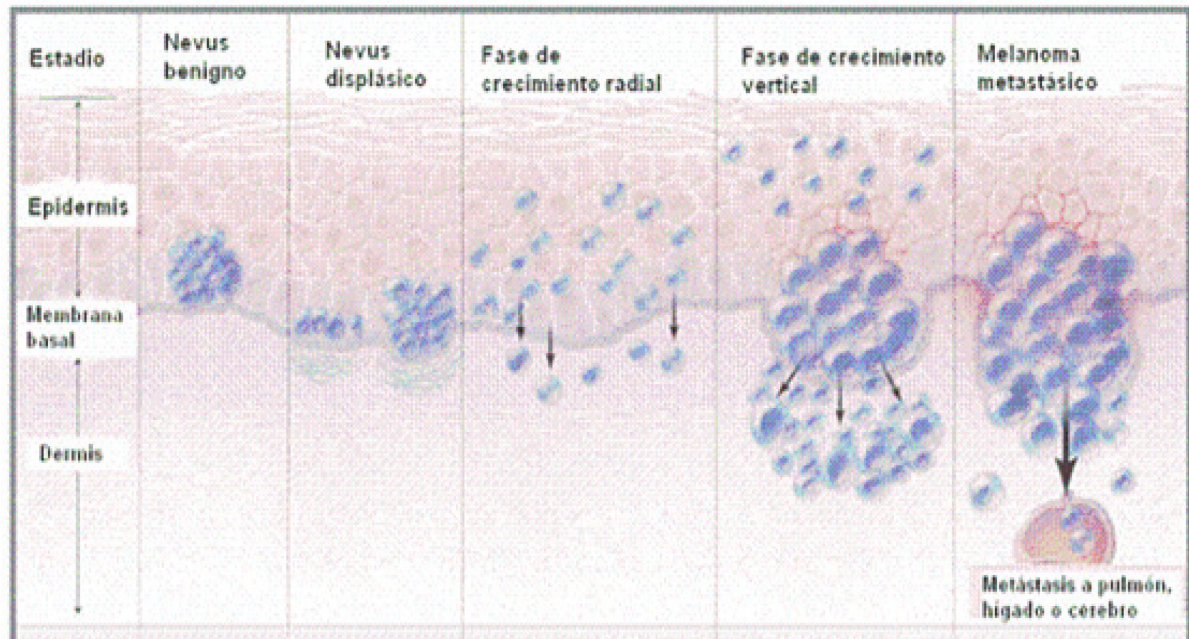


Figura I2 :Fases de crecimiento del melanoma

## Formas del melanoma

La clasificación tradicional del melanoma cutáneo incluye 4 formas clínico-patológicas en relación a su localización anatómica y a su evolución. Las tres formas clínicas: melanoma de extensión superficial, léntigo melanoma maligno y melanoma acro-lentiginoso, tienen una fase de crecimiento intraepidérmica larga, en la cual el tumor está completamente limitado a la epidermis. El cuarto tipo, el melanoma nodular, tiene una fase de crecimiento intraepidérmica muy corta, con el paso a crecimiento vertical (dérmico) rápido. En la actualidad se considera el melanoma como una sola entidad que puede evolucionar hacia una forma clínico-patológica u otra dependiendo de varios

factores no bien establecidos, entre los que se incluyen la localización anatómica y/o el daño solar asociado.

**1. Melanoma de extensión superficial:** El melanoma de extensión superficial es la forma más frecuente de melanoma ya que representa el 70% del total de casos. Puede localizarse en cualquier zona del cuerpo, siendo más frecuente en el torso de los varones y en las extremidades inferiores de las mujeres. La edad media en el momento del diagnóstico es de 44 años, y generalmente la lesión tiene una evolución de entre 1 y 5 años. La lesión clínica suele ser una placa pigmentada, palpable, de 1 a 2,5 cm de diámetro, de coloración marrón oscura, negra o parduzca, y que puede presentar áreas claras de regresión tumoral.

**2. Melanoma nodular:** El melanoma nodular es la segunda forma de melanoma en frecuencia, representando un 10-15% de los casos diagnosticados. Puede desarrollarse en cualquier localización, siendo discretamente más frecuente en el torso de los varones y en las piernas de las mujeres. El melanoma nodular tiene una fase de crecimiento corto, de entre 6 y 18 meses. Clínicamente, la lesión suele tener entre 1 y 2 cm de diámetro y aparece como un área pápulo-nodular, pigmentada, de coloración marrón oscura o negra y con áreas sonrosadas.

**3. Lentigo melanoma:** El lentigo melanoma consiste en una lesión pigmentada que se observa en áreas expuestas a daño solar intenso, especialmente en la cara y el cuello de personas mayores. Esta lesión fue descrita en 1890 por Hutchinson y posteriormente por Dubreuilh. En la actualidad se habla de lentigo maligno cuando la lesión está limitada a la epidermis y de lentigo melanoma maligno cuando la lesión se hace invasiva. La incidencia anual de lentigo maligno se sitúa entre 1 y 1,5 por cada 100.000 habitantes, con una incidencia en aumento, que lo sitúa entre el 4 y el 15% de los casos de melanoma.

**4. Melanoma lentiginoso acral:** El melanoma lentiginoso acral es el menos frecuente, representando un 2-8% de los melanomas; sin embargo, es la forma más frecuente de esta enfermedad en personas de raza negra y en asiáticos. Esta forma de melanoma se localiza especialmente en las palmas, plantas, y en la región periungueal. Generalmente se observa en personas mayores, con una edad media de 65 años y tiene un período de evolución de 2,5 años.

Además de estas formas prevalentes, se han diagnosticado otras formas menos frecuentes de melanoma. El de mucosas se puede localizar a nivel genital, oral o conjuntival. Suelen tener una fase de crecimiento radial o pagetoide semejante a la del melanoma de crecimiento superficial. Por su parte, el melanoma desmoplásico es una variante clínico-patológica poco frecuente, que se presenta como una lesión benigna pero que posteriormente da lugar a un tumor profundo, fibroso, con predominio de células fusiformes. Este tipo tumoral se caracteriza por una tendencia a las recidivas locales múltiples y por una gran capacidad de infiltración local, mientras que su riesgo de desarrollo de metástasis es similar o incluso más bajo que el de otras formas de melanoma.

## **Diagnóstico del melanoma**

El diagnóstico del melanoma se basa en el reconocimiento de las características clínicas diferenciales de sus distintas formas, es decir en la observación de una lesión inicialmente macular pigmentada, de crecimiento asimétrico, de bordes imprecisos y con una coloración abigarrada en la que se aprecian áreas negras y áreas azuladas representativas de un proceso de regresión (Hazen *et al.* 1999). La utilización sistemática de los criterios clínicos resumidos en el acrónimo **ABCD** (A: Asimetría; B: Bordes irregulares; C: Coloración heterogénea; D: Diámetro mayor de 6 mm), es útil para discriminar entre las lesiones benignas y aquellas en las que existe sospecha de malignidad. Cuando existen nevus previos, la observación de cambios en los mismos también son un factor de alerta sobre su evolución hacia melanoma. Los cambios que tienen lugar en etapas iniciales incluyen diferencias de coloración, prurito, aumento de tamaño y desarrollo de satélites. En lesiones más evolucionadas puede observarse la aparición de hemorragia y/o de ulceración.

## **Histopatología del melanoma**

Los hallazgos histológicos del melanoma son iguales en sus diferentes formas clínicas. El estudio histológico del melanoma se basa en la presencia de una proliferación tumoral melanocítica atípica acompañada de cambios epidérmicos y de respuesta inflamatoria y dérmica. En las fases iniciales, la proliferación de melanocitos atípicos está limitada a la epidermis (*in situ*), constatándose su presencia en todos los niveles

epidérmicos (crecimiento radial). Dichos melanocitos atípicos se disponen individualmente y en nidos celulares de tamaño y forma heterogéneos. A medida que la lesión progresa puede existir afectación de la dermis, en cuyo caso se observan células tumorales sueltas y formando nódulos de tamaño y forma variables (crecimiento vertical). Las células de melanoma tienen una morfología variable, que puede ser cuboidal o fusiforme, y suelen carecer de maduración nuclear (reducción del tamaño nuclear en profundidad) así como de mitosis y de necrosis celular. Los melanomas se acompañan de una respuesta inflamatoria por la presencia de infiltrado predominantemente linfocitario, que puede tener diferente distribución e intensidad. Otro hallazgo histológico característico es la regresión histológica, la cual consiste en la aparición de un denso infiltrado inflamatorio con presencia de melanófagos y con áreas variables de fibrosis dérmica. Existen parámetros histológicos que son importantes para conocer el pronóstico de un melanoma y entre ellos se incluyen el grosor en milímetros del tumor (índice de Breslow), la presencia de ulceración, el número de mitosis y la presencia de satelitosis e invasión vascular.

## **Estadaje del melanoma**

Como se ha mencionado anteriormente, el melanoma tiene un comportamiento biológico característico con un crecimiento intraepidérmico (crecimiento radial) y un crecimiento dérmico (crecimiento vertical). En la fase de crecimiento dérmico el melanoma tiene la capacidad de producir metástasis. El desarrollo de metástasis es el resultado de una serie de eventos que incluyen la liberación de células del tumor primario, la invasión de la membrana basal, la migración hacia el torrente sanguíneo o hacia la circulación linfática, la extravasación, el establecimiento y el crecimiento de micrometástasis en otros órganos distantes. El pronóstico del melanoma se ve condicionado de manera significativa por la fase de crecimiento y por la invasión tumoral, así como por el carácter local o de afectación linfática o visceral. Es por ello necesario que tras diagnosticar un melanoma se proceda a su estadaje con fines pronósticos y terapéuticos.

La *American Joint Cancer Commission* utiliza un sistema de estadaje de los enfermos de melanoma que se basa en la escala TNM (tumor primario, ganglios linfáticos regionales, metástasis distantes). En ella se utilizan datos clínicos e histológicos en relación a las características del tumor (espesor y presencia o no de

ulceración), presencia y número de ganglios linfáticos afectados y existencia o no de metástasis a distancia, para clasificar a los melanomas en enfermedad localizada (estadios I y II), enfermedad ganglionar y regional (estadio III) y melanoma con metástasis a distancia (estadio IV). En el estadiaje microscópico del tumor adquieren una gran importancia pronóstica el grosor tumoral, el índice mitótico y la presencia de ulceración. El grosor tumoral se establece utilizando dos sistemas, uno basado en la medición milimétrica del mismo (Breslow 1970)(índice de Breslow) y otro basado en el nivel cutáneo de invasión tumoral (nivel de Clark) (Fig. I.3).

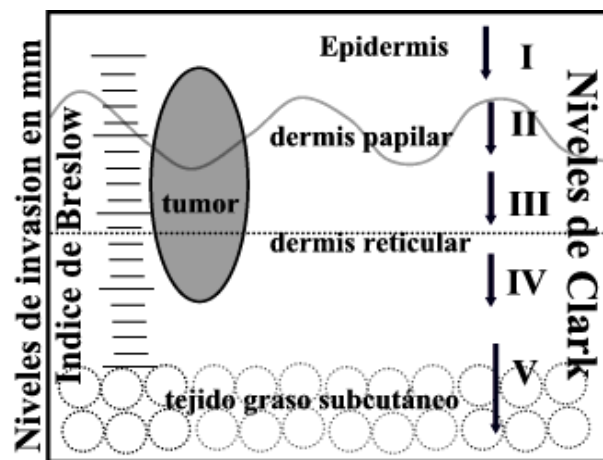


Figura I.3 Estadiaje microscópico del melanoma

El índice de Breslow es una variable independiente de otros factores, que permite estimar el pronóstico y la supervivencia de los enfermos con melanoma. Los niveles de Clark describen la invasión de la tumoración en las diferentes capas cutáneas. El nivel I describe los tumores puramente epidérmicos; el nivel II indica que la tumoración atraviesa la unión dermo-epidérmica con invasión de la dermis papilar; el nivel III describe las tumoraciones que ocupan toda la dermis papilar; el nivel IV indica que la tumoración infiltra la dermis reticular y el nivel V corresponde con tumores que invaden el tejido graso subcutáneo. El pronóstico empeora al aumentar el nivel Clark, si bien este parámetro tiene menos influencia clínica que el índice de Breslow. El índice mitótico y la presencia de ulceración en el tumor primario son otros factores pronósticos independientes. Los pacientes que presentan ulceración en el tumor primario tienen una supervivencia significativamente menor que los pacientes con melanoma de nivel similar pero no ulcerado.

## Bases moleculares del melanoma.

.;(Pollock *et al.* 2003). Debido a que ha sido encontrada con mayor frecuencia en melanomas en fase vertical que en melanoma en fase radial algunos autores afirman que esta mutación está más implicada en la progresión que en la iniciación del melanoma (Dong *et al.* 2003). Como resultado de la alta tasa de mutación de esta proteína en melanomas humanos, se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos con fármacos que tienen esta mutación como diana a través de la inhibición de B-Raf. Uno de dichos fármacos es vemurafenib, que en 2011 fue aprobado por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (FDA) para el tratamiento de melanomas positivos para la mutación de B-Raf (mutación cobas® 4800 BRAF). Dabrafenib es otro fármaco aprobado por la FDA que ha producido resultados similares y que actúa interrumpiendo la activación de la quinasa MEK por B-Raf-V600E.

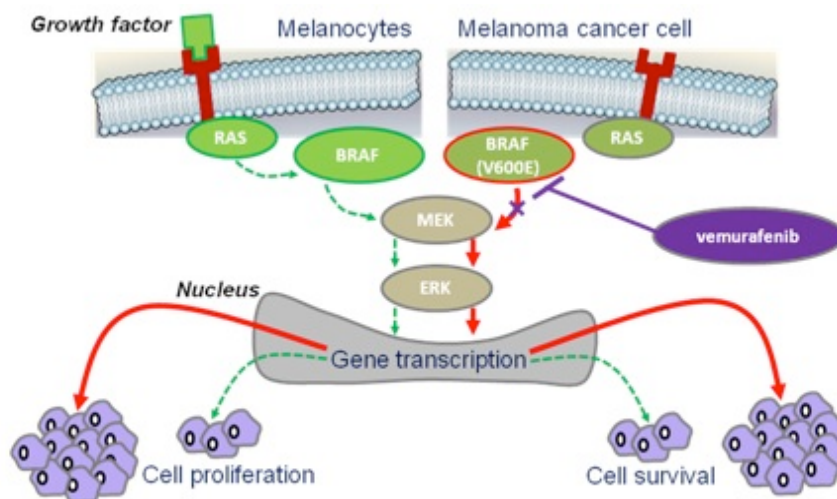


Figura 1.4. Vía de señalización de B-Raf-MAPKs en melanocitos y células de melanoma y su efecto sobre supervivencia celular y proliferación.

Estudios epidemiológicos muestran que entre el 15 y el 20% de los melanomas tiene una mutación oncogénica en N-Ras (homólogo del oncogén viral v-Ras identificado en neuroblastoma). La mutación en B-Raf parece ser excluyente con la mutación en N-Ras ya que el análisis genético de líneas celulares que llevan mutación en B-Raf no detecta mutaciones en N-Ras (Davies *et al.* 2002).



## Células madre en melanoma

Al igual que sucede en otros tipos de cánceres, las terapias actuales en melanoma no están dando los resultados esperados debido a que existe una población de células dentro del tumor que son resistentes a los agentes quimioterapéuticos disponibles. Esta población de células resistentes se cree que tiene características de célula madre tumoral con capacidad de auto-renovación y de desdiferenciación.

El primer marcador de célula madre tumoral descrito en tumores sólidos fue CD44, que estaba presente en células de cáncer de mama que tenían el fenotipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>. Este hallazgo fue confirmado en tumores sólidos de diferente origen como son los de cerebro y colon. Estos estudios estuvieron basados en un modelo de xenograft de células tumorales humanas en ratón que permitieron identificar una sub-población celular de características poco convencionales y que estaba organizada hiperjerárquicamente. Un resultado relevante fue que los tumores producidos por el xenotransplante eran semejantes al tumor original tanto en morfología como en heterogeneidad.

En 2005 Fang y colaboradores examinaron células de melanoma aisladas de pacientes e identificaron una sub-población que podría ser definida experimentalmente en base a su habilidad para proliferar como esferas no adherentes. Estudios posteriores mostraron que dichas células estaban enriquecidas en el marcador de superficie CD20, el cual es expresado por linfocitos B maduros. Estas células CD20<sup>+</sup> eran capaces de autorenovarse y de diferenciarse a adipocitos, osteocitos y a diferentes linajes melanocíticos. Estas células poseían también una mayor tumorigenicidad en experimentos de xenotransplante en ratones inmunodeficientes SCID (Fang *et al.* 2005).

Otra evidencia de que en melanoma existen células madre tumorales se obtuvo con el uso del marcador CD133 (Prominin-1), el cual permitió el aislamiento de un conjunto de células con características *stem* a partir de muestras de melanomas humanos. CD133 había sido usado previamente en tumores cerebrales (Singh *et al.* 2004) y de colon (Ricci-Vitiani *et al.* 2007). Estas células CD133<sup>+</sup> también poseían elevada tumorigenicidad, desdiferenciación y podían crecer en forma de esferas. Una propiedad interesante de estas células es que co-expresaban ABCG2, un miembro de la familia de transportadores ABC asociado a la capacidad de eflujo de colorantes que presentan algunas células madre (Monzani *et al.* 2007). Coherentemente, la desregulación de

CD133 in vitro e in vivo da lugar a un retraso en el crecimiento del melanoma y en su capacidad de metástasis (Rappa *et al.* 2008).

Uno de los últimos marcadores moleculares identificados en melanoma es la enzima aldehído deshidrogenasa Aldh1a. Se ha demostrado que las células con alta actividad Aldh1a poseen propiedades de célula madre tumoral y una mayor resistencia a agentes quimioterapéuticos (Luo *et al.* 2012).

## **EL RECEPTOR DE DIOXINA (AHR).**

El receptor de dioxina o AhR (“*Aryl hydrocarbon Receptor*”) fue identificado por primera vez por el laboratorio de Aland Poland en 1976 en el citoplasma de células de hígado de ratón, siendo descrito como una proteína implicada en la detoxificación de xenobióticos y, posteriormente, en el mecanismo de inducción de enzimas detoxificantes tales como el citocromo P450 CYP1A1 (Poland *et al.* 1976; Okey *et al.* 1979; Poland and Knutson 1982). Durante los años subsiguientes, se describió la translocación al núcleo del receptor inducida por su unión a ligandos exógenos, generalmente hidrocarburos policíclicos aromáticos (Greenlee and Poland 1979; Okey *et al.* 1979). El hallazgo y descripción posteriores de la proteína ARNT (*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) permitieron el trazado de un mecanismo básico de acción del receptor (Reyes *et al.* 1992).

A mediados de los años 90, la producción de ratones deficientes en la expresión de AhR generados por técnicas de *gene knock-out* confirmó el papel toxicológico del receptor, ya que los ratones carentes del mismo (*AhR*<sup>-/-</sup>) eran resistentes a los efectos tóxicos y carcinogénicos de xenobióticos como la dioxina (TCDD, 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-*p*-dioxina) y el benzo-pireno (BP) (Fernandez-Salguero *et al.* 1996; Mimura *et al.* 1997; Shimizu *et al.* 2000). Estudios moleculares posteriores definieron a AhR como un factor de transcripción activado por unión a ligando que media los efectos tóxicos y carcinogénicos de gran número de compuestos xenobióticos, entre los que se incluyen hidrocarburos aromáticos halogenados (HAHs), compuestos policíclicos aromáticos (PAHs) y bifenilos policlorinados (PCBs). Muchos de estos compuestos son potentes tóxicos ambientales generados por la actividad humana y sus procesos tóxicos y carcinogénicos son en general consecuencia de la inducción de enzimas detoxificantes

hepáticas de las fases I y II (Pohjanvirta and Tuomisto 1994; Fernandez-Salguero *et al.* 1996; Shimizu *et al.* 2000).

La importancia toxicológica y oncológica de estos xenobióticos potenció una intensa investigación dirigida a determinar el mecanismo molecular de acción de AhR, a definir su ruta de señalización intracelular y a identificar los intermediarios que regulan su compartimentalización núcleo-citoplasmática. Un notable esfuerzo se llevó a cabo también para descifrar su función como regulador transcripcional de genes diana, clásicamente los miembros de la superfamilia de citocromos P450 (CYP450s) CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 y CYP1S1 (Fernandez-Salguero *et al.* 1997) (Mimura *et al.* 1997; Peters *et al.* 1999; Shimizu *et al.* 2000).

En paralelo al estudio de AhR en procesos de toxicidad, teratogénesis y carcinogénesis mediados por xenobióticos, un número creciente de resultados experimentales comenzó a definir su papel en procesos fisiológicos y homeostáticos. Buena parte de estos estudios se llevaron a cabo empleando ratones *knock-out* para AhR, los cuales presentan *per se* múltiples cambios fenotípicos que incluyen alteraciones reproductoras, patologías hepáticas y cardíacas y defectos en los sistemas vascular e inmune (Lee *et al.* 1995; Fernandez-Salguero *et al.* 1997; Mimura *et al.* 1997; Abbott *et al.* 1999; Benedict *et al.* 2000).

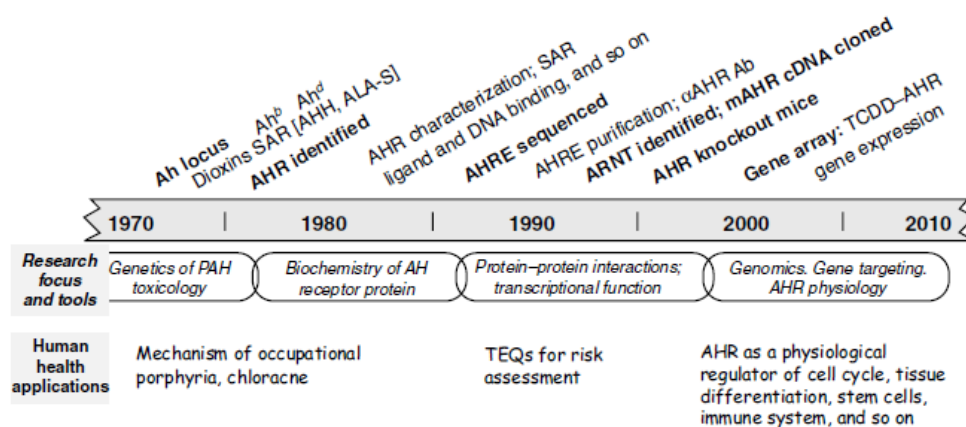


Figura 1.5. Principales avances en el estudio del receptor de dioxina a lo largo del tiempo (Pohjanvirta 2012).

El papel endógeno y homeostático de AhR tiene también un importante apoyo evolutivo ya que se encuentra altamente conservado entre especies (Hahn 2002),

mantiene un patrón de expresión constitutivo durante el desarrollo embrionario y en tejidos adultos (Abbott *et al.* 1995) y, además, el gen que lo codifica está presente en todo el rango de metazoos, los cuales surgieron evolutivamente millones de años antes de la existencia de dioxinas en la Biosfera. Así, en estos momentos está ampliamente aceptado que AhR cumple una importante función en la biología, el desarrollo y las funciones fisiológicas de la célula (Lee *et al.* 1995; Elizondo *et al.* 2000; Puga *et al.* 2005; Barouki *et al.* 2007; Pohjanvirta 2012) (Baba *et al.* 2005). No obstante, a día de hoy, aún se desconocen en gran medida las rutas y los mecanismos moleculares que implican a AhR, los intermediarios con los que interacciona este receptor así como los genes diana que regula AhR en ausencia de xenobióticos. En este contexto toxicológico-homeostático, existe consenso en el campo de que la modulación de procesos toxicológicos por AhR puede ser un mecanismo de adaptación a la aparición de xenobióticos en la Biosfera, de tal manera que la función toxicológica de AhR podría representar una versión exacerbada de su función fisiológica (Fujii-Kuriyama and Kawajiri 2010). Así, por ejemplo, la activación de AhR por ligandos como TCDD o B[a]P provoca la parada del ciclo celular en G0/G1 y G2/M, la inhibición de la replicación del DNA y el bloqueo de la proliferación celular (Puga *et al.* 2002). En ausencia de xenobióticos, AhR promueve la progresión del ciclo celular de fibroblastos embrionarios dado que las células carentes de AhR presentan una menor proliferación y una mayor tasa apoptótica que las silvestres (Fernandez-Salguero *et al.* 1995; Elizondo *et al.* 2000). Estudios en *Drosophila melanogaster* también apoyan la función endógena de AhR ya que su ortólogo en esta especie, *Spineless (Ss)*, tiene una distribución constitutivamente nuclear y es insensible al tratamiento con dioxinas (Kudo *et al.* 2009).

Teniendo en cuenta el papel del receptor de dioxina como factor de transcripción, la búsqueda de sus dianas transcripcionales fisiológicas ha sido una de las principales líneas de investigación en los últimos años. A este respecto, se ha demostrado que AhR participa en el control transcripcional de genes que codifican para la DNA polimerasa kappa (Ogi *et al.* 2001), *N*-miristoiltransferasa 2 (Kolluri *et al.* 2001), p27<sup>Kip1</sup> (Kolluri *et al.* 1999), Bax (Matikainen *et al.* 2001), T-Cadherina (Niermann *et al.* 2003), c-Myc (Yang *et al.* 2005), Slug/SNAI2 (Ikuta and Kawajiri 2006), Vav3 (Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009), la proteína de unión a TGFβ latente LTBP-1 (Gomez-Duran *et al.* 2008) y la proteína de maduración de linfocitos B (Ikuta *et al.* 2010). Además, el análisis comparativo de *microarrays* de expresión en condiciones de presencia/ausencia de

xenobióticos ha identificado un número relevante de genes potencialmente regulados por AhR, una fracción de los cuales está relacionada con funciones endógenas y con la homeostasis celular, pero no con el metabolismo de xenobióticos (Boverhof *et al.* 2005; Tijet *et al.* 2006; Frericks *et al.* 2007). Al margen de esto, otros estudios han mostrado que AhR puede ser cofactor de reguladores transcripcionales relevantes en la fisiología celular como NF- $\kappa$ B, que media reacciones inflamatorias y de estrés oxidativo (Tian *et al.* 1999), pRb (proteína del retinoblastoma) (Marlowe *et al.* 2004; Huang and Elferink 2005) y el receptor de estrógenos alfa (ER- $\alpha$ ) (Klinge *et al.* 1999; Wormke *et al.* 2000).

Independientemente de su función como factor de transcripción, AhR parece interactuar directamente con la ruta de señalización de las quinasas mitogénicas MAPK (Tan *et al.* 2002) del de estrógenos (Ohtake *et al.* 2003; Wormke *et al.* 2003), de la proteína quinasa c-Src (Blankenship and Matsumura 1997; Vogel *et al.* 2004) y del factor de intercambio GTP/GDP Vav3 (Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009).

### **Estructura proteica del receptor de dioxina.**

La clonación y secuenciación del gen que codifica para el AhR murino en 1992 (Burbach *et al.* 1992; Ema *et al.* 1992) permitió describir su pertenencia a la superfamilia de factores de transcripción con secuencias del tipo *basic-helix-loop-helix* (bHLH), cuya característica diferencial es su activación por la unión de ligandos exógenos. La familia de proteínas bHLH incluye también a los reguladores de la transcripción con dominios PAS Per (*Period*), proteína implicada en el mantenimiento del ritmo circadiano en *Drosophila melanogaster*, ARNT (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) y Sim (*Single Minded*), proteína reguladora del desarrollo del sistema nervioso central en *Drosophila melanogaster*. Por su homología de dominios funcionales, a este grupo de factores de transcripción se le denomina globalmente bHLH/PAS (*Basic Helix-Loop-Helix/Period* (Per)-*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT)-*Single minded* (Sim) (Figura I.5). Estas proteínas tienen un amplio espectro de funciones celulares y fisiológicas y están implicadas en el control de la embriogénesis, en desarrollo neuronal, ritmo circadiano, angiogénesis, metabolismo y respuesta a hipoxia (Fernandez-Salguero *et al.* 1995; Hankinson 1995; Crews 1998; Gonzalez and Fernandez-Salguero 1998; Chan *et al.* 1999; Whitlock 1999).

Describiendo la proteína desde su extremo amino al carboxilo, encontramos en primer lugar el dominio bHLH. Su región básica media la unión al DNA mientras que el dominio HLH es necesario para la heterodimerización con ARNT. Siguiendo hacia el extremo C-terminal, AhR tiene el dominio PAS que comparte ARNT, Per y Sim. Este dominio está formado por dos copias de una repetición degenerada de unos 50 aminoácidos denominados PAS-A y PAS-B, separadas entre sí por otros 110 aminoácidos. La región PAS-B contiene parte del dominio de unión al ligando y una secuencia necesaria para la interacción de AhR con el chaperón Hsp90 (Procopio *et al.* 2002). El extremo C-terminal de AhR, ARNT y Sim contiene una región rica en glutamina (Q) similar a los dominios de transactivación presentes en otros factores de transcripción, y cuya pérdida, aunque no afecta ni a la unión al DNA ni al ligando (Fukunaga *et al.* 1995), sí impide la interacción con co-activadores no caracterizados completamente.

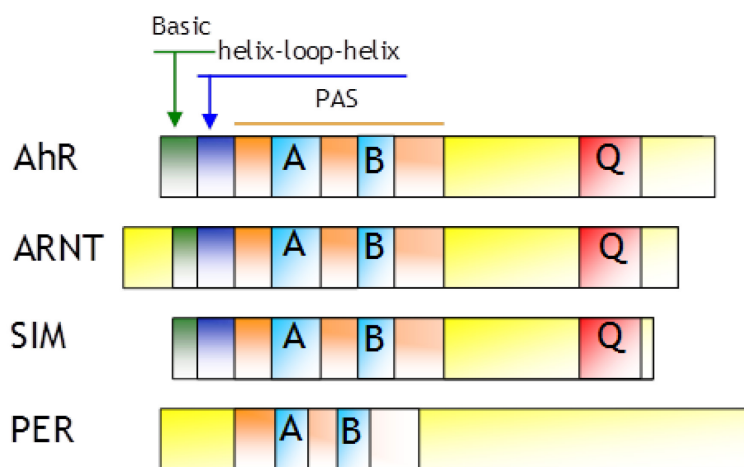


Figura 1.5. Estructura esquemática de diversos miembros de la familia BHLH/PAS. Se han destacado los principales dominios funcionales de cada proteína. (Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009)

Se ha mostrado que AhR, *per se*, presenta baja capacidad de unión al DNA, de modo que los homodímeros AhR/AhR son transcripcionalmente inactivos (Swanson *et al.* 1995). En este sentido, y aunque la actividad transcripcional de AhR en respuesta a

xenobióticos requiere de su heterodimerización con ARNT, no se conoce si en ausencia de ligando exógeno AhR puede heterodimerizar con otros factores diferentes a ARNT, o incluso actuar de forma independiente a éste. En este sentido, se ha descrito recientemente que la proteína KLF6 (Kruppel-like factor 6) podría ser un factor de heterodimerización de AhR que permita su unión a secuencias no consenso en el promotor de genes diana (Wilson *et al.* 2013). El dominio de transactivación de AhR es determinante en su localización celular y en sus propiedades de transporte núcleo-citoplasma en ausencia de ligando exógeno. Aunque el mecanismo de translocación nuclear de AhR sólo ha sido descrito parcialmente, se ha identificado una señal de localización nuclear (NLS, *Nuclear Localization Signal*), situada en el extremo N-terminal de la proteína, que es reconocida por dos componentes del complejo que forman el poro nuclear. Adicionalmente, AhR presenta dos señales de exportación nuclear (NES, *Nuclear Export Signal*), una en el dominio bHLH y otra en el dominio PAS-A; ambas regiones son ricas en leucina y reconocidas por la proteína CRM1 (*Chromosome Region Maintenance 1*) (Ikuta *et al.* 1998; Berg and Pongratz 2001).

## **Mecanismos de activación y de localización celular de AhR.**

Existen múltiples factores que pueden modificar la actividad transcripcional de AhR. Entre ellos se incluyen tanto agentes químicos como factores biológicos. Sin embargo, la mayor parte de los estudios realizados están centrados en el proceso de activación de AhR por ligandos exógenos y en el mecanismo de regulación transcripcional de genes implicados en el metabolismo de xenobióticos. Según el modelo comúnmente aceptado (Figura I.6), en ausencia de xenobióticos, la forma inactiva de AhR se encuentra predominantemente en el citosol asociada a un complejo de chaperones moleculares que al menos incluye: (i) dos moléculas de Hsp90, (*Heat Shock Protein 90*); que mantienen al receptor en una conformación proclive a la unión de ligando e impiden su unión prematura a ARNT) (Perdew 1988; Wilhelmsson *et al.* 1990); (ii) una molécula de la proteína p23 que promueve la liberación de las Hsp90 tras la unión del ligando (Kazlauskas *et al.* 1999); y (iii) una molécula de inmunofilina XAP2 (*Hepatitis B virus X-Associated Protein 2*) (Meyer *et al.* 1998), también conocida como ARA9 (*AHR-Associated protein 9*) (Carver and Bradfield 1997) o AIP (*AHR-Interacting Protein*) (Ma

and Whitlock 1997) que estabiliza a AhR en el citosol e impide su degradación prematura por el proteosoma (Davarinos and Pollenz 1999; Roberts and Whitelaw 1999).

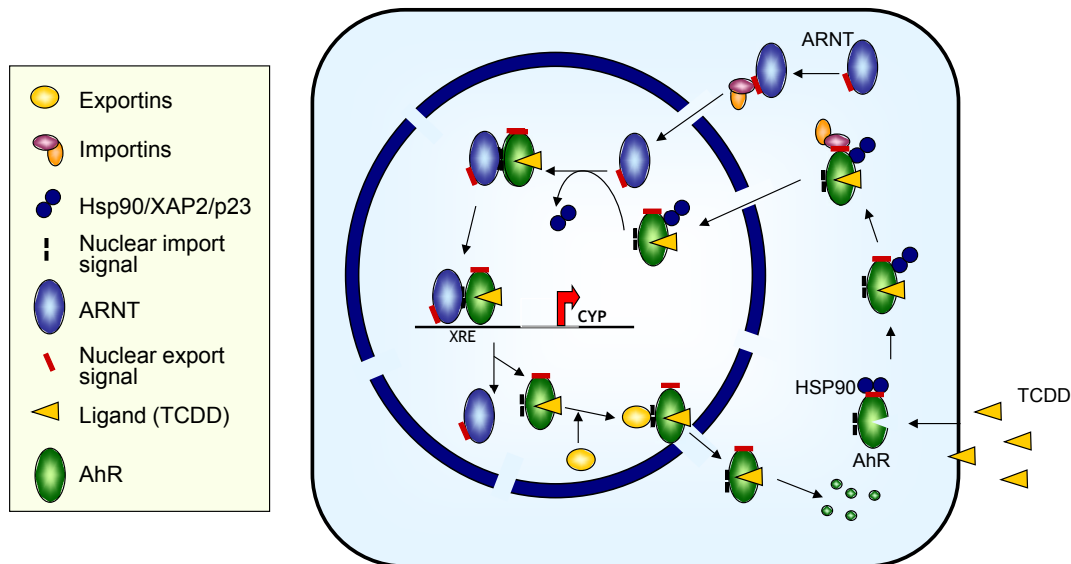


Figura 1.6. Modelo de activación de AhR mediada por xenobióticos

Tras su activación por la unión de xenobiótico, AhR cambia su conformación y se transloca al núcleo, donde se liberan las proteínas Hsp90 y el resto de chaperones. El receptor forma entonces heterodímeros AhR/ARNT con capacidad de unión al DNA (Kazlauskas *et al.* 1999; Lees and Whitelaw 1999; Kazlauskas *et al.* 2001) en las secuencias consenso denominadas XREs o DREs (*Xenobiotic/Dioxin Response Elements*, 5'GCGTG3') situadas en regiones promotoras de genes diana, activando o reprimiendo su transcripción (Rowlands and Gustafsson 1997) (Niermann *et al.* 2003; Gomez-Duran *et al.* 2008). Tras la transactivación de los genes diana, AhR se disocia de ARNT y expone su región NES de exportación nuclear que será reconocida por CMR1. La formación del complejo AhR-CMR1 induce el transporte del receptor al citosol donde es ubiquitinado y degradado por el proteosoma 26S (Roberts and Whitelaw 1999; Massague 2000; Santiago-Josefat *et al.* 2001).

### Activación de AhR en ausencia de xenobióticos



El modelo de activación clásico contempla que el receptor de dioxina permanece citosólico e inactivo mientras no se produzca la unión a ligando (exógeno) que desencadena su actividad transcripcional. Sin embargo, algunos estudios han mostrado que en ausencia de ligando una fracción apreciable de receptor es activamente transportada desde el citosol hasta el núcleo en un flujo constante (Ikuta *et al.* 2000; Richter *et al.* 2001). Concretamente, en células HeLa se ha observado que entre el 15 y el 20% de su contenido total de AhR se encuentra localizado en el núcleo en ausencia de xenobióticos, y que este AhR nuclear dimeriza con ARNT y es transcripcionalmente activo (Singh *et al.* 1996).

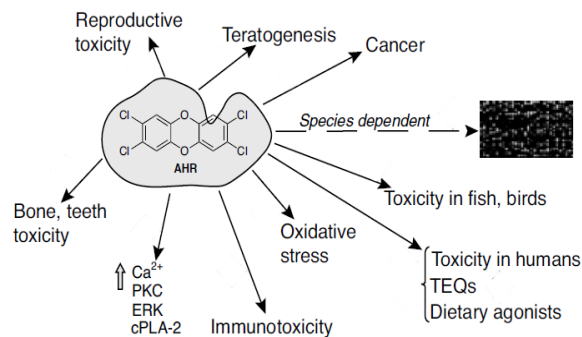


Figura 1.7. Efectos tóxicos de dioxina (TCDD) mediados por AhR. (Pohjanvirta 2012)

línea de oblastos murinos (Rey-Barroso *et al.* 2013) la localización de AhR depende de la densidad celular, siendo mayoritariamente nuclear a baja densidad y citoplasmática a confluencia. Parece por tanto existir un intercambio mantenido de AhR entre el citoplasma y el núcleo que es independiente de la presencia de xenobiótico en la célula, el cual afectaría dicho equilibrio desplazándolo hacia la acumulación nuclear.

Otros mecanismos y moléculas han sido identificados en diferentes sistemas celulares como potenciales activadores de AhR en ausencia de xenobióticos:

- El co-activador RIP140 aumenta la actividad de promotores regulados por AhR tanto en presencia como en ausencia de ligando exógeno (Kumar *et al.* 1999).
- La suspensión de queratinocitos (Sadek and Allen-Hoffmann 1994), de células de hepatoma de ratón (Sadek and Allen-Hoffmann 1994) y de fibroblastos C3H10T1/2 (Cho *et al.* 2004) incrementa la expresión de genes diana de AhR.
- El estado de fosforilación de AhR influye en su distribución celular entre núcleo y

citoplasma (Ikuta *et al.* 2004), y proteína quinasa C (PKC) potencia su activación transcripcional inducida por TCDD (Carrier *et al.*, Mol Cell Biol, 1992; Berghard *et al.*, Mol Cell Biol, 1993; Chen y Tukey J Biol Chem. 1996)

- XAP2 previene la translocación de AhR al núcleo (Pollenz and Buggy 2006) por reclutamiento de la fosfodiesterasa 2A (PDE2A) que reduce los niveles celulares de cAMP (de Oliveira *et al.* 2007)..
- La actividad transcripcional de AhR es regulada por la inhibición del proteosoma en fibroblastos embrionarios (MEF) y en células de hepatoma de ratón Hepa-1 (Santiago-Josefat *et al.* 2001; Song *et al.* 2002) por un mecanismo que implica la activación de PKC dependiente de Sp1 (Santiago-Josefat and Fernandez-Salguero 2003).
- El represor de AhR (AhRR, *AhR Repressor*) compete con el propio receptor para interaccionar con ARNT generando complejos AhRR/ARNT transcripcionalmente inactivos. La expresión de AhRR es regulada positivamente por AhR por un mecanismo de retroalimentación negativa que regula la actividad del receptor de dioxina (Mimura *et al.* 1999; Bernshausen *et al.* 2006).

*Así pues, AhR está sujeto a una fuerte regulación de su localización y actividad en un entorno fisiológico carente de ligandos exógenos.*

## **Implicación de AhR en la fisiología celular.**

La búsqueda de un papel homeostático para AhR nace tras la constatación de su temprana aparición en la escala evolutiva, de su conservación proteica y de su expresión constitutiva en la mayoría de los tipos celulares (Hahn *et al.* 1997). Sin embargo, el desconocimiento de buena parte de la biología de esta proteína llevó a considerarla como un receptor “huérfano” carente de ligando endógeno y de función fisiológica. No obstante, evidencias experimentales recientes sugieren que AhR podría activarse por moléculas endógenas tales como metabolitos del triptófano (Bergander *et al.* 2003; Wincent *et al.* 2009; Platten *et al.* 2012), cuyos niveles se mantienen a través de la ruta de la kinurenina (Adams *et al.* 2012), y por ciertos flavonoides (Cunningham *et al.* 1996).

Dentro de este contexto, se ha propuesto que AhR puede haber evolucionado como parte de un sistema inducible encargado de metabolizar sustancias lipofílicas presentes en la dieta, y que las dioxinas podrían mimetizar la unión de esas moléculas al

receptor sustituyendo o imitando la unión de ligandos endógenos que regulan procesos fisiológicos.

El papel endógeno de AhR se encuentra apoyado por numerosas observaciones experimentales, entre las que cabe destacar:

- Las alteraciones patológicas que sufren los ratones AhR *knock-out* en el sistema vascular, hepático, reproductivo e inmune (Fernandez-Salguero *et al.* 1995; Schmidt *et al.* 1996; Fernandez-Salguero *et al.* 1997; Gonzalez and Fernandez-Salguero 1998; Zaher *et al.* 1998; Abbott *et al.* 1999; Benedict *et al.* 2000; Lahvis *et al.* 2000; Thackaberry *et al.* 2002; Lund *et al.* 2003).
- La existencia de secuencias consenso XREs conservadas localizadas en regiones promotoras de genes que regulan procesos celulares clave (Safe *et al.* 1998; Monteiro *et al.* 2007).
- Las alteraciones en la señalización mediada por TGFβ y ácido retinoico en fibroblastos embrionarios, hepatocitos primarios y tejido hepático (Andreola *et al.* 1997; Elizondo *et al.* 2000; Andreola *et al.* 2004; Corchero *et al.* 2004; Santiago-Josefat *et al.* 2004; Gomez-Duran *et al.* 2006).
- La interacción directa o indirecta de AhR con el control del ciclo celular y con otras rutas moleculares de señalización (Weiss *et al.* 1996; Phelan *et al.* 1998; Nebert *et al.* 2000; Elferink *et al.* 2001; Puga *et al.* 2002).
- El control de la forma celular, la adhesión y la migración en fibroblastos murinos (Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009), en queratinocitos sometidos a transición epitelio-mesénquima (EMT) por TGFβ (Rico-Leo *et al.* 2013) y en migración epitelial en cierre de heridas (Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009) y en procesos angiogénicos (Roman *et al.* 2009).
- El control de elementos transponibles, distribuidos en todo el genoma, y presentes en los promotores de genes implicados en proliferación, desarrollo y diferenciación (Roman *et al.* 2008; Roman *et al.* 2011; Roman *et al.* 2011).

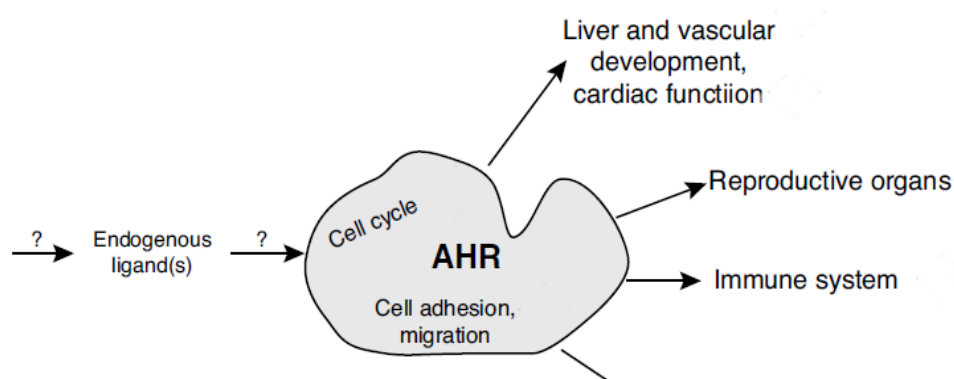


Figura 1.8. Funciones de AhR independientes a xenobióticos.

Entre las rutas de señalización con las que AhR podría interaccionar para regular alguna de estas funciones endógenas, se consideran como candidatas potenciales las dependientes del receptor de estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ), proteína retinoblastoma (pRb) (Elferink *et al.* 2001), la quinasa c-Src, el factor de hipoxia HIF-1 $\alpha$  (Nie *et al.* 2001), el complejo transcripcional implicado en supervivencia e inflamación NF- $\kappa\beta$  (Tian *et al.* 2002) los inductores de transición epitelio-mesénquima Slug y Snail (Roman *et al.* 2011; Rico-Leo *et al.* 2013) y la ruta de TGF $\beta$  (Santiago-Josefat *et al.* 2004; Peng *et al.* 2008; Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009; Roman *et al.* 2009).

## AHR Y CANCER

Existen datos experimentales y epidemiológicos que ponen de manifiesto una asociación entre alteraciones en la función de AhR y cáncer (Gasiewicz *et al.* 2008; Androutsopoulos *et al.* 2009). Se ha demostrado que la exposición a hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) está relacionada con una gran variedad de cánceres en animales de experimentación y humanos, mediados en gran parte por AhR (Morris *et al.* 2000; Puga *et al.* 2009). La exposición accidental a ligandos de AhR está asociada con el desarrollo de leucemias en humanos (Casado *et al.* 2010) mientras que el tratamiento de ratones con PAHs extraídos del aire da lugar a la aparición de carcinomas escamosos en pulmones de ratones silvestres pero no en los que carecen de AhR (Matsumoto *et al.* 2007). Adicionalmente, los ratones que carecen de AhR son totalmente resistentes al desarrollo de papilomas por aplicación tópica de benzopireno (Shimizu *et al.* 2000) así como a los efectos teratogénicos de la dioxina durante el desarrollo embrionario (Mimura *et al.* 1997). Se ha observado que los PAHs 3-metilcolantreno y 7,12-dimetilbenzoantraceno inducen tumores de pulmón y hepáticos durante la gestación, pero sólo si los ratones expresan AhR (Shimizu *et al.* 2000). Este papel de AhR en la

carcinogénesis inducida por xenobióticos se explica en base a su capacidad para inducir la expresión de enzimas de la fase I, cuyas acciones sobre carcinógenos y genotoxinas iniciarán el desarrollo del tumor. Además de esta función como iniciador tumoral, AhR también parece participar en la promoción y la progresión tumorales (Andersson *et al.* 2002; Andersson *et al.* 2005) dado que la sobre-expresión en ratón de una forma constitutivamente activada de este receptor da lugar a la aparición de tumores en la parte glandular del estómago en ausencia de xenobióticos.

Trabajos recientes realizados en diferentes laboratorios muestran que AhR también contribuye al desarrollo tumoral en ausencia de xenobióticos, sugiriendo que este receptor tiene una función oncogénica. Además de los estudios ya mencionado anteriormente en modelos murinos (Andersson *et al.* 2002; Andersson *et al.* 2005), otros trabajos han mostrado que AhR está sobre-expresado en tumores humanos de mama (Yang *et al.* 2008; Korzeniewski *et al.*), estómago (Peng *et al.* 2009), células T (Hayashibara *et al.* 2003) y páncreas (Koliopanos *et al.* 2002), y en líneas celulares de tumores cerebrales (Gramatzki *et al.* 2009; Dever and Opanashuk 2012). La expresión nuclear de AhR se encuentra asociada con el grado histológico, patológico y la invasión nodular en 209 pacientes con carcinoma urotelial

Sin embargo, en otros estudios se pone de manifiesto que AhR tiene función de *supresor tumoral* ya que se encuentra silenciado en varios tipos de cánceres. En modelos murinos, AhR se encuentra reprimido en tumores con inactivación de Rb (Peng *et al.* 2008) y en tumores gástricos inducidos por tratamiento con nitroso-hidroxitiril-amina {Iida, 2010 #178}. AhR también reprime el crecimiento de tumores hepáticos (Fan *et al.* 2010) e intestinales (Kawajiri *et al.* 2009) en ratón. En humanos, AhR se encuentra reprimido en células tumorales de mama humana (Hall *et al.* 2010) y en biopsias de pacientes de cáncer de próstata (Gluschnaider *et al.* 2010) y de leucemia linfoblástica aguda (Mulero-Navarro *et al.* 2006).

Globalmente, este conjunto de trabajos indican que AhR tiene actividad tanto oncogénica como de supresor tumoral, dependiendo del fenotipo de la célula diana y del contexto en el que se desarrolle el tumor.

## **Mecanismos por los que AhR puede participar en cáncer**

### ***Activación metabólica o detoxificación.***

Puesto que las enzimas de metabolismo de xenobióticos de clase I están en buen número reguladas por AhR, pueden llevar a cabo la activación metabólica de numerosos carcinógenos como PAHs, bifenilos policlorados y aminos aromáticos (Nebert *et al.* 2004), los cuales pueden inducir, promover y/o mantener desarrollo tumoral. Así, los ratones carentes de AhR muestran una mayor inducción del *Cyp1a1* en piel y estómago y una respuesta más lenta a la carcinogénesis inducida por benzopireno (Hosoya *et al.* 2008).

### ***Inhibición de supresores tumorales p53 y BRCA1 .***

Estudios *in vitro* y en animales de experimentación han demostrado que AhR puede interaccionar con p53 (Su *et al.* 2009). En células de hepatocarcinoma humano HepG2, TCDD contrarresta la actividad de p53 {Ambolet-Camoit, 2010 #185}, mientras que la exposición a TCDD e hipoxia inhibe la expresión de p53 mediada por el ER $\alpha$  y HDM2 (Seifert *et al.* 2009). Así, la activación de AhR por ligandos exógenos podría contribuir a la progresión tumoral inhibiendo la expresión de p53. Respecto a BRCA-1, la exposición a PAHs podría inhibir la expresión de BRCA-1 mientras que los agonistas de AhR como  $\alpha$ -naftoflavona ejerce el efecto opuesto (Jeffy *et al.* 2002).

### ***Efecto sobre las células madre.***

Los tumores están compuestos por células de diferente morfología, grado de diferenciación, capacidad proliferativa e invasividad (Jordan *et al.* 2006). Entre ellas, las células madre tumorales (CSC) se han propuesto como las responsables de la iniciación y progresión del tumor, e incluso de la metástasis y la recurrencia tumoral (Lapidot *et al.* 1994; Polyak and Hahn 2006). Resultados recientes sugieren que AhR participa en el mantenimiento de precursores hematopoyéticos (HSC) durante el desarrollo y la vida adulta, dado que la activación de AhR por TCDD, o su silenciamiento, pueden alterar el número y la función de las HSCs (Hirabayashi and Inoue 2009; Gasiewicz *et al.* ; Singh *et al.*). Adicionalmente, AhR puede disminuir la actividad de Oct4, un factor de transcripción implicado en pluripotencia, y de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH1a1), otro factor asociado al fenotipo de célula madre {Bunaciu, 2011 #196}.

**Efecto sobre el ciclo celular.**

AhR está involucrado en varias vías de señalización esenciales para la regulación del ciclo celular (Gasiewicz *et al.* 2008; Casado *et al.*). Así, AhR interacciona funcionalmente con CDK4 y CCND1 en líneas de cáncer de mama (Bar Hoover *et al.*) mientras que células de hepatoma murino Hepa1c1c7 con AhR mutado incrementan su tiempo de duplicación (Ma and Whitlock 1996). Estudios adicionales han mostrado que, al igual que sucede con progresión tumoral, AhR puede promover (HepG) o inhibir (MCF-7) crecimiento tumoral dependiendo del fenotipo de la célula diana (Abdelrahim *et al.* 2003). La manera por la que AhR modula el ciclo celular se cree que implica al supresor tumoral retinoblastoma (Rb) si bien aún no se ha definido el mecanismo molecular por el que lo lleva a cabo.

**Función anti-apoptótica.**

Se ha mostrado que AhR participa en procesos apoptóticos a nivel de la regulación de la expresión génica (Park *et al.* 2005). AhR es relevante en la respuesta anti-apoptótica de las células de cáncer de mama humanas y su sobre-expresión podría contribuir al cáncer de mama influido por factores ambientales {Vogel, 2007 #204}. El tratamiento con el ligando TCDD induce pérdida de la respuesta apoptótica en células de linfoma a través del incremento en ciclooxigenasa-2 (COX2) y la desregulación de genes de la familia BCL2 (Vogel *et al.* 2007). Por el contrario, la exposición de células Hepa1c1c7 a *N*-acetil-esfingosina inhibe la proliferación celular e induce apoptosis (Caruso *et al.* 2004).

**Pérdida de la inhibición por contacto en la interacción célula-célula..**

La pérdida del contacto célula-célula y célula-matriz se considera esencial en los estadios tempranos de la metastasis tumoral (Radisky 2005). Se ha mostrado que AhR es un regulador transcripcional de Slug, el cual reprime a la proteína de uniones adherentes E-cadherina e induce la pérdida de contactos célula-célula por el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) (Ikuta and Kawajiri 2006; Ikuta *et al.* 2009). En nuestro laboratorio hemos mostrado que el silenciamiento estable de AhR induce un fenotipo de EMT que se ve potenciado por la activación de la señalización dependiente de TGF- $\beta$  (Rico-Leo *et al.* 2013). Por otro lado, la pérdida de los contactos célula-célula puede resultar en la translocación nuclear y en la activación de AhR (Ikuta *et al.* 2004).

### ***Alteración de la remodelación de la matriz celular y la interacción célula-matriz.***

La remodelación de la matriz y las interacciones célula-matriz son de gran importancia en la patogénesis tumoral (Hanahan and Weinberg). Varias proteasas de matriz extracelular están reguladas por AhR, y así, el tratamiento con TCDD aumenta la expresión de metaloproteasas que mejoran la invasión de células de melanoma transformadas (Villano *et al.* 2006). En condiciones basales, la deficiencia de AhR modula los niveles de elastasa y del complejo plasminógeno/plasmina (Gomez-Duran *et al.* 2006), así como de la MMP2 (Santiago-Josefat *et al.* 2004; Mulero-Navarro *et al.* 2005), en fibroblastos murinos, lo que probablemente esté relacionado con la menor capacidad invasiva de estas células.

### ***Regulación de la angiogénesis***

Resultados del nuestro y de otros laboratorios muestran que los ratones que carecen de AhR tienen alteraciones en el sistema vascular (Fernandez-Salguero *et al.* 1997; Lahvis *et al.* 2000; Lahvis *et al.* 2005; Sauzeau *et al.* 2011) y una deficiente respuesta angiogénica (Maltepe *et al.* 1997) que compromete el desarrollo tumoral en modelos experimentales de *xenografts* (Roman *et al.* 2009). Nuestros estudios han mostrado adicionalmente que el efecto de AhR sobre angiogénesis tiene lugar tanto sobre la propia célula endotelial vía VEGF (*vascular endothelial growth factor*) como sobre el estroma tumoral a través de TGF $\beta$  (Roman *et al.* 2009).

### ***Modulación de la inflamación.***

AhR desempeña una función importante en la regulación de la inflamación, lo que podría contribuir a su implicación en la progresión del cancer {Gasiewicz, 2008 #155}. Este papel se ha propuesto que tiene lugar por interacción con la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B a nivel del componente RelB. En este sentido, se ha observado la existencia de complejos RelB/AhR que pueden unirse al promotor de genes diana de ambos reguladores transcripcionales (c-myc) en células de hepatoma humano HepG2, de mama MDA-MB-231 y linfoides (Yang *et al.* 2005). Por otro lado, se ha propuesto que la activación de la expresión de COX-2 por AhR podría contribuir a procesos inflamatorios asociados a progresión tumoral (Degner *et al.* 2009).



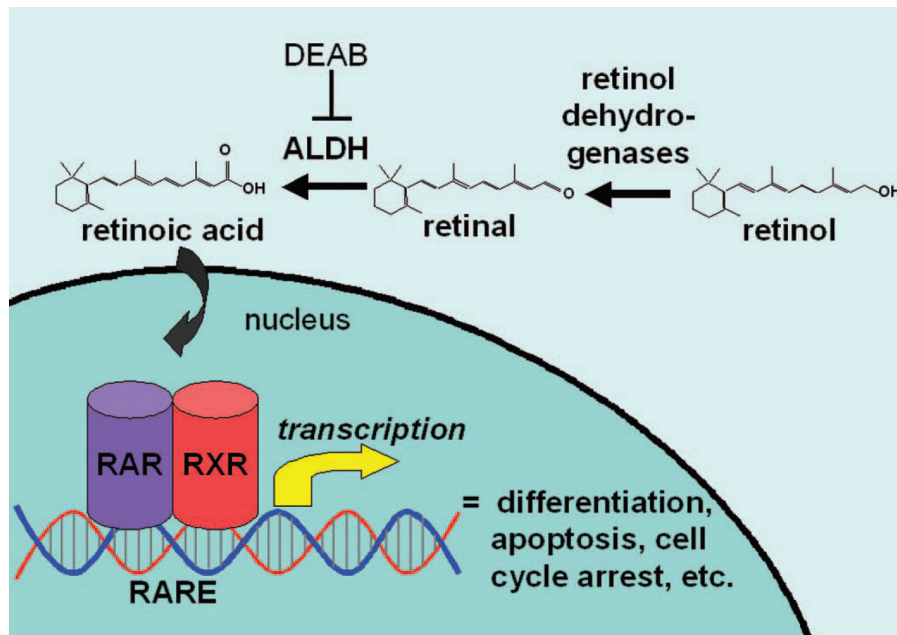
Podemos por tanto concluir que AhR está involucrado en vías de señalización críticas para el control de la homeostasis celular y que su desregulación probablemente tenga un papel relevante en el inicio y/o la progresión tumoral. Una cantidad cada vez mayor de estudios en humanos y en animales de experimentación demuestran que AhR tiene una función dual como oncogén o como supresor tumoral dependiendo del fenotipo de la célula diana y del microentorno en el que se desarrolle el tumor. En este sentido, es razonable pensar que AhR puede ser un posible marcador diagnóstico y pronóstico en cáncer y, eventualmente, una diana terapéutica. Sobre estos aspectos se centra actualmente buena parte del trabajo en el campo y son el foco de la investigación de nuestro laboratorio.

## **ALDEHIDO DESHIDROGENASA (ALDH1A1).**

Las aldehído deshidrogenasas (Aldh) son una familia de enzimas compuesta por 19 isoformas que están localizadas en el citoplasma, mitocondria o núcleo de la célula. Son las responsables de las reacciones de oxidación de los aldehídos a ácidos carboxilos.

Los aldehídos son generados por una amplia variedad de procesos bioquímicos entre los que se incluyen la degradación oxidativa de las membranas lipídicas (peroxidación lipídica) y el catabolismo de neurotransmisores, aminoácidos y carbohidratos. Los aldehídos tienen efectos contrapuestos en la célula, de modo que mientras que algunos tienen funciones clave en procesos fisiológicos como la visión, la neurotransmisión y el desarrollo embrionario, otros son citotóxicos y necesitan ser detoxificados por las aldehído deshidrogenasas (Marchitti *et al.* 2008).

Además de esta importante función detoxificadora, las Aldhs realizan otras actividades sirviendo como proteínas de unión para andrógenos y colesterol y como agentes antioxidantes gracias a la producción de NADPH (Sladek 2003; Black and Vasiliou 2009). Dentro de la familia de Aldhs, las isoformas denominadas retinaldehído deshidrogenasas tienen un papel relevante en la ruta de señalización del ácido retinoico mediante la producción de retinal todo-trans y de 9-cis-retinal, moléculas que han sido relacionadas con diferenciación celular y con el fenotipo de las células madre (Ginestier *et al.* 2009)



**Figura 1.9.** Función de las aldehído deshidrogenasas (Aldh) en la señalización del ácido retinoico. El retinol (vitamina A) es captado por la célula y oxidado por las deshidrogenasas para dar lugar a retinal. El retinal es a su vez oxidado por las Aldhs citoplasmáticas producido ácido retinoico. El retinal es el sustrato preferente de las isoformas Aldh1a1, Aldh1a2, Aldh1a3 and Aldh8a1. Una vez sintetizado, el ácido retinoico difunde al núcleo donde contribuirá a la activación de los receptores RAR y RXR, iniciando de este modo la transcripción de genes que contienen elementos de respuesta a ácido retinoico. Dependiendo del contexto celular, esta ruta de señalización puede dar lugar a diferenciación, apoptosis y/o arresto en el ciclo celular. La adición del compuesto dietilamino-benzaldehído (DEAB) bloquea la producción y la señalización por ácido retinoico.

e 004;  
 ( ente  
 e za y  
 cuello y próstata (Ginestier *et al.* 2007; Silva *et al.* ; Ucar *et al.* 2009; van den Hoogen *et al.*). En melanoma humano, sin embargo, la expresión y las funciones de las Aldhs son controvertidas. Así, mientras algunos investigadores no encuentran asociación entre actividad Aldh1a1 e iniciación tumoral {Prasmickaite, 2010 #231}, otros estudios utilizan precisamente esta enzima para seleccionar células madre de melanoma {Boonyaratanakornkit, 2010 #232}. En este contexto, un estudio reciente ha mostrado que las isozimas Aldh1a no sólo son marcadores de células madre tumorales en melanoma sino que también tienen un papel relevante en supervivencia, proliferación y quimioresistencia, lo que las hace atractivas dianas terapéuticas en esta enfermedad (Luo *et al.* 2012).

## **ALDH1a1 y AhR**

Hasta el momento no se ha descrito la existencia de relación funcional entre Aldh y AhR en melanoma. Sin embargo, si se ha mostrado que la sobre-expresión de AhR disminuye la expresión de Oct4 y la actividad aldehído deshidrogenasa durante la diferenciación de células de leucemia mieloblástica (Bunaciu and Yen). Por otro lado, la activación de AhR por el ligando exógeno beta-naftoflavona ( $\beta$ -NF) o por la inserción de una forma constitutivamente activa reduce el número de mamíferas con alta actividad Aldh1 {Zhao S, 2012 #1303}



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



### **1. Cultivo de líneas celulares.**

Las líneas celulares utilizadas han sido las de melanoma de ratón B16F10 y las de melanoma humano HBL, C8161, A375, DOR, HMEL-1 y HMEL-11. Adicionalmente, hemos empleado fibroblastos inmortalizados de ratón FGM (Mulero-Navarro *et al.* 2005), y células de endotelio murino MAEC (Roman *et al.* 2009). Todas ellas se cultivaron en medio DMEM (BioWhittaker, Lonza) suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS) inactivado, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml. (BioWhittaker, Lonza) y L-glutamina 2 mM, a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2. Modelos animales.**

Los ratones mutantes para AhR, así como los animales control del mismo fondo genético (C57BL6/N x 129/Sv), fueron producidos por recombinación homóloga en células embrionarias (ES) como se describe (Fernandez-Salguero *et al.* 1995). Ambas líneas de ratones se encuentran en el animalario de la Universidad de Extremadura en el campus de Badajoz. Todos la experimentación animal se ha realizado siguiendo protocolos aprobados por el comité de Bioética de la Universidad de Extremadura.

### **3. Producción de líneas celulares conteniendo diferentes niveles de expresión de AhR y de Aldh1a1 por transducción retroviral.**

Para analizar el efecto de diferentes niveles de expresión y de activación de AhR en tumorigénesis primaria y en metástasis tumoral, se produjeron líneas celulares estables a partir de células de melanoma B16F10. Esta línea celular fue seleccionada ya que la única tanto de origen murino como humano que tiene capacidad para inducir tumores en ratones inmunocompetentes, lo que es esencial para los experimentos encaminados a analizar cómo la expresión de AhR en el estroma afecta a la progresión y a la metástasis del melanoma. Para ello se empleó transducción retroviral con una forma constitutivamente activa de AhR (CA-AhR) así como con un small-hairpin RNA para AhR (sh-AhR) con capacidad para inhibir la expresión del receptor. Adicionalmente produjimos con la misma metodología una línea B16F10 conteniendo simultáneamente sh-RNAs para AhR y para la Aldh1a1 (sh-AhR+ sh-Aldh1a1) y una línea de células endoteliales de ratón (MAEC) en la que se introdujo el vector sh-AhR. Como control de los niveles endógenos de AhR en las células B16F10 empleamos sobrenadantes virales

conteniendo los vectores vacíos pBABE+LMP (wt-AhR). Para los ensayos de seguimiento de metástasis in vivo, estos mismos vectores fueron introducidos en células B16F10:LUX que expresan establemente el gen de la luciferasa de renilla. Con el fin de modular la expresión de AhR en células de melanoma humanas se transfirieron células A375 con el vector de expresión del sh-AhR.

Para la producción de los retrovirus correspondientes, se cultivaron las células empaquetadoras Phoenix a un 30% de confluencia. A 4 µg de DNA de cada uno de los vectores (pBABE:CA-AhR, LMP:sh-AhR, LMP:shAhR+shAldh1a1, pBABE-LMP; pBABE:CA-AhR:LUX, LMP:sh-AhR:LUX, LMP:shAhR+shAldh1a1:LUX, pBABE-LMP:LUX) se le añadieron 500 µl de H<sub>2</sub>O y la misma cantidad de CaCl<sub>2</sub> 0.5 M. Se preparó una solución conteniendo 980 µl de buffer HNP<sup>1</sup> y 20 µl de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> que se añadió gota a gota y con agitación suave a la mezcla de DNA anterior. Tras una incubación de 15 min a temperatura ambiente, las soluciones de DNA fueron añadidas a las células empaquetadoras Phoenix creciendo en 8 ml de medio DMEM suplementado con 10% FBS, penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml. Las células se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 20 h; transcurrido ese tiempo, se eliminó el medio de cultivo que fue sustituido por medio fresco. En el caso de la transfección con sh-AhR se observaron las placas por microscopia de fluorescencia para determinar la eficiencia del proceso ya que el vector empleado contiene el gen que codifica la proteína fluorescente verde (Enhanced green fluorescence protein, EGFP). A las 48 h de la transfección, se recogieron 9 ml de sobrenadante vírico y se pasaron por un filtro estéril de 45 µm. Tras añadir 9 µl de polibreno (para minimizar la repulsión de cargas) a los 9 ml de sobrenadante vírico, éste fue añadido a un cultivo de células B16F10 previamente sembradas en una placa de 6 pocillos al 30% de confluencia. A continuación, la placa fue centrifugada a 1500 rpm durante 30 min e incubada durante 20 h a 37°C en un incubador al 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, se eliminó el medio de transducción y se añadió medio fresco. Para la obtención de clones estables conteniendo las distintas formas de AhR, las transfecciones se seleccionaron en presencia de 1 µg/ml del antibiótico puromicina (Invitrogen).

La forma constitutivamente activa de AhR fue un regalo del Dr. Y. Fujii-Kuriyama (Universidad de Tsukuba, Japón) y se produjo delecionando el dominio PAS-B de unión de ligando a partir de la proteína silvestre (Ito *et al.* 2004).

---

<sup>1</sup> HNP: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,4 mM, NaCl 280 mM y Hepes 10 mM a pH 7,1.



En cuanto al vector de expresión conteniendo el shRNA frente a AhR, se usó la herramienta informática RNAi Central RNAi Oligo Retriever (<http://katahdin.cshl.org:9331/homepage/siRNAi.cgi?type=shRNA>) para diseñar oligonucleótidos que contienen secuencias específicas de 22 nucleótidos de longitud a partir de la secuencia codificante de AhR (5'-TTCAGTGTATCTTGTAAGAAA-3'). El shRNA para ALDH1a1 (5'-ACGGCTCTTCACCTGGCAT-3') se sintetizó a partir de la secuencia previamente publicada. Las secuencias de los shRNAs fueron clonadas en el vector retroviral LMP(Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **4. Transfección de células en cultivo.**

Para las transfecciones transientes, las células se siembran el día antes en placas de cultivo de 35 mm de diámetro a una densidad de  $2 \times 10^5$  células por placa. En el caso de la transfección con LMP:sh-ALDH1A1 y pBABE:AhR se utilizó 1  $\mu$ g de cada vector de expresión y sistemas basados en liposomas “LIPOFECTAMINE™ Reagent Plus” (Life Technologies) o Turbofect (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las transfecciones se realizaron en medio sin suero (OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium, Life Technologies). Tras la transfección, la expresión de los vectores se mantuvo durante 24 h antes de la realización de los experimentos.

#### **5. Inmunocitoquímica.**

Para analizar la expresión y la localización intracelular de proteínas implicadas en la transición epitelio-mesénquima en las líneas de melanoma, las células se sembraron en cristales de 22 mm de lado. Tras un lavado con PBS, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 10-15 min a temperatura ambiente. Para el bloqueo de los epítomos inespecíficos, las monocapas de células se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con solución de bloqueo y se permeabilizaron en PBS conteniendo Tritón X-100 al 0,05% y BSA al 2% (p/v) (PBS-T-BSA). A continuación, se añadió el anticuerpo específico y se incubó a temperatura ambiente en una cámara húmeda durante 1-2 h. Después de lavar el anticuerpo primario con una solución de PBS-Tritón X-100 (PBS-T), se añadió el anticuerpo secundario en PBS-T-BSA y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Tras varios lavados adicionales con PBS-T, los cristales se incubaron con DAPI (2  $\mu$ M disuelto en PBS) durante 10 min a temperatura

ambiente. Tras eliminar el exceso de DAPI, las placas se observaron y fotografiaron en un microscopio confocal FluoView 1000 (Olympus).

**Tabla 1:** Relación de anticuerpos para inmunocitoquímica. y condiciones de uso

Anticuerpo	Proveedor	Dilucion	Incubación
Rat anti-E-cadherina	Calbiochem	1:100	4°C O/N
Mouse anti- $\beta$ -catenina	BD	1:200	4°C O/N
Mouse anti- $\alpha$ -SMA	Sigma	1:100	4°C O/N

## 6. Cultivos primarios de endotelio de aorta de ratón.

Se emplearon ratones de diez a doce semanas de los cuales se extrajo la aorta torácica la cual fue rápidamente lavada en solución Hank's (Life Technologies). Después de retirar con pinzas la capa muscular que rodea la aorta, ésta se cortó en anillos de un grosor máximo de 1 mm que fueron sumergidos en una gota ( $\approx 70 \mu\text{l}$ ) de Matrigel (BD BioSciences) en condiciones estériles. Después de 30 min a 37 °C, con el Matrigel ya polimerizado, se añadió medio de cultivo de células endoteliales de aorta de ratón (MAEC) completo (MAEC-MEM<sup>2</sup>). Tras catorce días en cultivo, el Matrigel que contenía las células se solubilizó usando Matrisperse (BD BioSciences), las células se lavaron con PBS y se volvieron a cultivar en medio MAEC-MEM. La pureza del cultivo endotelial se determinó por citometría de flujo (FACS) empleando el marcador CD102.

## 7. Medida de los niveles de expresión génica.

### 7.1 Extracción de RNA total y retrotranscripción.

Para el análisis de la expresión de los genes de interés a nivel de RNA, se partió de al menos  $10^6$  células para cada condición experimental. El RNA fue purificado

---

<sup>2</sup> **MAEC MEM:** medio DMEM-F12 suplementado con 20% de suero fetal bovino (v/v), penicilina 200 U/ml, estreptomycin 200  $\mu\text{g/ml}$  y Suplemento de Crecimiento para Células Endoteliales (ECGS, *Sigma*) 250 ng/ml (*BioWhittaker, Lonza*).

empleando el kit “High Pure RNA Isolation Kit” (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado el RNA, se determinó su concentración por absorción espectrofotométrica a 260 nm, así como su pureza por el cociente  $A_{260nm}/A_{280nm}$ . Una vez conocida la concentración de RNA, se utilizó 1 µg para la reacción de retrotranscripción que se llevó a cabo empleando el kit “iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR” (BioRad) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

## 7.2. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR a tiempo real

Tras la obtención del cDNA, se realizaron PCR cuantitativas (qPCR) utilizando un termociclador Step One (Applied Biosystems) y la mezcla de reacción “SYBR® Select Master Mix” (Life Technologies). El protocolo empleado fue el siguiente:

Desnaturalización inicial: 5min a 95°C

Desnaturalización: 30 seg a 95°C	}	hasta 50 repeticiones
Hibridación: 30 seg a 59°C		
Extensión: 30 seg a 72°C		
Extensión final: 5 min a 72°C		

Mantenimiento a 4°C

Se utilizó como gen control el de la proteína *Gapdh*, cuya expresión no varía en ninguna de las condiciones experimentales utilizadas. La especificidad de las reacciones de PCR fue comprobada realizando curvas de desnaturalización (*melting curve*) en las que comprobó la aparición de un único pico indicativo de un único producto de PCR. En ciertos experimentos se llevó a cabo la comprobación de los fragmentos amplificados mediante electroforesis en geles de agarosa. Los resultados se representan como la media de las CT (*cycle thresholds*) para el gen que se analiza con respecto a las CT obtenidas para el gen de normalización *Gapdh* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

**Tabla II:** Secuencias de los cebadores empleados en RT-PCR a tiempo real y condiciones de hibridación.

Oligonucleótido	Secuencia	Condiciones de hibridación
<i>Cyp11a1-F mouse</i>	5'-ACAGACAGCCTCATTGAGCA-3'	59 °C 30 s.
<i>Cyp11a1-R mouse</i>	5'-GGCTCCACGAGATAGCAGTT-3'	59 °C 30 s.

<i>Cyp11a1-F human</i>	5'-GCTGACTTCCATCCCTATTCT-3'	59 °C 30 s.
<i>Cyp11a1-R human</i>	5'-GCTCCAGGAGATAGCAGTTG-3'	59 °C 30 s.
<i>Aldh1a1-R mouse</i>	5'-CCATGGTGTGCAAACACTCAAC-3'	59 °C 30 s.
<i>Aldh1a1-F mouse</i>	5'-CTCCTGGCGTGGTAAACATT-3'	59 °C 30 s.
<i>ALDH1a1-R human</i>	5'-CCATGGTGTGCAAACACTCAAC-3'	59 °C 30 s.
<i>ALDH1A1-F human</i>	5'-AAACGGAGGCCAGGATAACT-3'	59 °C 30 s.
<i>Sox2-R mouse</i>	5'-CCGGGAAGCGTGTACTTATC-3'	59 °C 30 s.
<i>Sox2-F mouse</i>	5'-CACAACCTCGGAGATCAGCAA-3'	59 °C 30 s.
<i>Gapdh-R mouse</i>	5'-CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG-3'	59 °C 30 s.
<i>Gapdh-F mouse</i>	5'-TGAAGCAGGCATCTGAGG G -3'	59 °C 30 s.
<i>Gapdh-R human</i>	5'-TTCTAGACGGCAGGTCAGGT3'	59 °C 30 s.
<i>Gapdh-F human</i>	5'-CCACCCAGAAGACTGTGGAT3'	59 °C 30 s.

## 8. Western blot.

### 8.1. Preparación de extractos proteicos celulares totales.

Los extractos proteicos se obtuvieron a partir de células sembradas en placas de cultivo de 100 mm de diámetro. Se retiró el medio de cultivo y la monocapa se lavó dos veces con PBS<sup>3</sup> frío. Posteriormente, las células se lisaron con 500 µl de tampón de lisis<sup>3</sup> para extractos proteicos totales durante 15 min a 4 °C. El lisado celular se centrifugó a 10.000 g durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante de esta centrifugación se recogió y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### 8.2. Medida de la concentración de proteína.

La concentración de proteína de los extractos celulares se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford, utilizando el reactivo Coomassie plus protein assay reagent (Pierce) y albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Tras realizar la reacción colorimétrica, se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de

<sup>3</sup> **Tampón de lisis para extractos proteicos totales:** 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 270 mM sacarosa, 10 mM β-glicerol-fosfato, 5 mM pirofosfato sódico, 50 mM fluoruro sódico, 1% (v/v) Tritón X-100, 0.1 mM ortovanadato sódico, 1 % (v/v) β-mercaptoetanol, 4 µg/µl inhibidor de proteasas COMPLETE.

595 nm y los valores obtenidos se interpolaron en una recta patrón construida con cantidades conocidas de albúmina de suero bovino (BSA).

### 8.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y transferencia a membranas de nitrocelulosa.

Para la realización de electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida se ha utilizado el sistema de tampón discontinuo descrito por Laemmli (Laemmli 1970). Alícuotas conteniendo entre 20 y 30 µg de los correspondientes extractos proteicos se mezclaron con el volumen adecuado de tampón de carga para proteínas<sup>4</sup> y se desnaturizaron por incubación a 95 °C durante 5 min. Las proteínas se separaron en función de su peso molecular sometiénolas a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes por la presencia del detergente iónico SDS (SDS-PAGE)<sup>5</sup>. Se emplearon geles de poliacrilamida a concentraciones finales del 8 % ó 10 %, dependiendo del peso molecular de la proteína en estudio. Una vez realizada la separación electroforética, las proteínas presentes en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories) por aplicación de un campo eléctrico en una cubeta que contiene una solución de transferencia de composición iónica definida<sup>6</sup>. La transferencia se realizó a 4 °C durante 16 h a 80 mA, o bien durante 2 h a 50 V cuando se transfirieron proteínas de bajo peso molecular. Tras la transferencia, las membranas fueron teñidas con el colorante reversible Ponceau S<sup>7</sup>, lo que permitió comprobar la eficacia de la transferencia así como la homogeneidad de carga para las diferentes muestras. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas durante 2 h a temperatura ambiente en solución de bloqueo para Western blot<sup>8</sup> e incubadas con el correspondiente anticuerpo primario empleando la dilución y las condiciones indicadas en la Tabla III. Tras 4 lavados de 15 min cada uno en TBS-T,<sup>9</sup> las membranas se hibridaron durante 45 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP). A continuación, las membranas fueron sometidas

---

<sup>4</sup> **5 x tampón de carga para proteínas:** Tris-HCl 62.2 mM pH 6.8, SDS 10% (p/v), glicerol 50% (v/v), azul de bromofenol 0.025% (p/v), β-ME 20% (v/v).

<sup>5</sup> **Tampón de electroforesis:** Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1% (p/v).

<sup>6</sup> **Tampón de transferencia:** Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% (v/v).

<sup>7</sup> **Ponceau S:** Ponceau S 0.5% (p/v), ácido acético 5% (v/v).

<sup>8</sup> **Solución de bloqueo para Western blot:** leche desnatada en polvo al 5% (p/v) disuelta en TBS-T.

<sup>9</sup> **TBS-T:** Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 75 mM, Tween-20 0.2% (v/v).

a 4 lavados adicionales de 15 min cada uno en TBS-T y a un lavado final de 5 min en TBS<sup>10</sup>. Finalmente, se añadió el sustrato quimioluminiscente SuperSignal Chemiluminescent Substrate (Pierce) durante 5 min a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron con películas KodaK BioMax light film (Sigma-Aldrich) que fueron después escaneadas para su análisis por densitometría.

**Tabla III:** Anticuerpos empleados para el análisis de proteínas por Western blot.

ANTICUERPO	PROVEEDOR	DILUCIÓN	INCUBACIÓN
Rabbit anti-AhR	Inmunostep	1:1000	T.A. 3h 4° toda la noche
Rabbit anti-caveolin-1	BD	1:2000	T.A. 3h
Rat anti-E-cadherina	Calbiochem	1:1000	T.A. 3h
Anti-beta-catenina	BD	1:12000	T.A. 3h
Mouse anti-Fibronectina	Sigma	1:500	T.A. 3h
Mouse anti- $\alpha$ -SMA	Sigma	1:1000	T.A. 3h
Anti-Snail	Santa Cruz	1:1000	T.A. 3h
Rabbit anti- $\beta$ -Actina	Sigma	1:1000	T.A. 3h
Rabbit anti-GAPDH	BD	1:1500	T.A. 3h

### 9. Inyección de células tumorales en ratón (Ensayo de xenografts)

En los experimentos de *xenografts*, se emplearon ratones receptores con edades comprendidas entre las 8 y 10 semanas. Para los ensayos con células de melanoma B16F10, alícuotas de  $1 \times 10^5$  células diluidas en 200  $\mu$ l de PBS, y creciendo de manera exponencial, se inyectaron subcutáneamente en ambos flancos de diez ratones de genotipo *AhR*<sup>+/+</sup> o *AhR*<sup>-/-</sup>.

Para los ensayos de *xenografts* conteniendo células estromales, se inyectaron subcutáneamente  $4 \times 10^4$  fibroblastos o células microvasculares de aorta (representativas del microentorno) conjuntamente con  $1 \times 10^5$  células de melanoma, todo el conjunto diluido en 200  $\mu$ l de PBS. Los tumores formados se recuperaron tras quince días y se

<sup>10</sup> TBS: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 75 mM.

midieron empleado un calibre. El volumen tumoral se calculó empleando la fórmula [longitud x anchura<sup>2</sup>/2]. Al mismo tiempo se determinó el peso de los tumores. Después de fijar los tumores en formol durante 24 h a temperatura ambiente, los tejidos se deshidrataron y se incluyeron en parafina. Se realizaron secciones de 3 µm empleando un micrótopo las cuales se procesaron para histología o inmunofluorescencia.

### **10. Inducción de metástasis y extravasación.**

Se utilizaron ratones con las mismas características indicadas anteriormente. Se inocularon  $1 \times 10^5$  células de melanoma disueltas en 100 µl de PBS por la vena lateral de la cola previamente dilatada por calor o por aplicación de agua caliente. A los 21 días de la inoculación de las células tumorales, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, realizándose la autopsia y el estudio macroscópico de todos los órganos, especialmente del pulmón. Los nódulos metastásicos fueron cuantificados contabilizando todos aquellos que eran observables en la superficie de los lóbulos pulmonares.

En los experimentos de extravasación, las células de melanoma se tiñeron con 5 µM del reactivo *cell tracker green* CMFDA durante 1 hora. A continuación se inyectaron alícuotas de  $1 \times 10^6$  células diluidas en 100 µl de PBS. Tras 48 h se inyectaron por la vena de la cola 100 µl de la lectina de *Griffonia simplicifolia* marcada con rodamina con el fin de visualizar los capilares sanguíneos. A los 45 minutos se sacrificaron los ratones y se extrajeron los pulmones. Tras su fijación con formol e inclusión en parafina se seccionaron a 10 µm y se observaron por microscopia de fluorescencia.

### **11. Seguimiento de metástasis tumoral in vivo**

Para el seguimiento de metástasis in vivo se usaron ratones C57BL6 albinos de 8 semanas de edad. Se inyectaron  $1 \times 10^6$  células de las líneas B16F10 marcadas con luciferasa (pBABE:CA-AhR:LUX, LMP:sh-AhR:LUX, LMP:shAhR+shAldh1a1:LUX, pBABE-LMP:LUX) diluidas en 50 µl de medio DMEM por la vena lateral de la cola. Los animales se analizaron al tiempo de la inyección de las células (tiempo 0) y tras 2, 7, 11, 14 y 21 días. Para ello se inyectaron i.p. 30 mg de luciferina disueltos en 100 µl de PBS en cada ratón, tras lo cual, e inmediatamente, se introdujo el animal en la cámara de un equipo de captura de luminescencia IVIS (Xenogen). El ratón se mantuvo anestesiado con isofluorano y se tomaron fotografías en posición dorsal y ventral. El último día se

sacrificaron los animales y se tomaron fotografías de todos los órganos, los cuales fueron fijados en formol tamponado. La emisión de luminiscencia es monitorizada como fotones emitidos/cm<sup>2</sup> empleado el *Living Image* software (Xenogen).

### **12. Ensayos de invasión en matrigel y de migración en colágeno.**

Los experimentos de invasión y de migración celular fueron realizados usando *transwells* recubiertos con una capa de 150 µm de Matrigel o de colágeno (BD BioSciences). Alicuotas de  $1.5 \times 10^4$  células de melanoma se cultivaron en el compartimento superior de la cámara en medio OptiMEM. En la cámara inferior, se añadió medio DMEM-F12 completo conteniendo 10 ng/ml de *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1, Sigma) como quimioatrayente. Después de 24 h, los transwells se lavaron con PBS, se fijaron a 4 °C con etanol al 70% y se trataron con RNAsa (10 ng/ml, Sigma) durante 15 min. Finalmente, las células se tiñeron con yoduro de propidio (Sigma). El nivel de invasión en Matrigel o de migración en colágeno se analizaron mediante la deconvolución de fotografías hechas cada 5 µm en el eje Z en un microscopio confocal FluoView FV1000 (Olympus).

### **13. Ensayo de herida en placa.**

Las líneas de melanoma se sembraron en placas de 35 mm a una confluencia del 90-100% y se dejaron adherir durante 12 h. A continuación, se retiró el medio y con una punta de micropipeta de 200 µl se hizo una herida recta en la placa. Tras lavar con medio sin suero, se añadieron 3 ml de medio fresco también carente de suero y las placas se incubaron durante 15 h a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. La herida fue monitorizada empleando un microscopio invertido con el que se tomaron imágenes a tiempos 0, 12 y 24 h. La migración se representó como la distancia real recorrida por las células en el periodo de 24 h (migración = distancia entre fillos a 0 h - distancia entre fillos a 24 h).

### **14. Ensayos de formación de clones.**

Para los ensayos de clonicidad en 2 dimensiones (2-D) se sembraron 500 células en placas de 6 pocillos en medio completo. Tras 6 días de cultivo, las células se lavan 2 veces con PBS y se fijan con etanol al 70 % durante 10 min, tras lo cual se tiñen con cristal violeta 0.5 % (p/v) y los clones formados se cuentan bajo la lupa. Para la



formación de clones en 3-D se sembraron  $1.5 \times 10^4$  células en placas de 24 pocillos sobre 100  $\mu\text{l}$  de Matrigel previamente solidificado. A las 48 horas se evaluó el número de clones formados y se tomaron imágenes con el fin de analizar su morfología y *spreading*. La formación de clones en medio condicionado se realizó siguiendo el mismo protocolo pero añadiendo a día 1 medio condicionado por fibroblastos murinos o por células microvasculares de aorta de ratón. Para la formación de clones usando co-cultivos, se sembraron primero los fibroblastos hasta alcanzar confluencia, tratándose después durante una hora con mitomicina c 25  $\mu\text{g/ml}$ . Tras 3 lavados con PBS, se sembraron 500 células de melanoma sobre la monocapa de fibroblastos. A los 7 días los clones se observaron empleando un microscopio invertido.

### **15. Formación de melanosferas**

Se sembraron  $3 \times 10^4$  células de melanoma (murinas y humanas) en placas de 24 pocillos de baja adherencia (Nunc) y se dejaron crecer a 37 °C y 5%  $\text{CO}_2$  durante 24 h. Tras este tiempo, se tomaron imágenes con un microscopio Cell-R (Olympus) y se cuantificó tanto el número de esferas como su tamaño usando el software *ImageJ*. Las esferas se disociaron y se resuspendieron en PBS conteniendo 0.1 % BSA. Seguidamente, se incubaron con anticuerpos anti-CD133, anti-CD44 y anti-CD29 durante 30 min a 10 °C y se analizaron con un citómetro Cytomics FC500 (Beckman Coulter).

### **16. Inmunohistoquímica.**

Las secciones de tejidos previamente fijadas e incluidas en parafina, fueron desparafinadas en xilol y rehidratadas gradualmente hasta PBS. Una vez hidratadas, se inactivó la actividad peroxidasa endógena por incubación en PBS-Triton X100 (PBS-T) conteniendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 45 min. Tras lavar con PBS-T, se llevó a cabo el bloqueo de los epítomos inespecíficos en la misma solución conteniendo gelatina 2 g/L y lisina 0.1 M (PBS-T-G-Lys). A continuación, las secciones se incubaron durante 16-18 h con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución PBS-T-G. Tras varios lavados con PBS-T-G, las secciones fueron incubadas durante 1 h con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente. Una vez lavado el exceso de anticuerpo secundario, las secciones se incubaron con estreptavidina-peroxidasa y se revelaron empleando una solución de diaminobencidina (DAB). Tras parar la reacción con PBS, se llevó a cabo un proceso de deshidratación y de montaje empleando Eukitt (Kindler GmbH). Las

secciones se visualizaron y se fotografiaron en un microscopio Zeiss. Los anticuerpos empleados y sus condiciones de uso se indican en la Tabla V.

**Tabla V:** Anticuerpos usados para inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Proveedor	Dilución	Incubación
Rabbit anti-AhR	Inmunostep	1:100	2h RT
Rabbit anti-Caveolina-1	BD	1:100	2h RT

### **17. Medida de la actividad aldehído deshidrogenasa.**

Para analizar la actividad de la enzima Aldh1a1 se usó el kit comercial ALDEFLUOR (STEMCELL Technologies) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se incubaron las células de melanoma durante 60 min a 37 °C con el agente Aldefluor sólo o en combinación con el inhibidor de la enzima dietilamino-benzaldehído (DEAB). Alícuotas de  $10^4$  células fueron analizadas usando un citómetro Cytomic FC500 (Beckman Coulter). Las células no viables fueron excluidas del análisis por tinción con yoduro de propidio. La actividad enzimática se normalizó con respecto al control DEAB. Los datos fueron analizados usando el software del propio equipo.

### **18. Medida de la activación de integrina $\beta 1$ .**

Las células fueron crecidas durante 48 h en medio completo. Se realizaron dos prelavados con PBS-EDTA 2 mM y se procedió a su levantamiento por incubación con PBS-EDTA durante 10-20 min. Tras un lavado con medio de cultivo, las células se centrifugaron y se resuspendieron en PBS+BSA al 0.5 % a razón  $3 \times 10^5$  células por condición de ensayo. En ciertos experimentos, se incluyó  $MnCl_2$  como activador de la integrina a concentraciones de entre 0.5 y 2 mM. Tras una incubación de 10 min en hielo, se añadió el anticuerpo frente a integrina  $\beta 1$  activa antiCD29 (9EG7) (Pharmlingen) diluido 1:100 en PBS+BSA al 0.5% durante 30 min. En muestras paralelas se adicionó el anticuerpo frente a integrina  $\beta 1$  total anti- $\beta 1$ -FITC (Millipore) diluido 1:200 durante 30 min. Las células fueron lavadas dos veces con PBS o PBS+ $MnCl_2$  0.5 mM. En el caso del ensayo de activación (9EG7), se procedió al marcaje de las células durante 30 min en oscuridad con un anticuerpo anti-rat-Alexa 488 (Sigma) a una dilución 1:200. Tras lavar

el exceso de anticuerpo dos veces, las células fueron finalmente resuspendidas en 500  $\mu$ l de PBS y se les añadió yoduro de propidio a 1 mg/ml para discriminar las células muertas. El análisis se llevó a cabo en un citómetro cytomics FC500 (Beckman-Coulter). Se contabilizaron  $10^4$  células por ensayo y se cuantificó la intensidad media de señal de cada población (X-mean).

### **19. Construcción de microarrays de tejido (TMA).**

La construcción de *microarrays* de tejido (TMA) se inició con la recogida de las historias clínicas de los casos de nevus y de melanoma seleccionados para la confección del array, actividad que fue llevada a cabo por dos patólogos del Hospital Universitario Infanta Cristina. Los bloques incluidos en el estudio fueron marcados para seleccionar la zona del tejido más representativa y de cada uno se cortaron cilindros de 2 mm de grosor. Cada cilindro se insertó en un bloque de parafina vacío usando un equipo Beecher MTA-I. Se insertaron triplicados de cada paciente. Una vez completado el array, se introdujo el bloque en una estufa a 37 °C durante 15 minutos para que los cilindros se adhieran a la parafina. Por último se obtuvieron secciones de 4  $\mu$ m que fueron analizadas por inmunohistoquímica. Cada array estuvo compuesto por 20 casos de melanoma, 5 casos de nevus y muestras de otros tejidos como controles positivos para los anticuerpos usados.

### **20. Análisis de células con fenotipo cancer stem-like por citometría de flujo**

El análisis de la población de células con fenotipo *stem* presentes en las líneas de melanoma humano y murino se llevó a cabo con un equipo MoFlo-XDP (Beckman-Coulter) usando criterios ya establecidos. Se tiñeron las células durante 90 min a 37 °C con 5  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich). Las células se centrifugaron y se resuspendieron en tampón HEPES-HBSS. A continuación, se incubaron con fumitremorgin C 50  $\mu$ M (Sigma-Aldrich) con el fin de inhibir la bomba de extrusión ABCG2. Para la discriminación de las células muertas se usó tinción con yoduro de propidio 10 nM. Para cuantificar las subpoblaciones con características SP (*side population*) las células marcadas con Hoechst 33342 se tiñeron para CD133+ (CD133-PE), CD44+ (CD44-PerCP) y CD29+ (CD29-FITC) durante 30 minutos a 10 °C. Para discriminar las células muertas en estos análisis se usó el reactivo To-Pro 0.1  $\mu$ M.

### ***21. Separación de células activadas por fluorescencia.***

Esta técnica permite la clasificación y la separación en condiciones de viabilidad de células provenientes de una mezcla de poblaciones en base a las características particulares de dispersión y de fluorescencia de cada célula. Con ello, se pueden separar subpoblaciones de interés a partir de un cultivo heterogéneo complejo. En nuestro caso se empleó para identificar y producir clones con un nivel elevado y homogéneo de actividad AhR. Para ello, dentro de la población de células B16F10-CA-AhR se realizó una separación por tamaño depositando una única célula en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. De este modo, se pueden propagar clones cuyo contenido y actividad AhR es homogéneo. Esta técnica se aplicó también en la línea celular B16F10-sh-AhR+sh-Aldh1a1, en la que separamos tras teñir con Aldefluor y DEAB aquellas células con baja actividad Aldh1a1.

### ***22. Analisis del ciclo celular mediante el método de Vindelof.***

En primer lugar, se recogen y se centrifugan brevemente los medios de las placas de 24 pocillos en los que están creciendo las células. Se añaden 200  $\mu$ l de solución de Vindelof a cada pocillo y se pipetea suavemente durante 10 minutos. Se comprueba regularmente en el microscopio que los núcleos celulares se han levantado. Se mezcla entonces el contenido de dichos pocillos con los sobrenadantes y se vuelve a pipetear suavemente. Se centrifuga a 3000 rpm durante 8 min y se retira el sobrenadante. Se resuspende entonces en 500  $\mu$ l de PBS, se añade yoduro de propidio 0.003 % y se lleva a cabo el análisis en un citómetro Cytomics FC500 (Beckman Coulter).

### ***23. Medida de la proliferación celular.***

Para analizar la proliferación celular, se sembraron  $10^4$  células en cada pocillo de una placa de 24 pocillos. A intervalos de 12 h se lavan las células con PBS, se tripsinizan y se cuentan con la cámara de Neubauer. Cada tiempo de duplicación se calcula como la media  $\pm$  SD de cada pocillo.

### ***24. Tratamiento estadístico de los datos***

Todos los experimentos se han realizado al menos dos veces, con al menos dos replicas biológicas de cada ensayo. Los datos se muestran por defecto como la media  $\pm$  desviación estándar (SD). En otras ocasiones, los datos se han representado como la mediana o en forma de *box-plot*. También por defecto, el análisis estadístico ha sido realizado aplicando el test T de Student para muestras no pareadas. Otras pruebas estadísticas, como test T de Student para muestras pareadas o el ANOVA de una vía se especifican en los experimentos correspondientes. La generación de gráficos y la significación estadística han sido obtenidas usando el software GraphPad 6.0 y el lenguaje estadístico *R*.



# **CAPÍTULO I**





## **OBJETIVOS**

El objetivo general de este capítulo era analizar la función del receptor de dioxinas en el crecimiento y la metastasis tumoral, y para ello nos propusimos una serie de objetivos específicos:

- Modular la expresión de AhR en líneas de melanoma murino y analizar su efecto en migración e invasión.
- Estudiar la función de AhR en modelos de tumorigénesis y metástasis in vivo, considerando la contribución de su expresión en el estroma.
- Validar el papel de AhR en células y en tejidos de melanoma humano.



## **RESULTADOS I**



## 1. Producción caracterización de líneas de melanoma murino con diferentes niveles de AhR

Para investigar el papel de AhR en melanoma usamos como modelo de estudio la línea murina B16F10, la única aislada hasta el momento, con capacidad para desarrollar tumores en ratones inmunocompetentes. Esto constituye un requisito necesario dado que nos planteamos analizar cómo la expresión de AhR en el microentorno estromal contribuye al crecimiento y la metástasis tumoral, y para ello, es preciso realizar los experimentos en ratones inmunocompetentes *AhR*<sup>-/-</sup>. Mediante transducción retroviral creamos una línea celular derivada de la B16F10 en la que redujimos la expresión de AhR por inserción estable de un RNA interferente (en adelante sh-AhR) y otra en la que integramos una forma constitutivamente activa del receptor (en adelante CA-AhR). Como control del nivel basal de AhR, transdujimos otra línea celular con los vectores retrovirales vacíos (en adelante wt-AhR). Estas líneas fueron en primer lugar analizadas para determinar sus niveles de expresión así como de activación de AhR (Figura R1).

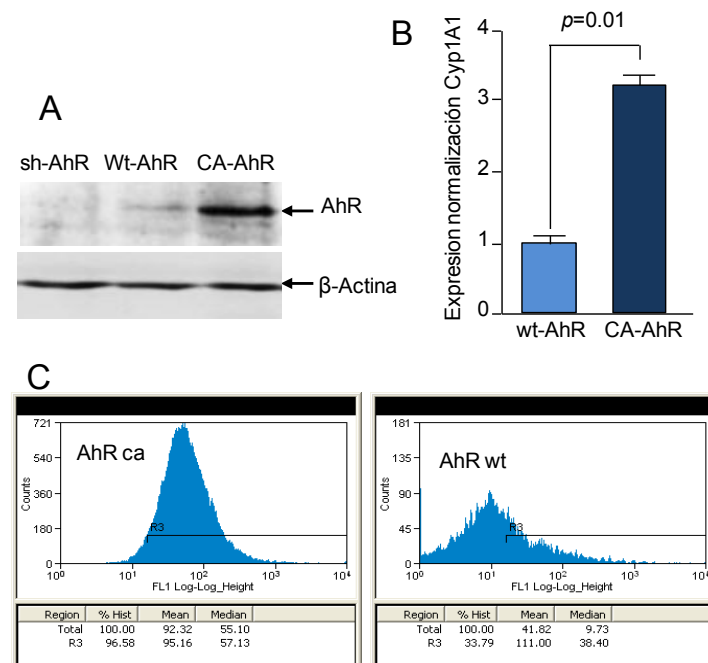


Figura R1. Análisis de los niveles de expresión y de activación de AhR en las líneas B16F10 producidas por transducción retroviral. A: La expresión proteica de AhR fue determinada por inmunoblotting empleando anticuerpos específicos frente a AhR. La expresión de β-actina se empleó como control de carga. B: El nivel de activación constitutiva de AhR en la línea CA-AhR se analizó por qRT-PCR midiendo el incremento en la expresión del gen diana CYP1a1 en ausencia de xenobióticos, los resultados están normalizados con respecto al gen Gapdh. C: Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de AhR nuclear en un clon representativo de la línea CA-AhR con respecto al existente en la línea wt-AhR.

Las células que integraron de forma permanente un sh-RNA para AhR sufrieron un silenciamiento muy significativo en la expresión de la proteína con respecto a los niveles endógenos de la línea wt-AhR (Figura R1A). Con respecto a la forma constitutivamente activada de AhR, tras la selección de los clones, decidimos separar mediante *cell sorting* células individuales y propagarlas hasta formar clones separados. Analizamos entonces la cantidad de AhR nuclear de cada uno de ellos por citometría de flujo mediante el método de Vindeloff y elegimos aquel clon con mayor cantidad de AhR nuclear en relación a la que presentan las células control wt-AhR (Figura R1C). El clon CA-AhR que fue seleccionado para este estudio expresó niveles significativamente elevados de receptor con respecto a los existentes en la línea silvestre (Figura R1A). Como se mencionó en el apartado de Introducción, AhR es un factor de transcripción que regula la actividad transcripcional de genes diana implicados en la destoxificación de xenobióticos. Para comprobar que las células CA-AhR tenían activación constitutiva de AhR en ausencia de ligando exógeno, analizamos por qRT-PCR la expresión a nivel de mensajero de su gen diana *Cyp1a1*. Como se observa en la Fig. R1B, el clon CA-AhR tiene una expresión constitutiva de *Cyp1a1* significativamente elevada, lo que confirma la sobre-activación del receptor.

A continuación analizamos si los cambios en los niveles de AhR afectaban a la proliferación celular. La medida de la capacidad de duplicación con respecto al tiempo mostró que tanto la línea sh-AhR como la CA-AhR tenían una capacidad proliferativa similar a la de las células wt-AhR (Figura R2A). El análisis de distribución en el ciclo celular confirmó estos resultados ya que no se observaron diferencias significativas en la proporción de células en ninguna de sus fases (Figura R2B). La modulación de los niveles de AhR tampoco afectó a la apoptosis basal presente en los cultivos. (Figura R2B).

*Estos resultados indican que tanto la reducción como el incremento de expresión de AhR no afecta de manera significativa la proliferación de las células de melanoma murino B16F10.*

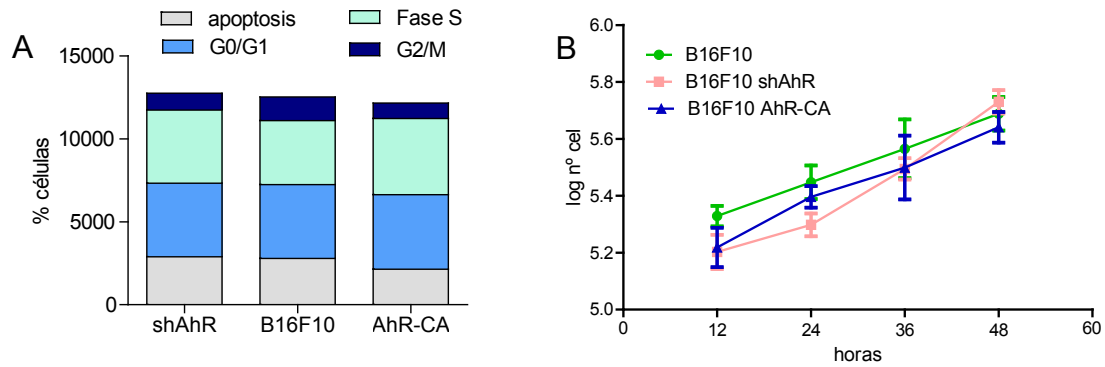


Figura R2. A: La capacidad proliferativa fue determinada por el incremento en el número de células en intervalos de 12 horas. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  SD de ensayos realizados en triplicado. B: La distribución de células en las distintas etapas del ciclo celular fue analizada por citometría de flujo. Los datos representados corresponden a la media de dos experimentos realizados por triplicado.

## 2. El silenciamiento de AhR promueve el crecimiento y la metástasis tumoral

Una vez caracterizadas las líneas celulares de melanoma, quisimos evaluar cómo la pérdida o la ganancia de función del receptor de dioxina afectaba el crecimiento y metástasis tumoral

Para analizar el crecimiento tumoral inyectamos las líneas sh-AhR, wt-AhR y CA-AhR en ambos flancos dorsales de ratones silvestres para AhR (*AhR*<sup>+/+</sup>). Los ratones se observaron regularmente y a los 15 días fueron sacrificados. Los tumores fueron extraídos, medidos y pesados y algunos ejemplares representativos incluidos en parafina para posteriores análisis histológicos e inmunohistoquímicos.

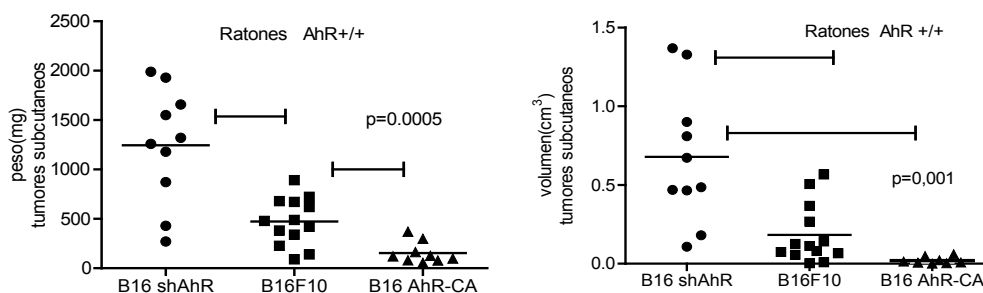


Figura R3. La reducción en la expresión de AhR incrementa la tumorigenesis primaria. Las células sh-AhR, wt-AhR, CA-AhR fueron inyectadas en ambos flancos de ratones *AhR*<sup>+/+</sup>. A los 15 días de la inyección se recuperaron los tumores que fueron pesados (A) y medidos (B). El volumen tumoral fue calculado aplicando la siguiente fórmula;  $V = X^2 * Y / 2$  donde X e Y se corresponden con el ancho y el largo de la pieza tumoral, respectivamente.

Los resultados mostraron una relación inversa entre la expresión de AhR y la tumorigénesis primaria. Las células sh-AhR indujeron tumores de mayor peso y las CA-AhR de menor peso que los que produjo la línea wt-AhR (Figura R3A). El mismo patrón se observó al determinar el volumen de los tumores, siendo aquel mayor en los procedentes de células sh-AhR y menor en los CA-AhR con respecto a los correspondientes a células wt-AhR (Figura R3B).

Para analizar la capacidad de estas líneas celulares para inducir metástasis pulmonares, las inyectamos por la vena de la cola en ratones *AhR*<sup>+/+</sup> y analizamos las metástasis producidas a los 21 días. Observamos que la línea celular donde hemos silenciado AhR produjo nódulos metastásicos que fueron de mayor tamaño y en mayor número que los producidos por las células wt-AhR y CA-AhR (Figura R4A,B). En este caso, no se observaron diferencias significativas en capacidad metastásica entre las líneas wt-AhR y CA-AhR (Figura R4A,B), sugiriendo que el AhR endógeno parece ser suficiente para activar el programa pro-metastásico en pulmón. Para descartar la posibilidad de que la menor eficiencia metastásica observada en las células wt-AhR y CA-AhR fuera consecuencia de su menor capacidad para salir al parénquima pulmonar desde los capilares, realizamos experimentos de extravasación. Pudimos determinar que la capacidad de extravasación 48 h tras la inyección es similar en todas las líneas celulares en estudio (Figura R4C), lo que descarta que la extravasación sea un parámetro relevante en el efecto que provoca AhR sobre la metástasis pulmonar.

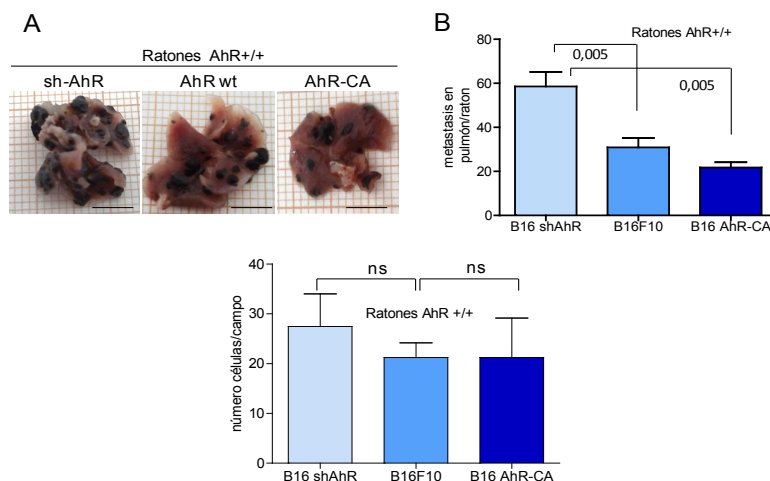


Figura R4. La reducción en la expresión de AhR incrementa la metástasis pulmonar. (A) Pulmones representativos obtenidos tras la inyección de células sh-AhR, wt-AhR y CA-AhR en la vena de la cola de ratones *AhR*<sup>+/+</sup>. (B) A los 21 días desde la inyección, se contabilizó el número de nódulos metastásicos formados en los pulmones. (C) Cuantificación del número de células extravasadas al pulmón a las 48 h desde la inyección. Barra error, 1 cm



*La reducción en los niveles de AhR favorece desarrollo del melanoma y su metástasis a pulmón mientras que su sobre-activación bloquea ambos procesos. Resulta por tanto que AhR tiene función supresora cuando se expresa en la célula tumoral.*

### **3. El silenciamiento de AhR provoca una mayor migración e invasión de células de melanoma.**

Dos de las características que las células tumorales deben adquirir para separarse del tumor primario y colonizar otros tejidos son la migración y la invasión. La capacidad metastática está estrechamente relacionada con la transición epitelio-mesénquima (EMT) que se cree proporciona a la célula tumoral un fenotipo mesenquimal y migratorio, el cual está asociado a cambios en la morfología celular y tiene su base molecular en la activación de programas de expresión que regulan las uniones célula-célula y célula-sustrato.

Por ello, decidimos investigar si el fenotipo de tumorigenesis primaria y de metástasis dependiente de AhR estuviera asociado o fuera consecuencia de una diferente capacidad migratoria e invasiva. Experimentos de formación de clones en dos dimensiones (2-D) nos permitió determinar que las células sh-AhR crecen formando colonias menos compactas y más extendidas que las wt-AhR y CA-AhR, que son las que forman los clones más compactos (Figura R5A). Adicionalmente, las células sh-AhR mostraron una morfología sensiblemente más fusiforme y con apenas contactos intercelulares, a diferencia de las células CA-AhR que forman monocapas en las que las células están estrechamente relacionadas entre sí (Figura R5A). No obstante, y a pesar de estas diferencias en morfología, no se apreciaron diferencias significativas en la capacidad de cada línea celular para formar colonias (Figura R5B). Cuando las células fueron crecidas en un entorno tridimensional en Matrigel (3-D), se obtuvo un resultado similar. Los clones sh-AhR fueron marcadamente menos compactos que los formados por células CA-AhR y con una mayor tendencia a que las células que los componen invadieran el matrigel y emigraran hacia el exterior (Figura R5A,C). En conjunto, estos resultados sugieren que una reducción en los niveles de AhR inducen una morfología mesenquimal y una mayor capacidad invasiva que pudieran estar asociadas al incremento de potencial tumoral y metastático de las células sh-AhR.

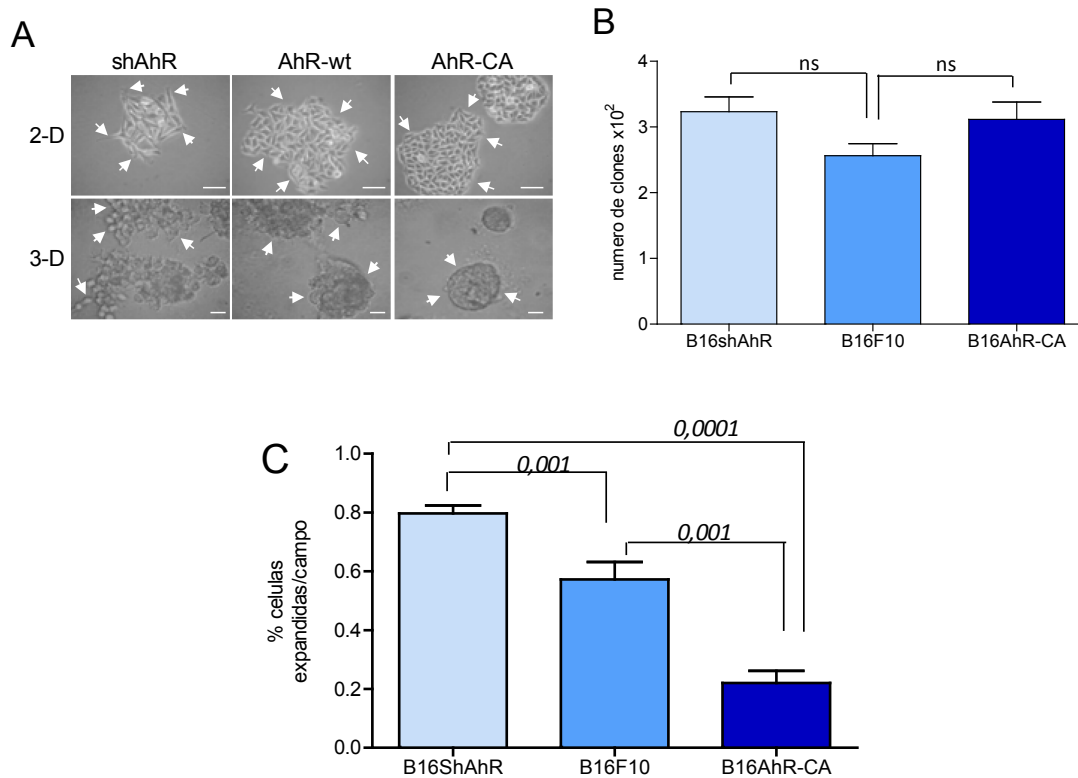


Figura R5. La depleción en los niveles de AhR produce clones menos compactos con células más expandidas. (A) Imagen representativa de los clones formados a partir de las líneas celulares sh-AhR, wt-AhR y CA-AhR tanto en 2-D como en 3-D. (B) Cuantificación del número de clones formados por cada línea celular en 2-D. (C) Cuantificación del número de clones en cada línea celular en cultivos 3-D en Matrigel. Barra error 50  $\mu\text{m}$ .

A continuación determinamos la capacidad migratoria e invasiva de las líneas celulares producidas realizando experimentos de cierre de herida en placa (*wound healing*). Tras realizar la herida en el centro de la placa, cuantificamos la distancia remanente entre los bordes a tiempo inicial y final. Los resultados obtenidos mostraron que las células sh-AhR tienen un potencial migratorio significativamente mayor que las wt-AhR y estas que las CA-AhR (Figura 6A, B). Dado que la capacidad invasiva de las células tumorales es un parámetro adicional de malignidad, que está en general asociado a una mayor migración, analizamos potencial invasivo empleando transwells de matrigel y microscopía confocal. Coherentemente con los resultados anteriores, las células sh-AhR y CA-AhR mostraron un incremento y una reducción significativas en invasión con respecto a la línea silvestre wt-AhR, respectivamente (Figura R6C).

*Estos resultados indican que un menor nivel de AhR favorece un fenotipo migratorio e invasivo mientras que su sobre-activación ejerce el efecto opuesto bloqueando ambos procesos.*

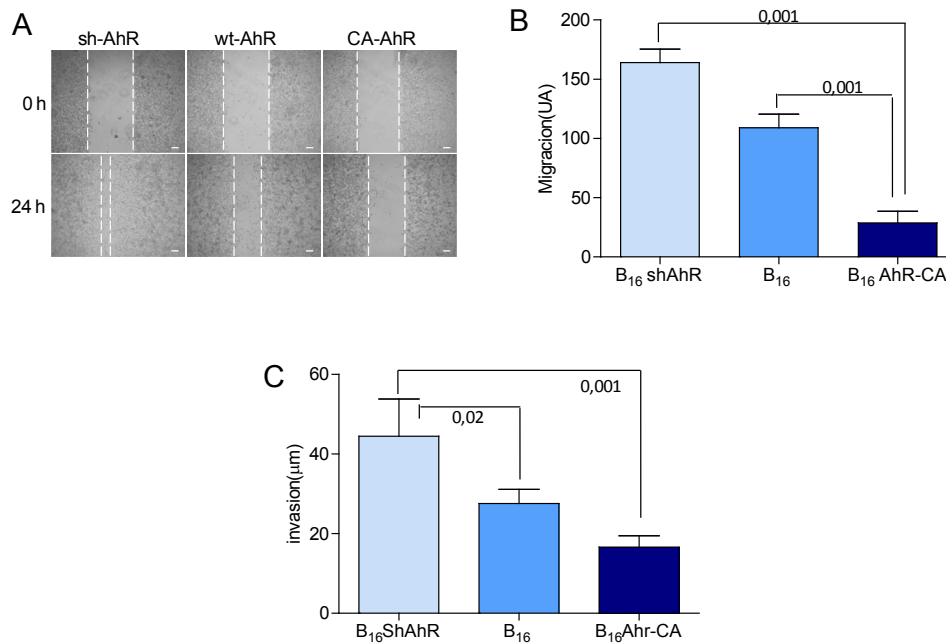
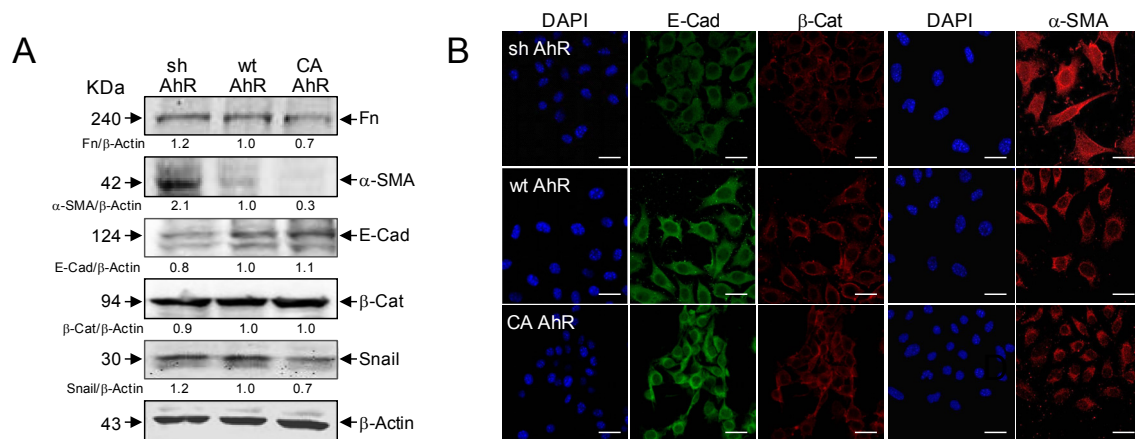


Figura R6. La expresión de AhR inhibe migración e invasión celular. (A) Las líneas celulares sh-AhR, wt-AhR y CA-AhR fueron sometidas a ensayos de migración direccional por el método de wound healing. (B) La migración de cada línea celular fue cuantificada midiendo la distancia recorrida con respecto al tiempo cero. (C) La capacidad invasiva de las células en estudio se estudió empleando transwells de Matrigel que fueron analizados por microscopía confocal. Barra de error 50 µm.

#### 4. El fenotipo inducido por la deficiencia en AhR sugiere una transición epitelio-mesénquima.

En los últimos años se han descrito un número creciente de genes que participan en el control de la migración celular y la invasión celular, AhR entre ellos (Abbott *et al.* 1995; Diry *et al.* 2006; Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009; Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009; Gomez-Duran *et al.* 2009; Roman *et al.* 2009). Hasta este punto, nuestros resultados muestran que la activación de AhR inhibe procesos migratorios e invasivos en células de melanoma. Esto, junto con su capacidad para modificar la morfología celular hacia un fenotipo mesenquimal, podría estar indicando que el receptor de dioxina participa en el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) en melanoma, del mismo modo que lo hace en células epiteliales murinas y humanas (Rico-Leo *et al.* 2013). Decidimos entonces emplear Western blot e inmunocitoquímica para determinar la existencia de cambios en marcadores típicos de EMT.



*Figura R7. La depleción de AhR induce marcadores de EMT en células de melanoma. (A) Análisis mediante Western blot de marcadores característicos de EMT que incluyen E-cadherina y b-catenina (epitelio) y fibronectina, a-actina de músculo liso y Snail (mesénquima). La expresión relativa de cada proteína con respecto a β-actina está indicada en la parte inferior. (B) Inmunocitoquímica de marcadores epiteliales y mesenquimales en las líneas de melanoma objeto de estudio creciendo en clones en 2-D. Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI. Barra de error 50 μm*

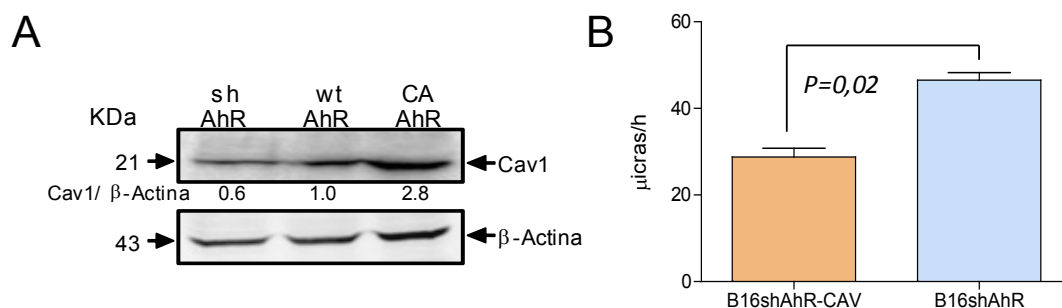
Comparando las células silenciadas para AhR con la que tienen activado constitutivamente el receptor, observamos un aumento en el nivel de expresión de los marcadores de fenotipo mesenquimal alfa actina de musculo liso ( $\alpha$ -SMA), fibronectina (Fn), y Snail. El marcador epitelial E-cadherina (E-cad) resultó inhibido en células sh-AhR mientras que los niveles de  $\beta$ -catenina no sufrieron cambios significativos. Las células wt-AhR mantuvieron un nivel de expresión intermedio para todas las proteínas analizadas (Figura R7A). A nivel celular, se observó cierta reducción en los niveles y una ligera deslocalización de E-cadherina y de  $\beta$ -catenina de la membrana plasmática en células interferidas para AhR (Figura R7B). El análisis inmunocitoquímico también reveló un incremento apreciable en los niveles de  $\alpha$ -SMA en la línea celular sh-AhR (Figura R7B). Estos resultados están de acuerdo con el efecto provocado por la depleción de AhR en el fenotipo celular, la migración y la invasión de las células B16F10.

*Dada la implicación de las proteínas analizadas en EMT, nuestros resultados sugieren que la inhibición del crecimiento y la metástasis tumoral dependientes de AhR pudieran tener lugar a través del bloqueo de la transición epitelio-mesénquima.*

## 5. AhR modula la expresión de proteínas de señalización implicadas en adhesión y migración celular

En estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio empleando fibroblastos immortalizados de ratón, observamos que AhR modula adhesión y migración celular activando la expresión de caveolina-1 e inhibiendo la activación de la integrina  $\beta 1$  (Rey-Barroso *et al.* 2013). Considerando estos resultados, y puesto que caveolina 1 se ha propuesto como un inhibidor de la progresión del melanoma (Trimmer *et al.* 2012), decidimos analizar los niveles de estas dos proteínas en nuestras líneas celulares. Mediante Western blot pudimos observar que el silenciamiento de la expresión de AhR redujo los niveles de caveolina-1 mientras que su activación constitutiva los incrementó (Figura R8A). Para analizar si caveolina-1 tenía un efecto inhibitor de la migración celular, realizamos transfecciones transientes de las células sh-AhR con un vector de expresión Cav-1-GFP y analizamos su migración mediante herida en placa (Figura R8B). De acuerdo a los resultados anteriores, la sobre-expresión de caveolina-1 en las células sh-AhR disminuyó significativamente su capacidad migratoria respecto a las células sh-AhR control. Además, y de acuerdo a lo mostrado en fibroblastos (Rey-Barroso *et al.* 2013), la menor expresión de caveolina-1 en células sh-AhR tuvo lugar en paralelo a una mayor expresión y activación de la integrina  $\beta 1$  mientras que el efecto opuesto se produjo en las células con menor capacidad migratoria CA-AhR (Figura R8C).

*Resulta que el fenotipo migratorio inducido por AhR está modulado por cambios en EMT y en proteínas que regulan adhesión y migración celular, alguna de ellas relacionada con la progresión del melanoma*



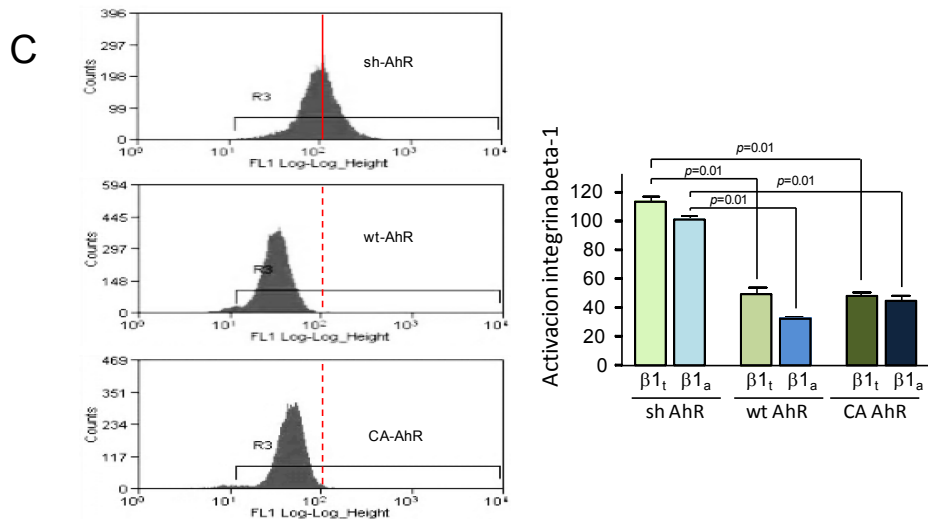


Figura R8. Análisis de los niveles de caveolina-1 e integrina  $\beta 1$  en células sh-AhR, wt-AhR y CA-AhR. (A). Análisis de la expresión de caveolina-1 en las diferentes líneas por Western blot. La expresión de b-actina fue utilizada como control de carga. (B) Análisis mediante microscopía confocal de la migración de células sh-AhR transfectadas con un vector de expresión caveolina-1-GFP. La línea sh-AhR sin transfectar se usó como control. (C) Medida del nivel de expresión (panel izquierdo) y de activación (panel derecho) de integrina  $\beta 1$  mediante citometría de flujo.

## 6. La depleción de los niveles de AhR aumenta el número de células con fenotipo cancer stem.

Se ha descrito que en diferentes tipos de cáncer, incluido el melanoma, los tumores contienen una población reducida de células con características de células madre (*cancer stem cells*) que se cree que son las que inician el desarrollo del tumor (*tumor initiating cells*). Hasta el momento no existen evidencias que relacionen a AhR con la biología de las células madre en melanoma. No obstante, estudios previos han mostrado que mientras que la inhibición de AhR promueve la expansión de células madre hematopoiéticas (Boitano *et al.* 2010) su activación induce diferenciación mediada por ácido retinoico (Bunaciu and Yen 2011). Basándonos en estos estudios y en los resultados descritos más arriba, nos planteamos la posibilidad de que la ventaja en tumorigénesis primaria y en metástasis de las células sh-AhR pudiera estar asociada a un incremento en el número de células madre tumorales y, que por tanto, AhR estuviera implicado en su control.

Para analizar el contenido en células madre tumorales de nuestras líneas de melanoma, llevamos a cabo un estudio citométrico de marcadores de superficie. En primer lugar, identificamos en cada una de las líneas de melanoma las células

pertenecientes a la denominada “side population”, que incluye aquellas con fenotipo indiferenciado. Las “side population” sh-AhR, wt-AhR y CA-AhR fueron analizadas para los marcadores CD133<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup> observándose que todos ellos estaban sobre-expresados en la línea sh-AhR y reprimidos en la CA-AhR respecto a sus niveles basales en las células wt-AhR (Figura R9). Dado que estos resultados sugerían que la expresión de AhR antagoniza el fenotipo “célula madre tumoral”, decidimos validar esta hipótesis realizando ensayos de crecimiento en forma de melanosferas las cuales son indicativas de indiferenciación celular (Figura R10A). Pudimos comprobar que las células sh-AhR produjeron melanosferas de mayor tamaño (Figura R10B) y en mayor número (Figura R10C) que las células wt-AhR. Coherentemente, las células CA-AhR dieron lugar a un menor número de melanosferas (Figura R10C) de menor tamaño (Figura R10B). El fenotipo de indiferenciado (cancer stem) de las melanosferas fue verificado disociando dichas estructuras y analizándolas para el marcador CD133<sup>+</sup> por citometría de flujo (Figura R10D).

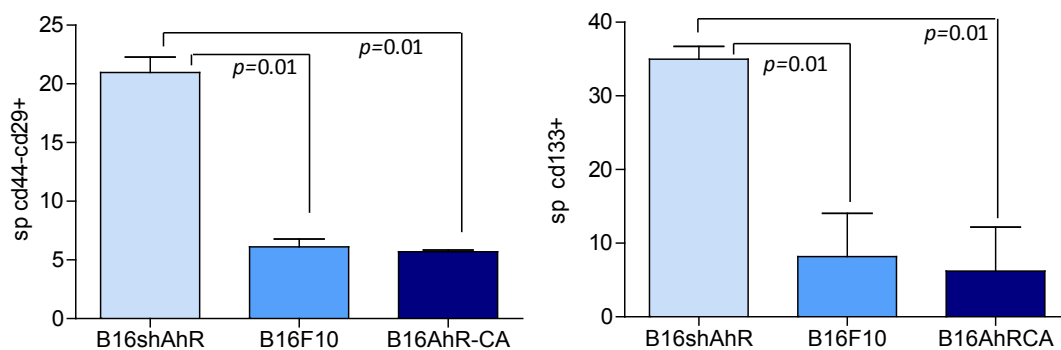


Figura R9. La depleción de AhR induce la expresión de marcadores del fenotipo cancer stem. Las líneas sh-AhR, wt-AhR y CA-AhR fueron analizadas por citometría de flujo para identificar la subpoblación “side population”. Estas células fueron estudiadas para la expresión de los marcadores de superficie CD133<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup> y CD29<sup>+</sup>. Análisis citométrico de marcadores de células madre cancerígenas. Se analiza primero la self population (sp) mediante la adición de un inhibidor del transportador ABCB5 y dentro de esta población se cuantifica el número de células positivas para CD44, cd29 y cd133.

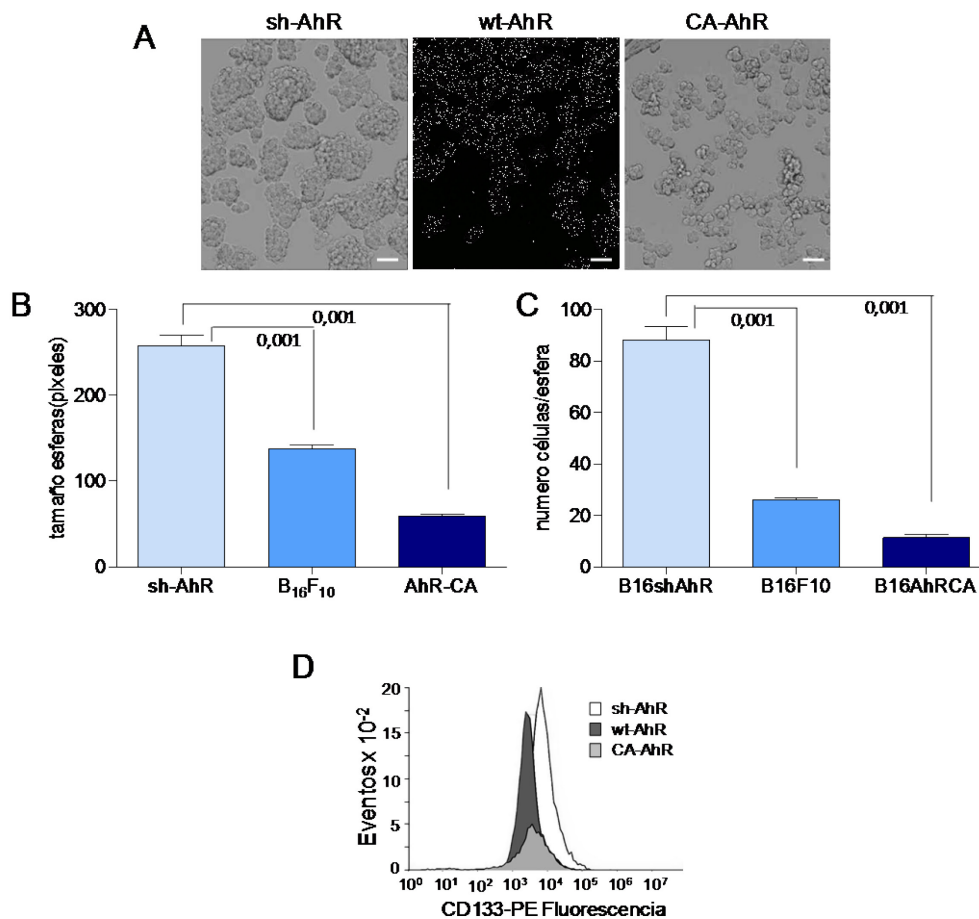


Figura R10. Las células de melanoma sh-AhR con un nivel elevado de marcadores cancer stem forman mayor número de melanosfera. (A) Melanosferas representativas producidas por las células sh-AhR, wt-AhR y CA-AhR. (B,C) Cuantificación del tamaño (B) y del número (C) de las melanosferas producidas por cada línea celular de melanoma. (D) Las melanosferas fueron disociadas y analizadas por citometría de flujo para el marcador CD133<sup>+</sup> con el fin de confirmar su fenotipo indiferenciado. Barra de error 50  $\mu$ m.

Por tanto, estos datos indican que un posible mecanismo implicado en el papel supresor tumoral de AhR es reducir el número de células con propiedades de células madre tumorales dentro del “pool” de células de melanoma.

## 7. AhR actúa como promotor tumoral cuando se expresa en el estroma

Uno de los aspectos que más interés está captando actualmente en cáncer es la influencia del entorno tumoral sobre el crecimiento y la diseminación del propio tumor. Se sabe que las células estromales secretan ciertas citoquinas y factores de crecimiento que provocan cambios fenotípicos en las células tumorales. En el contexto de AhR se ha descrito que este receptor puede tener efecto pro-tumoral o antitumoral dependiendo del



tipo celular objeto de estudio (ver apartado de Introducción). Nos planteamos entonces la posibilidad de que la expresión de AhR en el estroma pudiera afectar su papel en tumorigenesis y metástasis, de manera que el AhR estromal pudiera inhibir o cooperar en progresión tumoral.

Interesantemente, la inoculación subcutánea de las células sh-AhR en ratones receptores *AhR*<sup>-/-</sup> produjo *xenografts* de un peso y un tamaño similares a los producidos por las células wt-AhR y sólo ligeramente mayores a los de las células CA-AhR (Figura R11A, B). Es decir, la ausencia completa de AhR estromal contrarresta la ventaja tumoral que muestran las células sh-AhR en un estroma *AhR*<sup>+/+</sup> que expresa este receptor (Figura R11C, D). Por tanto, respecto a la tumorigénesis primaria, si bien AhR tiene actividad de supresor en la célula tumoral, ejerce una función de promotor tumoral en el estroma.

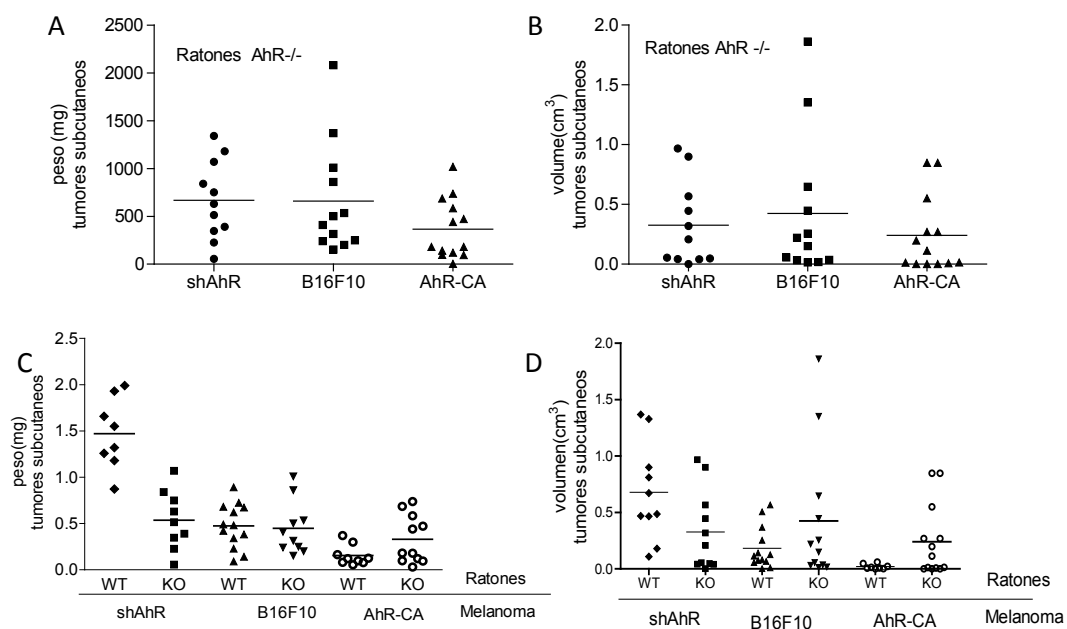


Figura R11. El AhR estromal es necesario para la tumorigenesis primaria. (A, B) Las células sh-AhR, wt-AhR y CA-AhR se inyectaron subcutáneamente en ratones *AhR*<sup>-/-</sup> y tras 15 días los tumores formados fueron extraídos. De estos se obtuvo su peso (A) y se calculó su volumen (B) empleando la fórmula  $V = X^2 * Y / 2$  donde X e Y se corresponden con el ancho y el largo de la pieza tumoral, respectivamente. (C, D) los resultados de peso (C) y de volumen (D) tumoral obtenidos a partir ratones receptores *AhR*<sup>-/-</sup> se han integrado con los correspondientes de ratones *AhR*<sup>+/+</sup>.

Para confirmar este resultado, decidimos co-inyectar células de melanoma con fibroblastos inmortalizados *AhR*<sup>+/+</sup> y *AhR*<sup>-/-</sup> (Figura R12A). Observamos que el crecimiento tumoral producido por la depleción de AhR se redujo significativamente cuando las células sh-AhR fueron co-inyectadas con fibroblastos *AhR*<sup>-/-</sup> pero no cuando se utilizaron fibroblastos *AhR*<sup>+/+</sup>. La presencia de fibroblastos *AhR*<sup>+/+</sup> o *AhR*<sup>-/-</sup> no afectó

significativamente el crecimiento de tumores inducidos por células de melanoma wt-AhR o CA-AhR (Figura R12A), sugiriendo que el efecto pro-tumoral de AhR en el estroma sólo es apreciable cuando las células tumorales tienen comprometida la expresión de este receptor. Esta hipótesis se vió apoyada por el uso de medio condicionado por fibroblastos inmortalizados que expresan o que carecen de AhR. Las células de melanoma sh-AhR formaron clones más expandidos y con un fenotipo más mesenquimal al ser cultivadas con medio producido por fibroblastos *AhR*<sup>+/+</sup> que por fibroblastos *AhR*<sup>-/-</sup> (Figura R12B). Por el contrario, tanto las células wt-AhR como las CA-AhR desarrollaron clones con similar morfología en ambos medios condicionados. (Figura R12B). El hecho de que el medio condicionado altere *per se* la estructura de los clones y la morfología de las células sh-AhR indica que, probablemente, los fibroblastos (u otras células estromales) secreten factores difusibles que facilitan el crecimiento tumoral en células de melanoma interferidas para AhR.

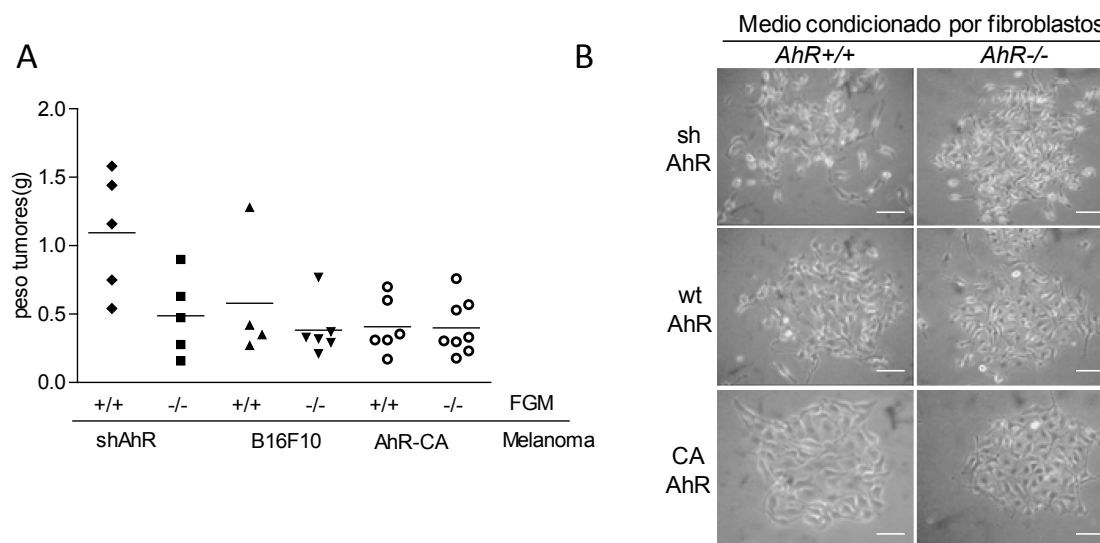


Figura R12. La expresión de AhR en fibroblastos estromales modula el crecimiento tumoral en melanoma. (A) Las células B16F10 sh-AhR, wt-AhR y CA-AhR se mezclaron con fibroblastos inmortalizados *AhR*<sup>+/+</sup> o *AhR*<sup>-/-</sup> (FGM) y se inyectaron subcutáneamente en el dorso de ratones receptores *AhR*<sup>+/+</sup>. Los tumores se recuperaron a los 15 días y se pesaron. (B) Morfología en 2-D de los clones formados por las células de melanoma objeto de estudio cultivadas en presencia de medio condicionado por fibroblastos *AhR*<sup>+/+</sup> o *AhR*<sup>-/-</sup>. Barra de error 50  $\mu$ m.

El estroma es una mezcla heterogénea que contiene diferentes tipos celulares. Si bien los fibroblastos tienen un papel esencial en la progresión tumoral, otras células, tales

como las endoteliales, pueden ejercer también una función relevante. En base a esto, aislamos células endoteliales de aorta de ratones *AhR*<sup>+/+</sup>. Estas células fueron cultivadas y sometidas a pases sucesivos hasta conseguir clones inmortalizados, de los cuales derivamos una línea celular. Esta línea fue transducida con retrovirus conteniendo el sh-AhR y seleccionada hasta obtener clones estables (MAEC sh-AhR). Dichos clones mostraron una reducción significativa en los niveles basales de AhR (Figura R13A). Al igual que obtuvimos en los ensayos empleando medio condicionado por fibroblastos, la morfología y el fenotipo mesenquimal de las células de melanoma sh-AhR se acentuó al ser crecidas en medio condicionado por células endoteliales deplecionadas en AhR (Figura R13B), lo que de nuevo sugiere que AhR es necesario para la secreción de factores estromales necesarios para el crecimiento del melanoma. El medio condicionado por endotelio sh-AhR no alteró la morfología de los clones formados por las células wt-AhR y CA-AhR (Figura R13B).

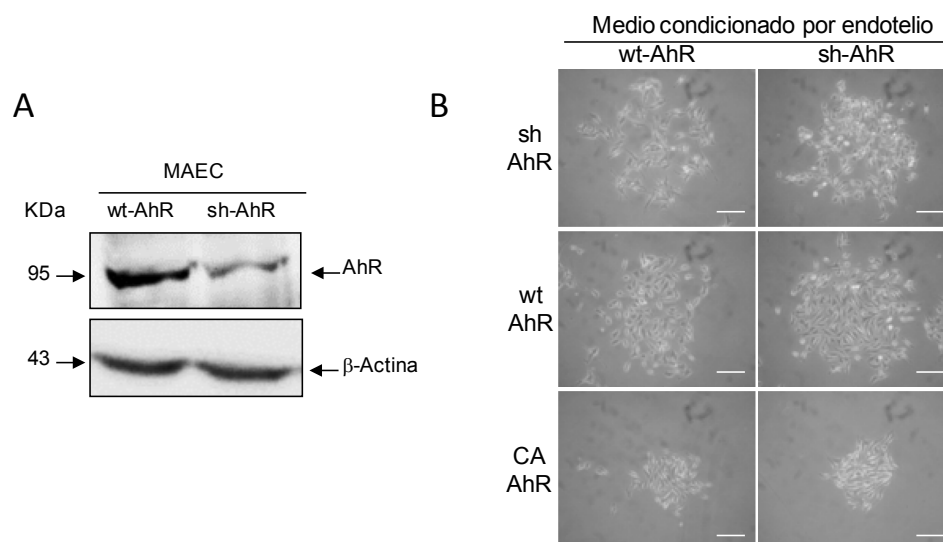


Figura R13. La expresión de AhR en endotelio estromal también modula la morfología de las células de melanoma sh-AhR. (A) Análisis de la expresión de AhR en células endoteliales de aorta de ratón (MAEC) silvestres (wt-AhR) e interferidas establemente para dicho receptor (sh-AhR). (B) Estructura de los clones y morfología de las células sh-AhR, wt-AhR y CA-AhR al ser crecidas en medio condicionado por endotelio wt-AhR o sh-AhR. Barra error= 50µm.

*AhR tiene por tanto un papel pro-tumoral cuando se expresa en el estroma. Dicho papel es probable que implique la secreción al medio de factores de crecimiento por parte de fibroblastos y de endotelio estromal.*

## 8. Las líneas de melanoma humano más invasivas tienen una expresión reducida de AHR.

Globalmente, los resultados obtenidos hasta este punto sugieren una relación inversa entre la malignidad del melanoma y la expresión de Ahr, posiblemente debido a su función supresora intrínseca en la célula tumoral. Quisimos entonces evaluar si Ahr podría servir como un marcador de progresión en casos de melanoma humano. Para ello, analizamos en primer lugar una batería de las siguientes 5 líneas de melanoma humano: A375, HBL, C8161, HMEL1 y DOR. El estudio de sus capacidades migratorias en ensayos de cierre de herida (*wound healing*) mostró que las células con el mayor potencial migratorio tras 24 h eran las C8161 y con el menor las DOR (Figura R14A, B). Dentro de las restantes líneas celulares, las HBL mostraron un nivel migratorio intermedio (Figura R14A, B). Analizamos también la capacidad invasiva de estas líneas de melanoma humano en transwells de matrigel y los resultados obtenidos fueron similares, destacando por su mayor invasión las células C8161 (Figura R14C).

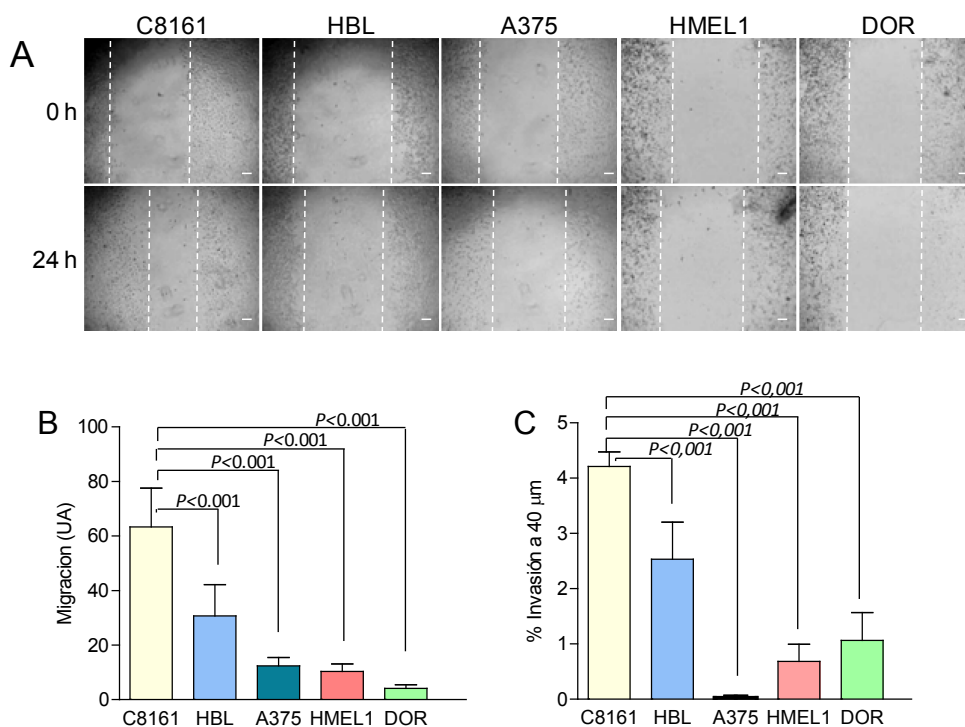
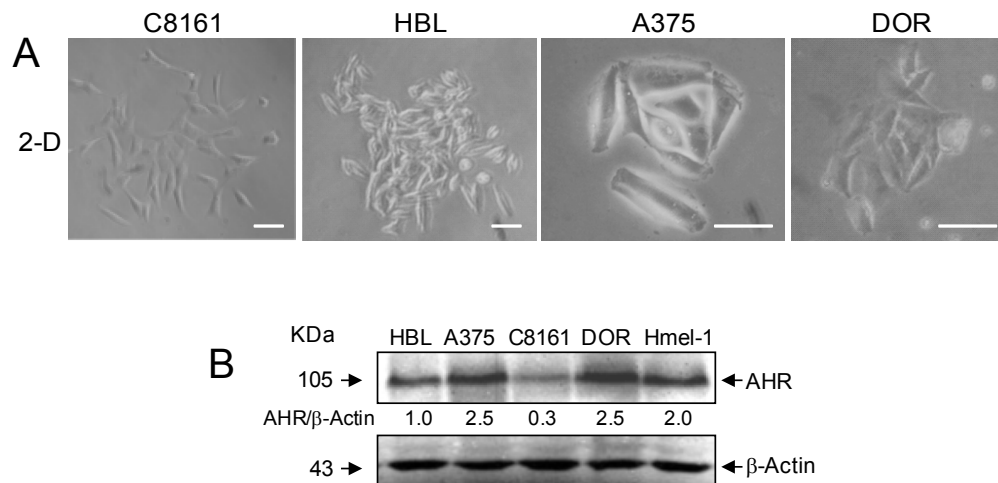


Figura R14. Diferentes líneas celulares de melanoma humano muestran diferencias en migración e invasión. (A) La migración celular de las líneas C8161, HBL, A375, Hmel1 y DOR fue estimada en ensayos de cierre de herida (*wound healing*). (B) Cuantificación de la migración con respecto al inicio del experimento (tiempo cero). (C) La invasión de estas líneas células se determinó a las 24 h mediante microscopía confocal en transwells de matrigel. Barra error= 50 µm.

En base a la relación existente entre migración e invasión y morfología celular en células de melanoma murino, quisimos comprobar si dicha correlación se producía también en las líneas de melanoma humano.

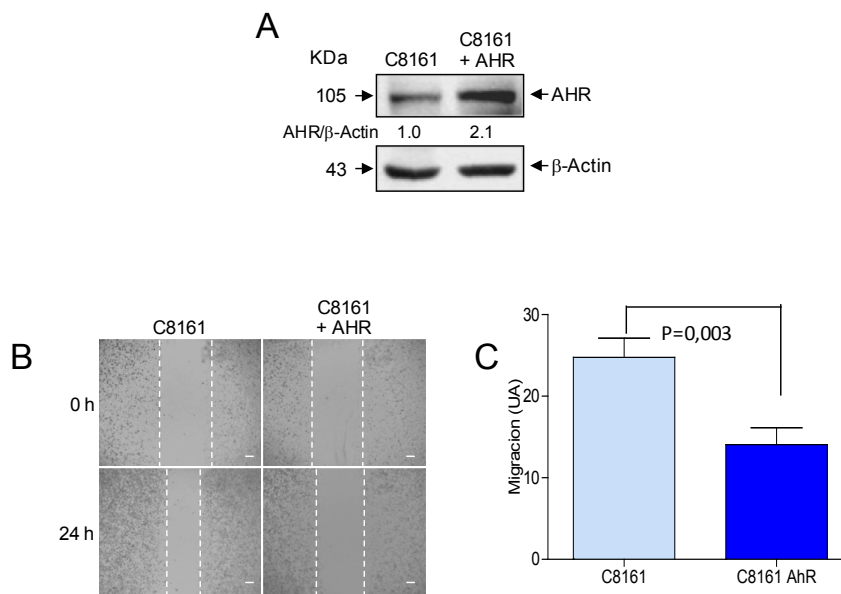


*Figura R15. Las células de melanoma humano con menor expresión de AHR tienen morfología mesénquimal. (A) Análisis de la morfología celular mediante ensayos de clonicidad en 2-D. (B) Análisis de la expresión de AHR por Western blot en las líneas de melanoma humano objeto de estudio. La cuantificación está realizada con respecto a β-actina.. Barra error 50 μm.*

Observamos que las líneas A375 y DOR, que poseen un menor potencial invasivo, formaron clones más compactos en los que las células mostraban un fenotipo más adherente (Figura R15A). Por el contrario, las células C8161, con mayor capacidad migratoria e invasiva, dieron lugar a clones poco compactos formados por células de morfología mesenquimal que tendían a emigrar hacia la periferia (Figura R15A). Interesantemente, las líneas de melanoma humano que presentaron una mayor capacidad migratoria e invasiva y morfología mesenquimal son aquellas con menor nivel de expresión de AHR (Figura R15B).

Para confirmar la implicación de Ahr en el fenotipo migratorio de las células de melanoma humano, realizamos experimentos de rescate de expresión en la línea C8161 por transfección transiente de un vector conteniendo la secuencia codificante de la forma silvestre de AHR. La transfección incrementó dos veces los niveles de Ahr en las células C8161 (Figura R16A) tal como se pudo determinar por Western blot. Observamos que la sobre-expresión de Ahr redujo la capacidad migratoria de dichas células (Figura R16B),

lo que apoya nuestra hipótesis de que la expresión de AHR bloquea la capacidad migratoria de células de melanoma tanto humanas como murinas.



*Figura R16. El rescate de la expresión de AHR en células de melanoma humano reduce su capacidad migratoria. (A) Análisis de la eficiencia del rescate de la expresión de AHR por transfección transiente del vector pcDNA:AHR. El incremento de expresión se indica en la zona inferior. La expresión de b-actina se usó como control de carga para la cuantificación. (B) Análisis del efecto de la sobre-expresión de AHR sobre la migración celular de células C8161 silvestres y transfectadas con el vector de expresión de AHR pcDNA:AHR. Se empleó el método de wound healing. Barra error= 50  $\mu$ m.*

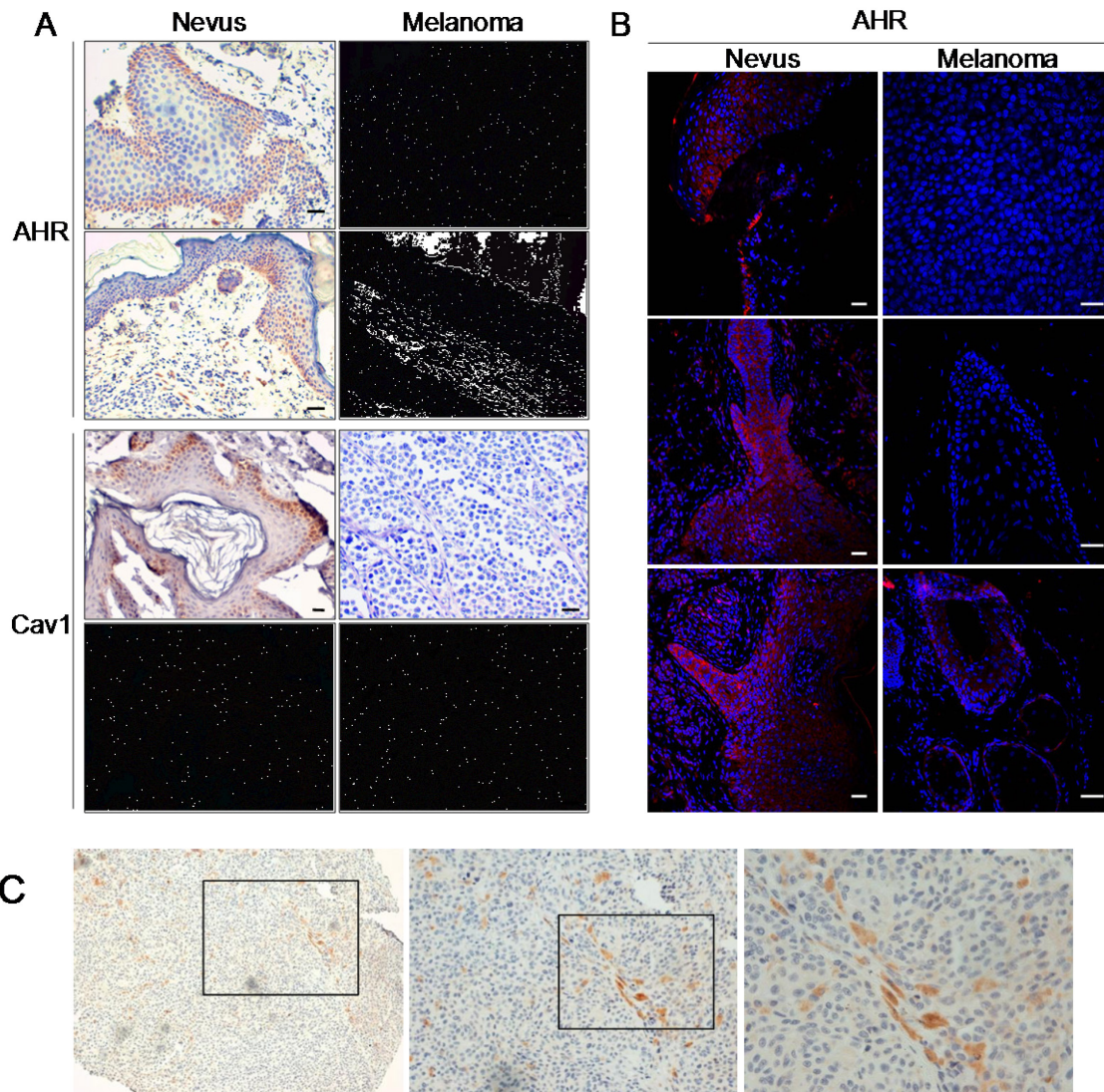
*Las líneas de melanoma y los melanomas primarios humanos confirman el papel supresor de AHR en este tipo tumoral y permiten sugerir que su co-expresión con caveolina-1 puede tener potencial valor pronóstico.*

## **9. Los melanomas humanos avanzados tienen una expresión reducida de AHR.**

Teniendo en cuenta las observaciones realizadas en células de melanoma humano, decidimos investigar si el nivel de expresión de AHR correlaciona con la malignidad de la enfermedad en pacientes de melanoma humano. Para ellos produjimos *microarrays* de tejidos (TMA) en los que se incluyeron biopsias de melanoma humano en diferentes estadios y lesiones pre-malignas diagnosticadas como nevus. Todas las muestras incluidas en los TMAs fueron validadas por dos patólogos independientes del Hospital Universitario Infanta Cristina. El análisis de los TMA se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica empleando un anticuerpo específico para AHR (Figura R176A). La

especificidad de la señal se validó mediante inmunofluorescencia en biopsias representativas (Figura R17B).

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla R1, en la que también se incluye el diagnóstico patológico y el estadio del tumor según la clasificación Clark. Se detectó expresión de AHR en 5 de las 6 lesiones névicas analizadas (83%), mientras que dentro los 17 melanomas humanos analizados, 14 resultaron negativos para AHR (82%), dos especímenes presentaron un nivel bajo de tinción (12%) y en uno de ellos la expresión no pudo ser determinada. Los melanomas negativos para AHR se corresponden con estadios Clark >III mientras que los de baja reactividad tienen un índice Clark <III (Tabla R1). Ya que la línea celular pro-tumorigénica y pro-metastática murina sh-AhR presentó una baja expresión de caveolina-1, y dado que la inhibición de la expresión de caveolina-1 está asociada a peor pronóstico en melanoma (Trimmer *et al.* 2012), decidimos analizar su expresión en nuestros TMAs de melanoma humano. Caveolina-1 fue detectada en 4 de los 6 nevi analizados (67%) mientras que sólo se expresó en 1 paciente de melanoma (6%). Resulta interesante que el paciente positivo para la expresión de caveolina-1 coincide con uno de los dos que expresaron AHR a un nivel detectable (Tabla R1). Estos resultados indican que tanto AHR como caveolina-1 están inversamente relacionados con la progresión del melanoma humano. Adicionalmente, pudimos observar expresión de AHR en el estroma de algunos melanomas (Figura R17C), lo que sugiere que su expresión en este compartimento puede tener relevancia en la progresión del tumor.



**Figura R17.** Los melanomas humanos muestran una expresión de AHR reducida con respecto a lesiones pre-malignas nevi. (A) La expresión de AHR se analizó por inmunohistoquímica en microarrays de tejidos (TMA) conteniendo biopsias de nevi y de melanoma por triplicado en cada TMA. Se analizó la expresión de caveolina-1 en los mismos TMAs. (B) La especificidad de la tinción para AHR se comprobó por inmunofluorescencia. (C) Análisis de la expresión de AHR en el estroma de los melanomas humanos analizados. Barra error 50µm.



Tabla R1. Resumen de la expresión de AHR y de cavelina-1 en biopsias de pacientes de melanoma humano y de nevus<sup>a</sup>

Paciente	AHR	Cav1	Diagnóstico	Clark <sup>b</sup>
P1M	-	-	Melanoma Nodular	
P2M	-	-	Melanoma Nodular	III
P3M	-	-	Melanoma Epiteliode	
P4M	-	-	Melanoma Nodular	IV
P5M	-	-	Melanoma Nodular	III
P6M	-	-	Melanoma Nodular	IV
P7M	-	-	Melanoma Nodular	<III
P8M	-	-	Léntigo Maligno	V
P9M	-	-	Melanoma Nodular	V
P10M	-	-	Melanoma Nodular	IV
P11M	+	+	Melanoma Nodular	<III
P12M	-	-	Melanoma Nodular	III
P13M	-	-	Melanoma Nodular	<III
P14M	-	-	Melanoma Nodular	IV
P15M	-	-	Melanoma Nodular	IV
P16M	n.d.	-	Melanoma Nodular	III
P17M	+	-	Melanoma Nodular	<III
N19	+	+	Nebus	
N20	+	+	Nebus	
N21	+	n.d.	Nebus	
N22	-	-	Nebus	
N23	+	+	Nebus	
N24	+	+	Nebus	

<sup>a</sup>Las biopsias de melanoma y de nevi se analizaron en TMAs conteniendo triplicados de cada paciente. Se emplearon dos TMAs independientes.

<sup>b</sup> Estadio de Clark indicativo del nivel de progresión del melanoma.



## **DISCUSSION**



Cada vez son más los estudios que demuestran que AhR está implicado en varias vías de señalización críticas para la homeostasis celular (Pohjanvirta 2012). Entre las funciones fisiológicas que requieren de la participación de AhR se encuentran el control de la proliferación, la adhesión y la migración celular. El conjunto de estos trabajos ha permitido proponer, y en algunos casos demostrar, que AhR contribuye a eventos tales como la iniciación, promoción y progresión tumoral no sólo en presencia de agentes tóxicos y carcinogénicos sino también en su ausencia (Pohjanvirta 2012).

Un aspecto relevante de la biología de AhR es que algunas de sus funciones son dependientes del fenotipo de la célula diana, pudiendo activar o inhibir el mismo proceso celular en dos contextos diferentes. Un claro ejemplo lo constituye su acción dual sobre el control de la proliferación celular y así, a modo de estudio representativo, se ha puesto de manifiesto que la inhibición de la expresión de AhR produce tanto un aumento de la proliferación de células de hepatoma humano HepG2 como una disminución del crecimiento de células tumorales de glándula mamaria humana MCF-7 (Abdelrahim *et al.* 2003). Otro ejemplo viene dado por su papel en el control de la adhesión y la migración celular. En estos procesos, la expresión de AhR parece ejercer una función promotora de la migración mesenquimal pero inhibitoria de la motilidad de células epiteliales (Mulero-Navarro *et al.* 2005; Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009; Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009; Gomez-Duran *et al.* 2009). Por ello, nuestro laboratorio ha propuesto que AhR participa en la transición epitelio-mesénquima, inhibiéndola e impidiendo la migración de células epiteliales transformadas tanto murinas como humanas (Rico-Leo *et al.* 2013). Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado el papel de AhR en progresión tumoral dentro del contexto de la interacción entre la célula tumoral y el microentorno estromal.

Esta Tesis Doctoral está basada en melanoma por ser un tipo de cáncer con un elevado potencial metastático y por tener un importante impacto clínico dado que su incidencia a nivel mundial está en aumento, en buena parte debida a la exposición solar. Para analizar si la expresión de AhR en la célula tumoral afecta de manera diferencial al crecimiento y la metástasis del melanoma, con respecto al efecto que provoca su expresión en el estroma, llevamos a cabo dos tipos de aproximaciones metodológicas. En primer lugar, modificamos genéticamente células de melanoma murino B16F10 en las que silenciamos o activamos de manera constitutiva el receptor de dioxina con el fin de analizar cómo su nivel de expresión en la célula de melanoma afecta a parámetros como la morfología, clonogenicidad, migración e invasión. En segundo lugar, investigamos en

modelos animales el potencial tumorigénico y metastático de dichas células modificadas tanto en un microentorno que expresa AhR como en uno que carece de este receptor. Con ello hemos determinado su papel intrínseco en la célula tumoral *vs* extrínseco en el estroma. Es importante destacar que los ensayos *in vivo* han tenido lugar en presencia de un sistema inmune competente, de manera que el crecimiento tumoral ha estado sujeto a control fisiológico. Esta circunstancia creemos que hace más representativos los resultados obtenidos.

Un importante hallazgo de este trabajo es que la activación de AhR en la célula tumoral produjo una disminución notable tanto de la tumorigénesis primaria como de la metástasis pulmonar. Si bien aún no hemos podido determinar los mecanismos moleculares implicados, es probable que esta función supresora tumoral sea consecuencia de que AhR interfiere o inhibe procesos que favorecen que la célula tumoral crezca dentro del tumor o invada tejidos cercanos. Factores externos a la célula tumoral propiamente dicha deben estar implicados ya que la activación de AhR no dio lugar a un incremento significativo en la capacidad proliferativa ni alteró el ciclo de las células B16F10. El papel supresor tumoral de AhR en la célula de melanoma se ve confirmado por el hecho de que su depleción indujo un incremento importante tanto en el crecimiento como en la metástasis pulmonar. Una variable que parece estar implicada en el fenotipo tumoral dependiente de AhR es la migración celular, que se potenció significativamente por la reducción en los niveles de receptor. El efecto opuesto se observó tras la activación de AhR en las células B16F10, que es de hecho coherente con lo obtenido por otros autores que han mostrado que AhR inhibe la migración de células SKOV-3 de cáncer de ovario (Wang *et al.*) y MCF-7 de cáncer de mama (Diry *et al.* 2006; Bui *et al.* 2009). Probablemente, el bloqueo de la migración por parte de AhR sea debido a una interacción indirecta con las rutas de señalización reguladas por caveolina-1 e integrina  $\beta 1$  ya que la activación de AhR incrementó los niveles del inhibidor de migración caveolina-1 y redujo la actividad de la molécula pro-migratoria integrina  $\beta 1$ . Dicho patrón de aumento de los niveles de AhR y de caveolina-1 en paralelo con la reducción en integrina  $\beta 1$  es coincidente con estudios previos que muestran caveolina-1 inhibe el potencial metastático de las células de melanoma (Trimmer *et al.*) mientras que integrina  $\beta 1$  potencia la migración de los melanocitos (Pinon and Wehrle-Haller 2011). Por otro lado, los resultados obtenidos están apoyados por un trabajo reciente de nuestro laboratorio en el que hemos puesto de manifiesto que los fibroblastos carentes de la expresión de AhR

tienen menores niveles de p-caveolina-1 Y<sup>14</sup> y sobre-activación de integrina  $\beta$ 1 (Rey-Barroso *et al.* 2013).

El fenotipo que se produce tras la modulación de los niveles de AhR está también relacionado con el potencial clonogénico y con cambios en la morfología celular. La activación de la ruta de AhR produjo clones compactos en cultivos tridimensionales 3-D cuyas células mantuvieron sus uniones intercelulares y adoptaron una morfología de tipo epitelioide que es coincidente con su menor migración e invasividad. La reducción en los niveles de AhR modificó marcadamente la morfología originando células de aspecto mesenquimal que crecieron en clones poco compactos y con tendencia a la diseminación. Estas características de las células deplecionadas en AhR sugieren un proceso de EMT, el cual probablemente tiene lugar dado que el fenotipo mesenquimal estuvo acompañado de un claro incremento en marcadores mesenquimales y de una cierta reducción en marcadores epiteliales. La implicación de AhR en la transición epitelio-mesénquima ha sido previamente descrita por nuestro laboratorio ya que hemos demostrado que este receptor inhibe la migración de células NMuMG y HaCaT por bloqueo de su transición hacia un fenotipo mesenquimal (Rico-Leo *et al.* 2013). Resulta por tanto coherente que en células con bajos niveles de AhR exista cooperación entre caveolina-1, integrina  $\beta$ 1 y EMT para inducir una morfología mesenquimal, un incremento de migración e invasión y una mayor incidencia tumoral y metastática.

No existen trabajos previos que relacionen AhR con procesos de diferenciación en melanoma, pero sí con otros tipos de cáncer. Así, su activación por xenobióticos inhibe la invasión y promueve la diferenciación de células tumorales de mama (Hall *et al.* 2010), mientras que su inhibición aumenta el número de células madre hematopoyéticas (Boitano *et al.* 2010). Estos resultados son coherentes con nuestra hipótesis de que uno de los mecanismos por los que AhR suprime el crecimiento y la metástasis tumoral es promoviendo la diferenciación de las células de melanoma, lo que implicaría una reducción en la población de potenciales células madre tumorales/células iniciadoras de tumor. Nuestro estudio indica que este mecanismo puede estar implicado ya que la reducción de la expresión de AhR incrementó el número de células con fenotipo *stem* CD133<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup>, siendo éstos alguno de los marcadores previamente empleados para identificar células madre de melanoma (Monzani *et al.* 2007). De este modo, la diferenciación celular regulada por AhR contribuye junto con los procesos discutidos anteriormente en el papel supresor tumoral de este receptor en melanoma.

Este modelo de melanoma murino (niveles reducidos de AhR correlacionan con un elevado potencial migratorio e invasivo), ha sido extrapolado y corroborado en líneas humanas de melanoma. Observamos que las líneas de melanoma humano más invasivas son las que presentan menores niveles de AHR, y que con sólo aumentar la expresión del receptor conseguimos inhibir su migración celular. Un resultado que consideramos muy relevante es que los niveles de AHR estaban sensiblemente reducidos o eran indetectables en biopsias de pacientes de melanoma mientras que estaban presentes en biopsias de lesiones pre-malignas del tipo nevus. El estudio de tumores humanos no sólo nos permite confirmar el papel supresor de AhR en melanoma, sino que ratifica su co-expresión con la proteína supresora caveolina-1, la cual está también reprimida en nuestros pacientes así como en otras cohortes de pacientes de melanoma estudiadas por otros laboratorios (Trimmer *et al.*). Un aspecto de potencial interés, si bien el número de pacientes actuales es aún limitado para extraer conclusiones, es que los escasas biopsias de melanoma que presentaron niveles detectables de AhR corresponden con estadios menos agresivos de la enfermedad, lo que abre la posibilidad para que AhR pueda tener valor pronóstico de evolución, ya sea de manera independiente o en conjunción con caveolina-1. Por tanto, el melanoma se suma a los tipos de cánceres que sugieren un papel supresor tumoral para AhR y que incluyen leucemia linfoblástica aguda (Mulero-Navarro *et al.* 2006), hepatocarcinoma (Fan *et al.*), próstata (Gluschnaider *et al.*) y glándula mamaria (Hall *et al.*).

El estroma es un compartimento adicional que interviene en la formación y la progresión del melanoma. En este trabajo hemos encontrado que, contrariamente a la actividad supresora de AhR en las células de melanoma, el AhR estromal se comporta como promotor tumoral. Tanto el tamaño tumoral como el número de metástasis se redujeron notablemente cuando el ratón receptor carecía de expresión de AhR, y este efecto parece ser independientemente del nivel de expresión del receptor en la célula de melanoma. Los factores y los mecanismos por los que el AhR estromal modula melanoma no han podido ser identificados en este estudio. No obstante, los experimentos *in vivo* de co-inyección de células de melanoma con fibroblastos *AhR*<sup>+/+</sup> o *AhR*<sup>-/-</sup> e *in vitro* de crecimiento de dichas células con medios condicionados por fibroblastos o endotelio apoyan el hecho de que el AhR estromal ejerce esta función pro-tumoral vía factores difusibles que deben ser secretados al microentorno. En estudios futuros esperamos poder determinar la naturaleza de dichos factores. Por el momento, consideramos posibles



candidatos citoquinas tales como TGF-  $\beta$  dada su interacción funcional con AhR (Guo *et al.* 2004; Santiago-Josefat *et al.* 2004; Gomez-Duran *et al.* 2006; Chang *et al.* 2007; Carvajal-Gonzalez *et al.* 2009; Roman *et al.* 2009) o HGF debido a su capacidad para conferir resistencia a la quimioterapia en melanoma cuando es producido en el estroma (Straussman *et al.* 2012). Por otro lado, el hecho de que el estroma que expresa AhR sea capaz de inhibir la formación de vasos sanguíneos en tumores que expresan pero no en aquellos que carecen de receptor sugiere que las células de melanoma con niveles reducidos de AhR podrían no responder a señales inhibitorias aún por definir. En este contexto, hemos mostrado en estudios previos que el AhR estromal parece contribuir a la angiogénesis tumoral ya que los ratones *AhR*<sup>-/-</sup> no pueden desarrollar una respuesta angiogénica adecuada *in vivo* (Roman *et al.* 2009). Por último, otro mecanismo que puede ayudar a explicar el fenotipo dependiente de AhR está relacionado con la activación del sistema inmune. AhR es requerido para mantener el programa de diferenciación de los linfocitos T<sub>reg</sub>/Th<sub>17</sub> que coordina la activación de las células inmunes (Quintana *et al.* 2008; Veldhoen *et al.* 2008). Una posibilidad interesante es que puesto que las células T reguladoras suprimen la activación de linfocitos reactivos, su depleción en el estroma carente de AhR podría inducir una respuesta inmunológica aumentada, lo que daría lugar a un crecimiento tumoral y a una metastasis reducidas.

En resumen, la activación de AhR tiene una función supresora tumoral intrínseca en células de melanoma y su silenciamiento promueve tumorigénesis y metástasis. Por el contrario, el AhR estromal se comporta como promotor tumoral, favoreciendo el crecimiento del melanoma primario y la metástasis al pulmón. El mecanismo responsable de la actividad supresora tumoral de AhR es complejo y podría implicar el mantenimiento de un fenotipo no migratorio ni invasivo inhibiendo el proceso de EMT y reduciendo la producción de células madre tumorales. Estos resultados podrían tener relevancia clínica ya que la expresión de AHR se encuentra reducida en líneas celulares y en biopsias de pacientes de melanoma humano con enfermedad invasiva. En estos últimos, la co-expresión de AhR con el supresor tumoral caveolina-1 sugiere que el análisis de ambas proteínas puede servir en el pronóstico de evolución de la enfermedad.



## **CAPÍTULO II**



## OBJETIVOS

El objetivo general de este capítulo es analizar la relación funcional entre AhR y la aldehído deshidrogenasa 1a1 (Aldh1a1) y su implicación en la tumorigenesis primaria y la metástasis del melanoma. Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Analizar la expresión de Aldh1a1 en líneas de melanoma murino y humano.
- Inactivar establemente la expresión de la enzima Aldh1a1 en células de melanoma deplecionadas en AhR para analizar su efecto en migración, invasión y diferenciación.
- Estudiar la función de Aldh1a1 en el crecimiento y la metástasis del melanoma.



## **RESULTADOS II**





## 1.- AhR controla la expresión y la actividad de Aldh1a1 en líneas de melanoma murino y humano.

En el capítulo anterior, mostramos que AhR está implicado en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células de melanoma B16F10. Un número significativo de estudios relacionan una alta expresión de Aldh1a1 con un fenotipo indiferenciado y con malignidad tumoral, por lo que decidimos determinar si AhR estaba relacionado con Aldh1a1 en melanoma.

El estudio del promotor del gen *Aldh1a1* murino reveló la existencia de 2 sitios XRE de unión de AhR, lo que sugirió que este receptor podría estar implicado en la regulación de dicho gen (Figura R2.1A). Analizamos entonces la expresión de *Aldh1a1* a nivel de mRNA y observamos que mientras que las células B16F10 sh-AhR sobre-expresaban el gen *Aldh1a1* las células CA-AhR lo reprimían con respecto al nivel presente en la línea wt-AhR (Figura R2.1B). A continuación analizamos si dicho incremento a nivel de mRNA implicaba cambios en la actividad enzimática, y para ello empleamos el reactivo ALDEFLUOR y citometría de flujo. Obtuvimos un resultado paralelo en el que las células sh-AhR mostraron una notable actividad Aldh1a1 con respecto a las células wt-AhR, mientras que las células CA-AhR tuvieron un nivel enzimático marcadamente reducido (Figura R2.1 C).

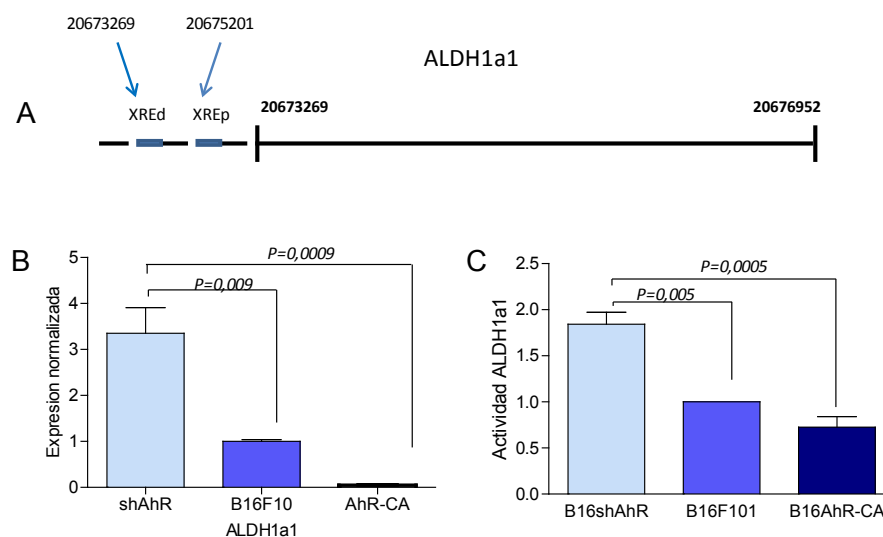


Figura R2.1. AhR reprime los niveles de expresión y de actividad Aldh1a1. (A) Representación esquemática de los sitios XRE de unión para AhR en el promotor del gene Aldh1a1 murino. (B) qRT-PCR para analizar la expresión a nivel de mRNA de Aldh1a1 en las líneas de melanoma de ratón con diferente expresión de AhR. La expresión está normalizada por la correspondiente a Gapdh. (C) Medida del nivel de actividad de la enzímica de Aldh1a1 empleando el reactivo ALDEFLUOR y citometría de flujo.

Con el fin de confirmar la implicación de AhR en la regulación de la *Aldh1a1*, llevamos a cabo experimentos en presencia de la molécula 6-formilindol[3,2-b]carbazol (FICZ), la cual es un metabolito del triptófano actualmente considerado un ligando endógeno del receptor (Wincent *et al.* 2009). El tratamiento con FICZ durante 12 horas indujo un notable aumento en los niveles de mRNA del gen diana de AhR *Cyp1a1*, lo que confirma su validez como ligando del receptor en las células B16F10 (Figura R2.2A). De acuerdo a los resultados descritos anteriormente, FICZ redujo significativamente los niveles de *Aldh1a1* en las células wt-AhR, lo que pone de manifiesto que AhR regula la expresión de dicha enzima (Figura R2.2B) y proporciona apoyo adicional a la represión observada en las células con la forma constitutivamente activada CA-AhR.

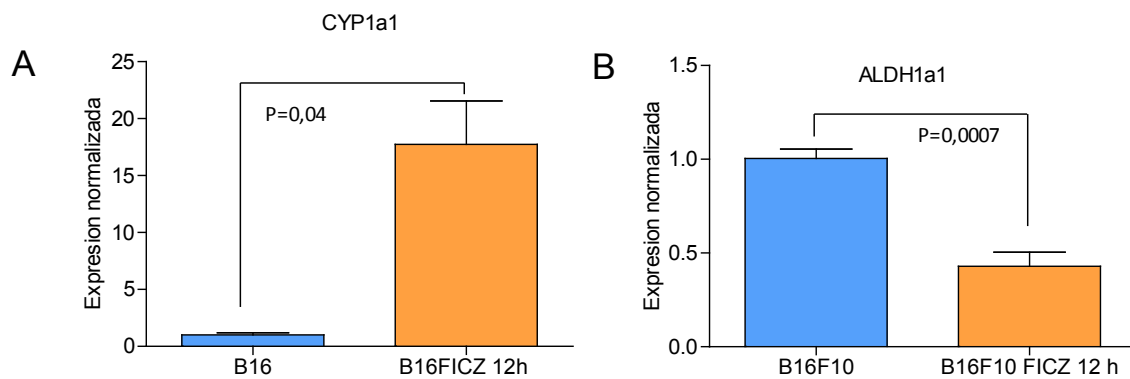
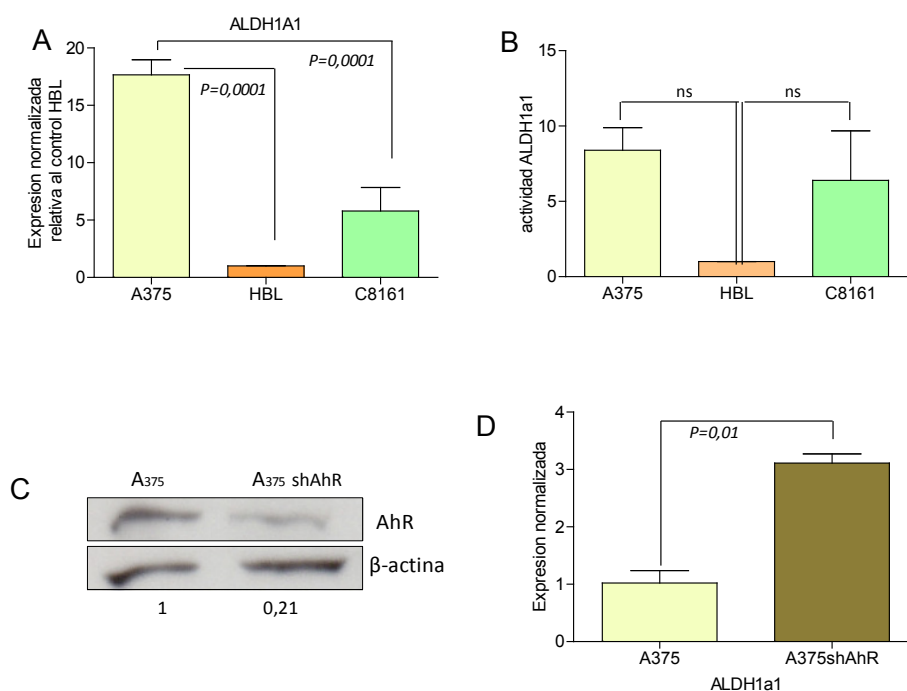


Figura R2.2. El ligando de AhR FICZ reprime la expresión del gen *Aldh1a1* en células de melanoma. (A) Cuantificación del efecto de FICZ sobre la expresión a nivel de mRNA del gen diana de AhR *Cyp1a1*. activación de la ruta de señalización de AhR medida por el nivel de inducción del gen diana *CYP1a1*. (B) Cuantificación de la expresión a nivel de mRNA de *Aldh1a1* en células de melanoma wt-AhR sin tratar y tratadas con FICZ. La expresión de los genes está normalizada por la correspondiente a *Gapdh* en las mismas condiciones experimentales.

A continuación quisimos analizar si, al igual que ocurre en ratón, AHR también modula los niveles de expresión y la actividad ALDH1a1 en células de melanoma humano. Para ello, elegimos tres líneas de melanoma humano metastásicas que tienen diferentes niveles de expresión de AHR, a saber A375, HBL y C8161. En primer lugar medimos los niveles de mRNA de *ALDH1A1* en las tres líneas celulares. Observamos que el nivel de *ALDH1A1* fue superior en las células A375, que expresan altos niveles de AHR, que en las C8161, que expresan bajos niveles de receptor (Figura R2.3A), lo que,

entre otras causas, puede ser debido a que otros reguladores transcripcionales contribuyan al control del gen. Decidimos en cualquier caso determinar la actividad ALDH1A1 en estas líneas celulares empleando ALDEFLUOR y citometría de flujo. Los resultados mostraron que las células A375 tienen una actividad enzimática ALDH1A1 basal similar a la que presentan las C8161 (Figura R2.3B), lo que pareció restar importancia a la implicación de AhR en la regulación de dicha enzima. No obstante estos datos, creemos que AhR está implicado en el mecanismo de regulación de ALDH1A1 en estas células de melanoma humano en base a los resultados de rescate y de depleción de AHR obtenidos. La transfección estable vía retroviral de un sh-AhR en las células A375 redujo significativamente los niveles de receptor y, en paralelo, incrementó significativamente la expresión de *ALDH1A1* (Figura R2.3C). Consistentemente, el rescate de los niveles de AhR en las células C8161 por transfección transiente de un vector de expresión fue suficiente para reprimir significativamente los niveles de mRNA de ALDH1A1 (Figura R2.3D). Por tanto, AHR participa en la regulación de la ALDH1A1 en melanoma humano si bien otros mecanismos parecen tener también un papel relevante. Cabe también la posibilidad de que la diferencia existente en actividad ALDH1A1 basal entre las células A375 y C8161 sea independiente de AHR y que, sin embargo, los cambios en los niveles del receptor afecten la expresión de la enzima.



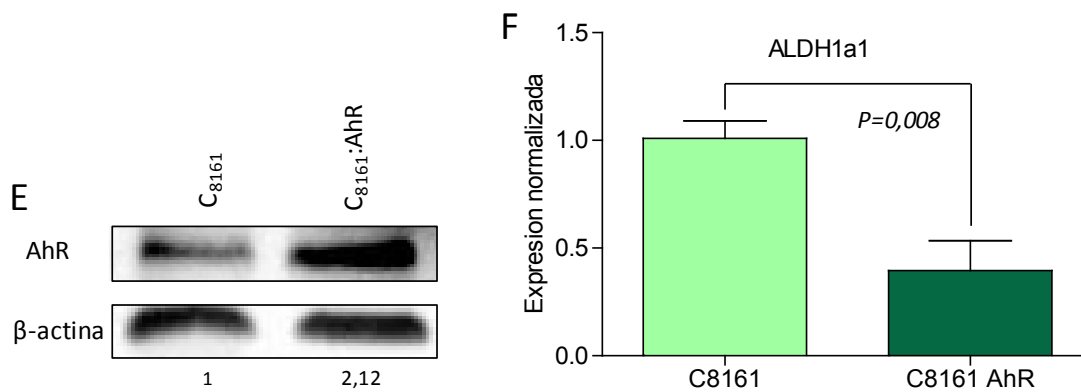


Figura R2.3. Las células de melanoma con diferente nivel de AhR muestran un nivel similar de actividad ALDH1A1 si bien AhR puede modular la expresión de esta enzima. (A) Cuantificación de los niveles de mRNA de ALDH1A1 por qRT-PCR en las células A375, HBL y C8161. (B) Medida de la actividad ALDH1A1 empleando ALDEFLUOR y citometría de flujo. (C) Modulación de los niveles de AHR en la línea de melanoma humano A375 por transducción retroviral con un sh-AHR y cuantificación de la expresión a nivel de mRNA de la ALDH1A1. La expresión de AHR se han determinado por Western blot utilizando b-actina como control de carga. Los niveles de ALDH1A1 se han determinado por qRT-PCR y los resultados se han normalizado por la expresión de Gapdh. (D) Modulación de los niveles de AHR en la línea de melanoma humano C8161 por transfección transiente con un vector de expresión pcDNA:AHR y cuantificación de la expresión a nivel de mRNA de la ALDH1A1. La expresión de AHR se han determinado por Western blot utilizando b-actina como control de carga. Los niveles de ALDH1A1 se han determinado por qRT-PCR y los resultados se han normalizado por la expresión de Gapdh.

Conjuntamente, estos resultados indican que AHR está implicado en la regulación de la enzima ALDH1A1 y corroboran los obtenidos en el modelo murino

## 2. El silenciamiento de ALDH1a1 provoca una menor migración e invasión

Hasta este punto, los resultados obtenidos habían mostrado que el silenciamiento de AhR incrementa el crecimiento y la metástasis tumoral. Adicionalmente, el silenciamiento de AhR también da lugar a un aumento en la expresión y en la actividad de Aldh1a1. Dado que se considera que un nivel elevado de Aldh1a1 contribuye a la malignidad tumoral (Black and Vasiliou 2009; Luo *et al.* 2012) y al mantenimiento de un fenotipo de célula madre tumoral, nos planteamos depleccionar la expresión de esta enzima en células B16F10 previamente interferidas para AhR. Con ello podremos

determinar si *Aldh1a1* tiene un papel sinérgico con AhR en la tumorigenesis y la metástasis del melanoma. Mediante transducción retroviral creamos una línea B16F10 sh-AhR+sh-Aldh1a1 utilizando como base las células sh-AhR (Figura R2.4A). De manera previa comprobamos la eficiencia del sh-Aldh1a1 para reducir los niveles de expresión de la enzima llevando a cabo su transfección transiente en la línea sh-AhR (Figura R2.4B). Los clones obtenidos tras la selección con antibiótico fueron analizados por citometría separativa (*cell sorting*) para identificar aquellos con menor actividad *Aldh1a1* empleando el kit ALDEFUOR (Figura R2.4C).

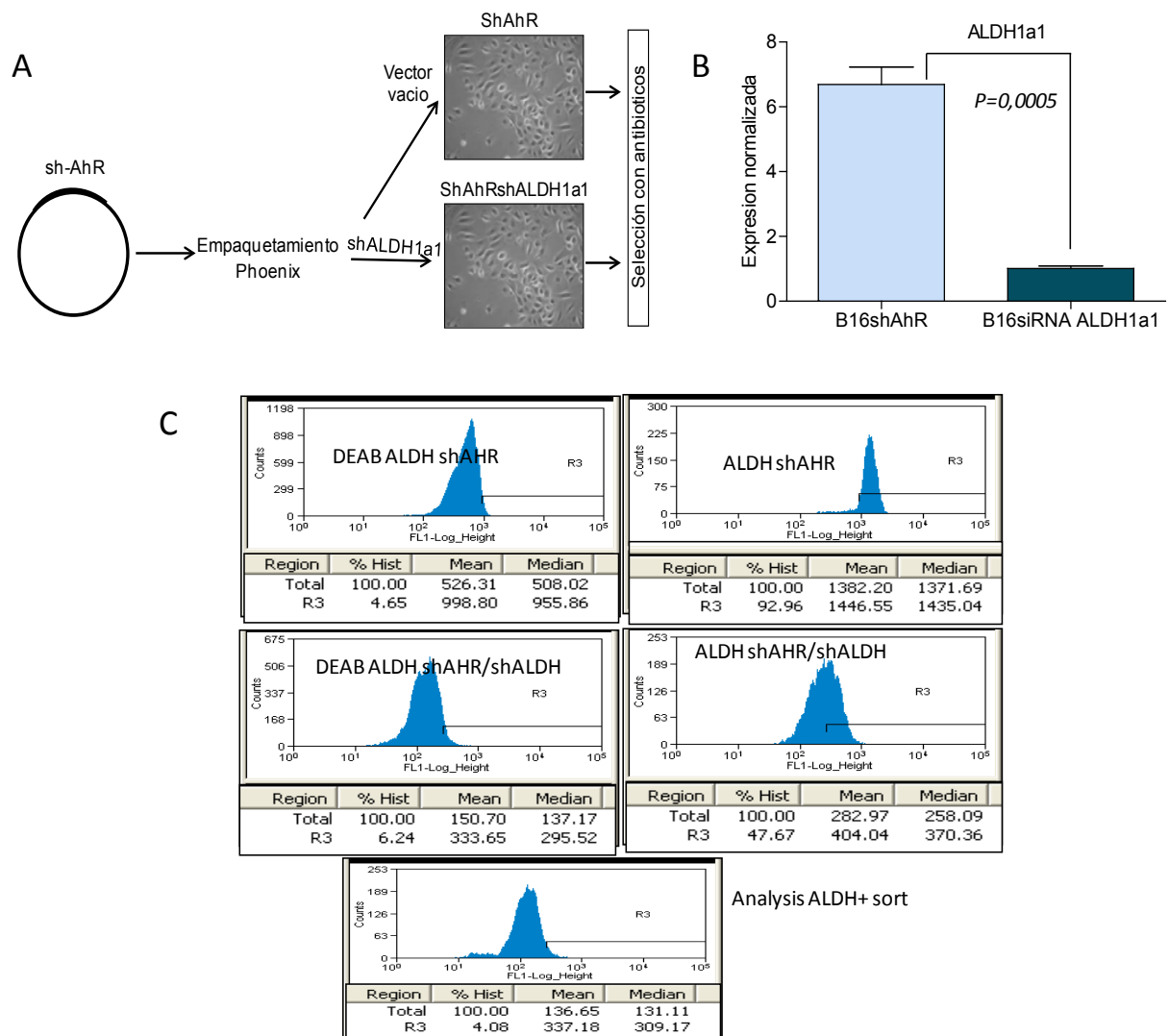
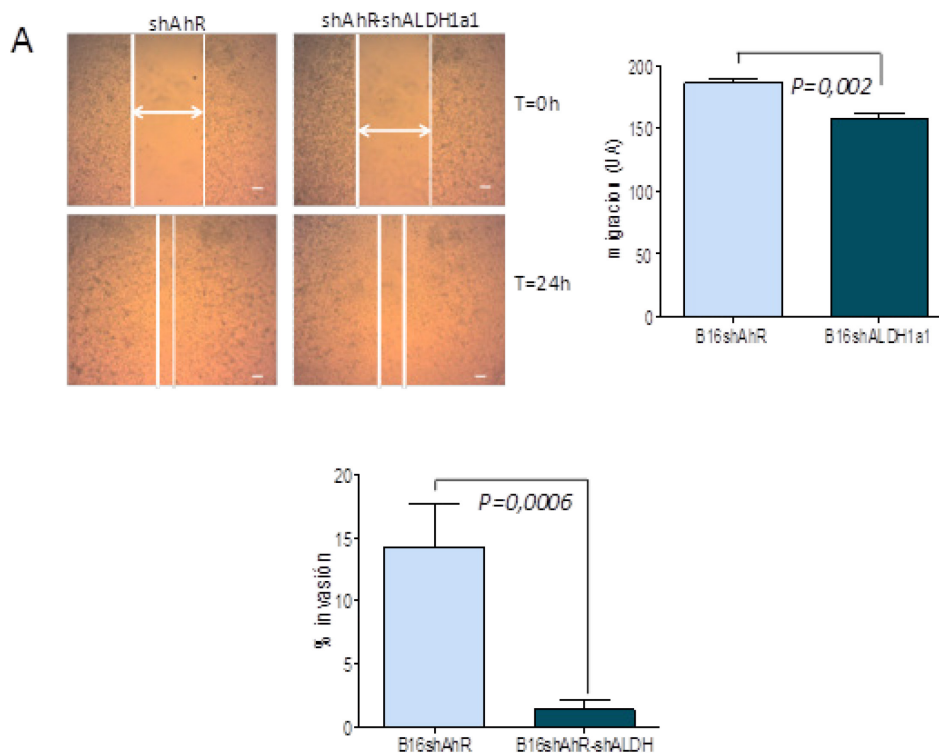


Figura R2.4. Generación de una línea de melanoma murino B16F10 con depleción simultánea de AhR y de *Aldh1a1*. (A) Esquema del método de transducción retroviral para la creación de la línea sh-AhR+sh-Aldh1a1. (B) Comprobación de la eficiencia del vector sh-Aldh1a1 por transfección transiente en células sh-AhR. La expresión del mRNA de *Aldh1a1* se ha normalizado por la del gen *Gapdh*. (C) Análisis y selección de clones con muy baja actividad *Aldh1a1* mediante citometría y tinción con ALDEFUOR.

Una vez obtenida y propagada la línea celular con doble depleción de AhR y de Aldh1a1 (en adelante sh-AhR+sh-Aldh1a1) llevamos a cabo estudios para determinar su comportamiento en melanoma incluyendo el análisis de migración e invasión celular, morfología celular y clonogenicidad y crecimiento y metástasis tumoral.

Las células con doble depleción sh-AhR+sh-Aldh1a1 mostraron una reducción discreta aunque significativa en migración (Figura R2.5A) y una marcada inhibición en invasión (Figura R2.5B) con respecto a las células sh-AhR que expresan niveles endógenos de Aldh1a1, lo que es coherente con el papel pro-migratorio atribuido a la Aldh1A1. Los experimentos de formación de clones en 2-D mostraron que la reducción de los niveles de Aldh1a1 en las células sh-AhR+sh-Aldh1a1 bloqueó significativamente la dispersión celular y la morfología mesenquimal que presentaron las células control sh-AhR (Figura R2.5C). Resultados similares se obtuvieron en cultivos 3-D empleando Matrigel (Figura R2.5C). La cuantificación del número de clones reveló que la proporción de los que tenían morfología expandida era superior en la línea sh-AhR mientras que los que tenían morfología cerrada lo eran en la línea sh-AhR+sh-Aldh1a1 (Figura R2.5D).

*Estos resultados indican que la depleción de Aldh1a1 bloquea en parte la actividad pro-migratoria y pro-invasiva que causa la depleción de AhR y que, por tanto, Aldh1a1 está implicada en el fenotipo dependiente de AhR*



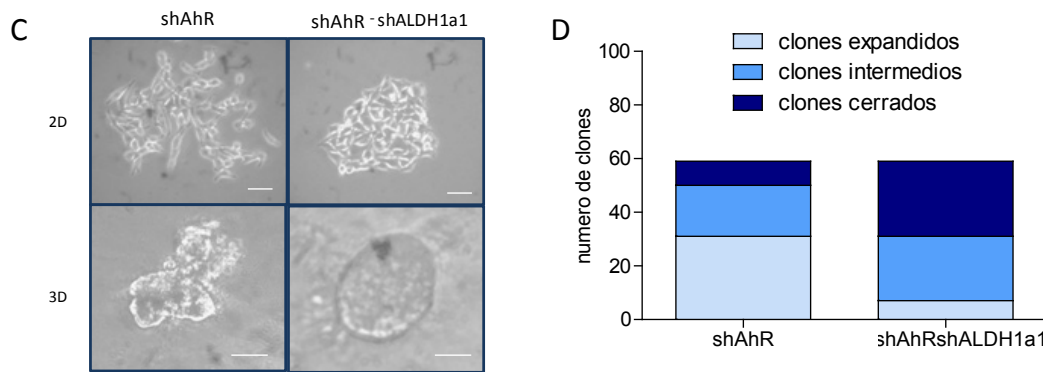


Figura R2.5. La depleción de *Aldh1a1* bloquea parcialmente el efecto pro-migratorio y pro-invasivo que induce la depleción de *AhR*. (A) Ensayo de cierre de herida en placa (*wound healing*) y cuantificación de la distancia recorrida por las células tras 24 h de ensayo y tras la retirada del FBS. (B) Cuantificación de la invasión a través de transwells cubiertos por Matrigel tras 24 h de ensayo y mediante un gradiente de suero. (C) Ensayo de clonogenicidad de las células *sh-AhR* y *sh-AhR+sh-Aldh1a1* en 2-D y en 3-D. (D) Cuantificación de los ensayos de clonogenicidad. Los clones se han dividido en cerrados, intermedios y abiertos en función de su compactación. Barra de error= 50  $\mu$ m

### 3.- La supresión de *Aldh1a1* reduce el número de células con características de célula madre tumoral.

Dado el efecto que provoca la supresión de *Aldh1a1* en la migración y la metástasis de las células *sh-AhR*, analizamos si dicha enzima estaba implicada en el mantenimiento de la población con fenotipo de célula madre tumoral. Utilizamos los mismos marcadores de superficie  $CD133^+$ ,  $CD44^+$ ,  $CD29^+$  y analizamos sus niveles mediante citometría de flujo. Observamos que las células *sh-AhR+sh-Aldh1a1* tenían una reducción significativa de los mismos en comparación con la línea *sh-AhR* (Figura R2.6A). Coherentemente, el ensayo de formación de melanosferas mostró que las células con depleción conjunta de *AhR* y *Aldh1a1* dieron lugar a un número similar de esferas pero de menor tamaño que las originadas por la línea *sh-AhR* (Figura R2.6B). Estos resultados sugieren que la reducción de los niveles de *Aldh1a1* compromete el fenotipo de célula madre tumoral inducido por la carencia de *AhR*.

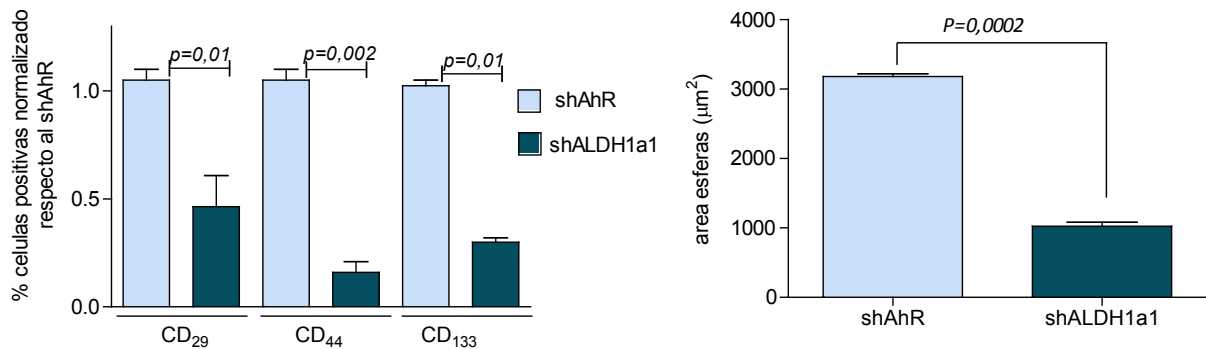


Figura R2.6. La depleción de *Aldh1a1* compromete el fenotipo de célula madre tumoral inducido por carencia de AhR. (A) Análisis mediante citometría de flujo del porcentaje de células CD133<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup> en células sh-AhR y sh-AhR+sh-Aldh1a1. (B) Cuantificación del área de las esferas formadas por cada línea celular en el ensayo de melanosferas.

Al considerar conjuntamente los resultados obtenidos con las células sh-AhR y sh-AhR+sh-Aldh1a1, nos planteamos la posibilidad de que AhR y Aldh1a1 pudieran contribuir a la regulación de la expresión de genes implicados en pluripotencialidad. Elegimos y analizamos por qRT-PCR un grupo de cuatro genes compuesto por *Tcf-4*, *c-myc*, *Klf-4* y *Sox-2*. Los resultados obtenidos mostraron que todos ellos se expresan a niveles detectables en células sh-AhR y sh-AhR+sh-Aldh1a1 y que sólo Sox-2 tuvo un nivel de mRNA reducido en la segunda línea celular (Figura R2.7A), sugiriendo que la Aldh1a1 puede ser un regulador positivo de Sox-2. Por otro lado, la expresión ectópica de Sox-2 en células sh-AhR resultó en un incremento en los niveles de Aldh1a1, lo que indica que existe una regulación desde Sox-2 hasta Aldh1a1 (Figura R2.7B). Coherentemente, Sox-2 no indujo Aldh1a1 en células que tienen interferida su expresión (Figura R2.7B).

*Por lo tanto, los menores niveles de Aldh1a1 están asociados con un fenotipo menos mesenquimal, y con una reducción en los niveles de marcadores de células madre tumorales y de pluripotencia.*



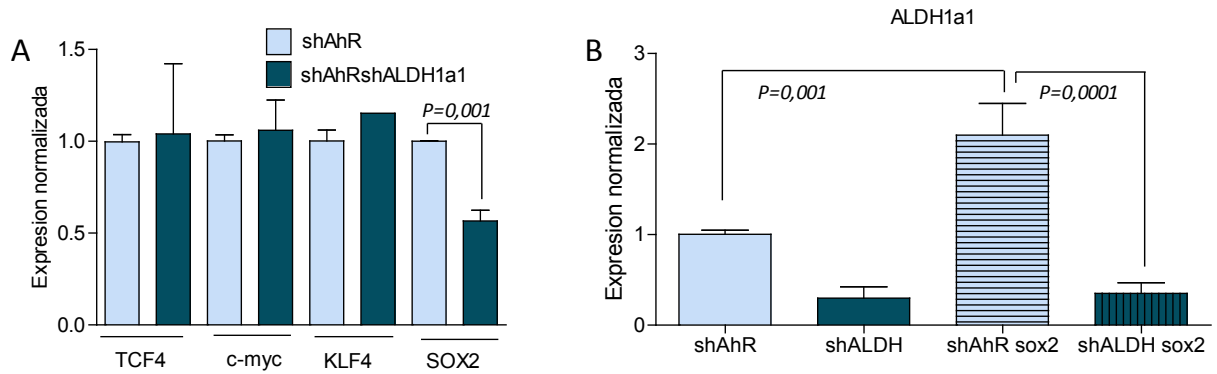
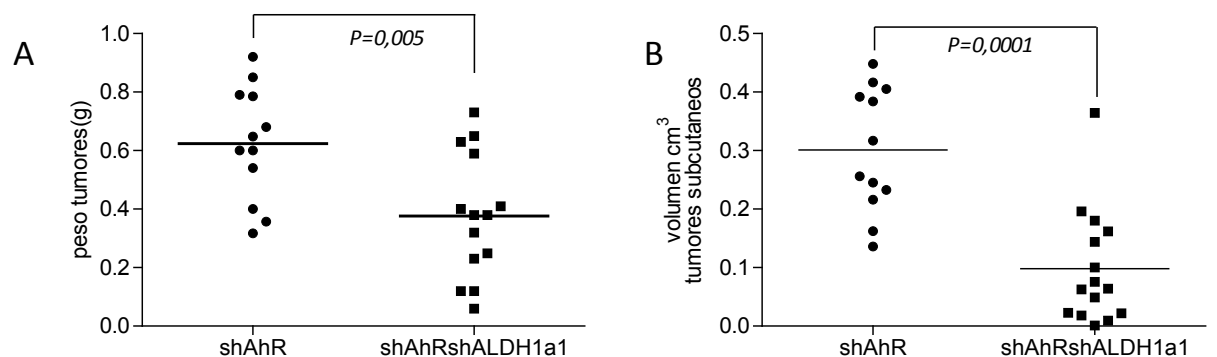


Figura R2.7. *Aldh1a1* y *Sox-2* tienen un mecanismo de regulación coordinado. (A) Medida del nivel de mRNA de genes de pluripotencia. Las determinaciones se realizaron por qRT-PCR. Los resultados fueron normalizados por el nivel de expresión de *Gapdh*. (B) Los niveles de expresión de *ALDH1a1* se analizaron en células *sh-AhR* y *sh-AhR+sh-Aldh1a1* en condiciones basales y tras ser transfectadas de manera transiente con un vector de expresión para *Sox-2*. Las determinaciones se realizaron por qRT-PCR. Los resultados fueron normalizados por el nivel de expresión de *Gapdh*.

#### 4.-La supresión de la actividad *Aldh1a1* retrasa el crecimiento y la metástasis de células de melanoma.

Puesto que uno de los modelos actuales sobre la iniciación tumoral plantea que una población de células indiferenciadas dentro del tumor son las responsables de su crecimiento y recidiva, nos planteamos la posibilidad de que las células *sh-AhR+sh-Aldh1a1* tuvieran menor capacidad para inducir tumores y para generar metástasis. Por ello, inyectamos células *sh-AhR* y *sh-AhR+sh-Aldh1a1* en ratones receptores *AhR+/+* de manera subcutánea para determinar tumorigenesis primaria y por vía intravenosa para analizar la formación de metástasis.



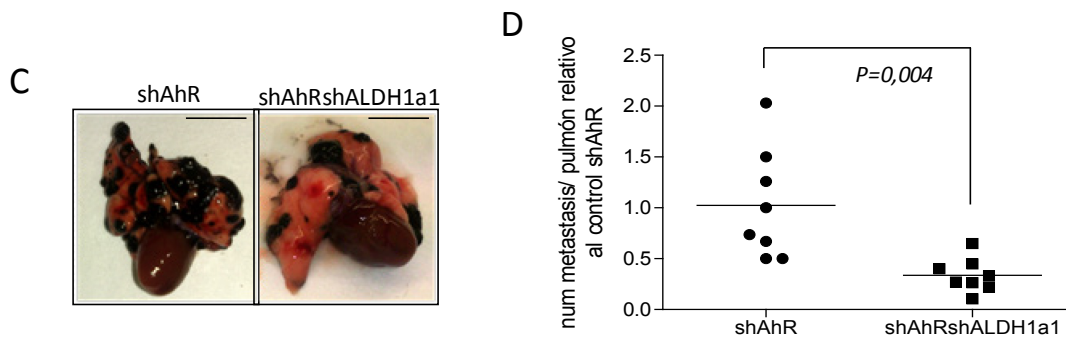


Figura R.2.8. La depleción de *Aldh1a1* reduce la tumorigénesis y la metástasis. (A,B) El peso (A) y el volumen (B) de los tumores primarios se determinó a los 15 días desde la inyección de las células. El volumen fue calculado empleando la fórmula  $V=X^2*Y/2$  donde X e Y se corresponden con el ancho y el largo de la pieza tumoral, respectivamente. (C) Imagen representativa de las metástasis pulmonares producidas por las células sh-AhR y sh-AhR+sh-Aldh1a1. (D) Cuantificación del número de metástasis por ratón con respecto a la media de cada experimento. Barra de error= 1 cm

Pudimos observar que la línea sh-AhR+sh-Aldh1a1 produjo tumores significativamente menores en peso y en volumen que los inducidos por las células shAhR (Figura R2.8A, B). En cuanto a su capacidad metastática encontramos un resultado similar, de modo que aquellas células con niveles reducidos de Aldh1a1 dieron lugar a un número menor número de metástasis pulmonares que las células sh-AhR empleadas como control de la actividad Aldh1a1 (Figura R2.8C, D).

Con el fin de confirmar estos resultados, llevamos a cabo experimentos adicionales de metástasis haciendo un seguimiento tumoral in vivo con un equipo IVIS y las líneas celulares sh-AhR+sh-Aldh1a1 marcadas establemente con el gen que codifica para la luciferasa de *Renilla*. El crecimiento y la diseminación metastática de las células fueron monitorizadas automáticamente a días 0, 2, 7, 11, 14 y 21 mediante captura de imagen y medida de luminiscencia (Figura R2.9a). Además de en pulmón, se detectaron nódulos metastáticos en otros órganos tales como riñón, bazo, estómago, que no pudieron ser observados previamente de forma macroscópica. Resulta interesante que el análisis de la diseminación tumoral mostró que la reducción de la expresión de Aldh1a1 redujo parcialmente la metástasis tumoral global inducida por depleción de AhR (Figura R2.9B). Adicionalmente, los ratones inyectados con células sh-AhR+sh-Aldh1a1 tuvieron una cierta ventaja de supervivencia a tiempos largos con respecto a los inyectados con células sh-AhR (Figura R2.9C).

Por lo tanto, la reducción de los niveles de *Aldh1a1* bloquea parcialmente el crecimiento y la metástasis tumoral en células de melanoma con bajos niveles de *AhR*.

Adicionalmente, *Aldh1a1* y *AhR* pueden ser marcadores de crecimiento y de metástasis en melanoma.

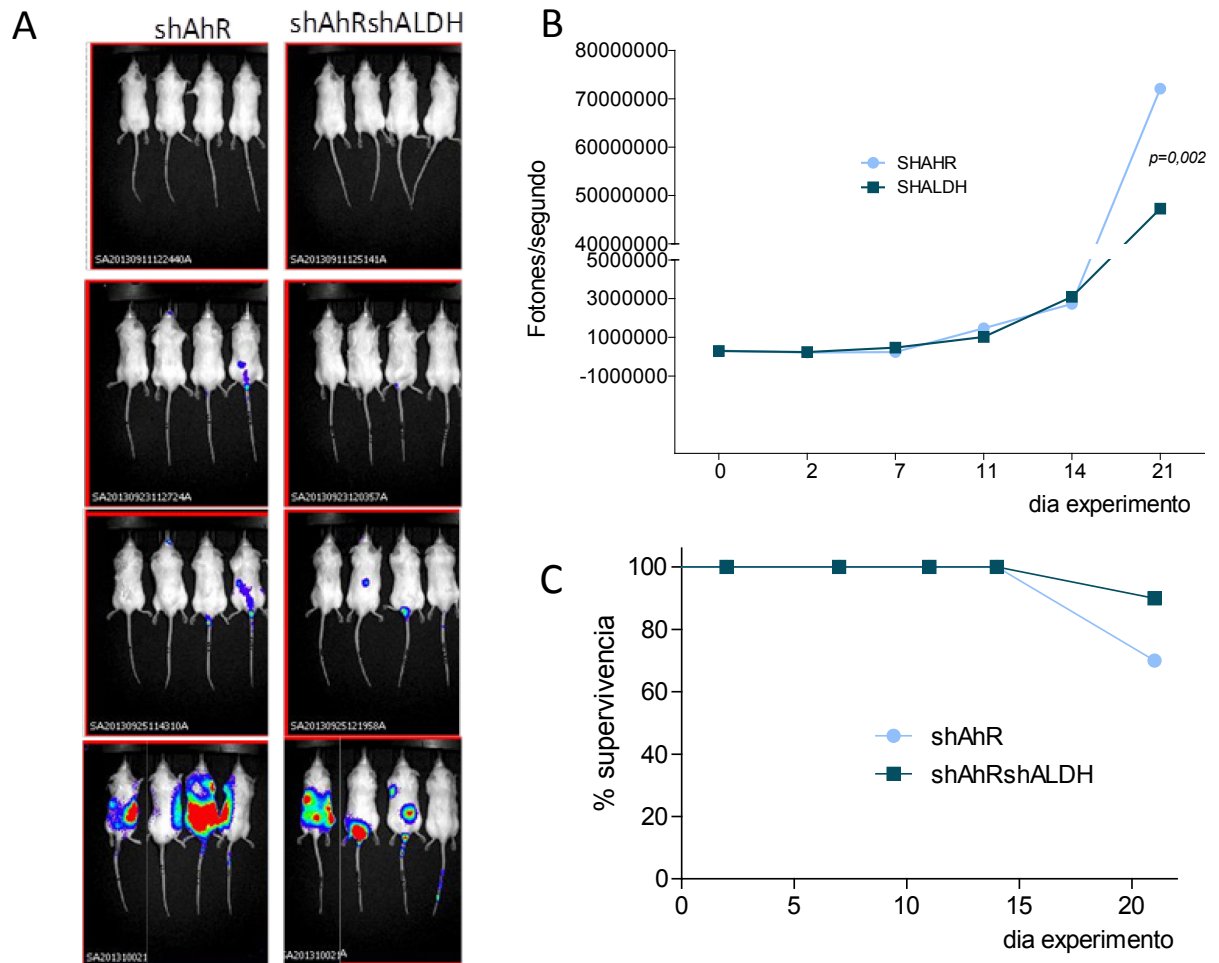


Figura R.2.9. La reducción en la expresión de *Aldh1a1* compromete la diseminación metastática del melanoma. (A) Imágenes representativas de la diseminación metastática de células *sh-AhR+sh-Aldh1a1-LUC* y *sh-AhR-LUC* obtenidas empleando un equipamiento IVIS. (B) Representación gráfica de los niveles de metástasis global determinados por la emisión fotónica total de cada ratón a los 21 días de experimento. (C) Representación gráfica de la tasa de supervivencia de los animales inyectados con células *sh-AhR+sh-Aldh1a1-LUC* y *sh-AhR-LUC*.



## **DISCUSION II**



Existe un gran interés en Oncología para descifrar los mecanismos moleculares que controlan el equilibrio entre diferenciación y pluripotencia en las células tumorales ya que estos regulan procesos como recidiva, metástasis y resistencia frente a agentes terapéuticos. En este contexto, existen numerosas evidencias que asocian las células con fenotipo de célula madre tumoral a la progresión tumoral. La existencia de células madre tumorales en melanoma es objeto de debate si bien se consideran indicativos de dicho fenotipo la expresión de los marcadores CD20(Fang *et al.* 2005), CD133(Collins *et al.* 2005; Rappa *et al.* 2008), ABCB5(Schatton *et al.* 2008) y CD271(Boiko *et al.* 2010).

La actividad aldehído deshidrogenasa (Aldh1a1) es otro marcador del fenotipo indiferenciado en células madre hematopoyéticas, neuronales y de próstata, así como en células madre tumorales de diferentes tipos de cáncer incluyendo mama (Croker *et al.* 2009), pulmón (Ucar *et al.* 2009) y próstata (van den Hoogen *et al.* 2010). Hasta recientemente, existía controversia sobre si la enzima Aldh1a1 podía ser considerada un marcador de células madre tumorales en melanoma. Sin embargo, un estudio reciente ha mostrado que las células de melanoma humano con elevada actividad Aldh1a poseen propiedades de células madre tumorales y que su depleción induce arresto en ciclo celular y apoptosis (Luo *et al.* 2012).

En el primer capítulo de esta Tesis hemos mostrado que el papel supresor de AhR en el crecimiento y la metástasis tumoral puede cursar a través de la reducción de la población de células madre tumorales. En este segundo capítulo, proponemos que la actividad Aldh1a1 es un marcador en melanoma dependiente de AhR. Es interesante que el papel supresor que provoca AhR implica la represión de Aldh1a1, cuya actividad está asociada a mal pronóstico. Parece existir, por tanto, un mecanismo coordinado por el que la activación del supresor tumoral AhR conlleva la inhibición del agente pro-tumoral Aldh1a1. Contrariamente, la depleción de AhR en la células sh-AhR mantiene niveles elevados de Aldh1a1, lo que sugiere que ambas colaboran en potenciar tumorigenesis primaria y metástasis en melanoma. De hecho, la reducción de Aldh1a1 en células de melanoma B16F10 compromete de manera significativa el crecimiento tumoral y la metástasis inducidas por depleción de AhR, lo que demuestra que la actividad Aldh1a1 es necesaria para que la pérdida de función supresora tumoral dependiente de AhR incremente el del melanoma. AhR modula los niveles de expresión transcripcional de *Aldh1a1* no sólo en células murinas sino también en melanoma humano. Esta conclusión está sustentada por el hecho de que tanto la activación estable como la adición de ligando

exógeno reprimió los niveles y la actividad Aldh1a1, mientras que la depleción de AhR los incrementó. Lamentablemente, no hemos podido detectar la presencia de AhR en ninguno de los dos sitios XRE localizados en el promotor del gen *Aldh1a1* por ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), por lo que no podemos concluir si el mecanismo de regulación es directo o indirecto.

Desde el punto de vista funcional, la mayor actividad Aldh1a1 estuvo asociada a un incremento en la capacidad migratoria e invasiva de las células de melanoma, a una morfología más mesenquimal y a una potenciación en la expresión de marcadores de indiferenciación. Este resultado es coherente con la hipótesis que propone que aquellas células con características de células madre poseen un fenotipo más fibroblástico, posiblemente por estar sufriendo un proceso de transición epitelio-mesénquima (Mani *et al.* 2008; Polyak and Weinberg 2009). De este modo, cabe la posibilidad de que la depleción de AhR (pero no de Aldh1a1) enriquezca la población de células con características mesenquimales pro-migratorias. Conjuntamente, estos resultados indican que Aldh1a1 favorece migración e invasión, lo que está de acuerdo con estudios previos que muestran que el silenciamiento de Aldh1a1 en carcinoma renal disminuye invasión celular (Wang *et al.* 2013).

En cuanto a la validación de la Aldh1a1 como marcador de células madre tumorales en melanoma, nuestro estudio proporciona apoyo adicional a trabajos anteriores basados en el análisis de marcadores de superficie (Luo *et al.* 2012) y aporta una correlación entre dichos marcadores y la activación de la enzima. De hecho, la correlación de Aldh1a1 con marcadores de superficie ha sido encontrada también en tumores sólidos de ovario (Steg *et al.* 2012) y pulmón (Alamgeer *et al.* 2013), lo que incrementa su interés en cáncer.

Este estudio nos ha permitido también definir una posible relación entre Aldh1a1 y Sox-2, un gen implicado en mantener pluripotencia y fenotipo de célula madre tumoral. Nuestros resultados iniciales sugieren la existencia de un mecanismo de regulación coordinado por el que Aldh1a1 es necesaria para mantener la expresión de Sox-2 y, a su vez, Sox-2 incrementa los niveles de Aldh1a1. Dado que Sox-2 está relacionado con pluripotencia y Aldh1a1 con células madre tumorales, esta interacción funcional podría contribuir al fenotipo de célula madre tumoral en melanoma.



Por tanto, la reducción de la actividad Aldh1a1 compromete tanto la tumorigénesis primaria como la metástasis. Este efecto es dependiente de AhR e implica una reducción en parámetros de pluripotencia y en el fenotipo de célula madre tumoral. De este modo, los niveles de expresión de AhR y de Aldh1a1 podrían usarse como marcadores potenciales de progresión en melanoma.



## **CONCLUSIONES**



1. El receptor de dioxina AhR tiene un papel relevante y dual en la interacción tumor-estroma.
2. AhR ejerce un papel de supresor tumoral en la célula tumoral y de oncogén en el estroma.
3. La activación constitutiva de AhR bloquea tumorigenesis primaria y metástasis en melanoma.
4. El papel supresor tumoral de AhR en melanoma está relacionado con una menor migración e invasión y con una reducción en la población de células madre tumorales.
5. La expresión de AhR está reducida en líneas celulares de melanoma humano y en biopsias de pacientes de melanoma.
6. AhR y caveolina-1 tienen un perfil de expresión paralelo en melanoma y pueden tener valor pronóstico en esta enfermedad.
7. La actividad aldehído deshidrogenasa 1a1 (Aldh1a1) está reprimida por AhR en células de melanoma murino y humano. El efecto supresor de AhR en melanoma está coordinado con la represión de la proteína pro-tumoral Aldh1a1.
8. El silenciamiento de Aldha1 inhibe la migración y la invasión de células de melanoma.
9. La inhibición de Aldh1a1 in vivo inhibe el crecimiento y la metástasis tumoral.
10. La expresión coordinada de AhR y de Aldh1a1 es potencialmente relevante como marcador en melanoma.



## BIBLIOGRAFIA

- Abbott, B. D., L. S. Birnbaum, et al. (1995). "Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo." *Dev Dyn* **204**(2): 133-143.
- Abbott, B. D., J. E. Schmid, et al. (1999). "Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse." *Toxicol Appl Pharmacol* **155**(1): 62-70.
- Abdelrahim, M., R. Smith, 3rd, et al. (2003). "Aryl hydrocarbon receptor gene silencing with small inhibitory RNA differentially modulates Ah-responsiveness in MCF-7 and HepG2 cancer cells." *Mol Pharmacol* **63**(6): 1373-1381.
- Adams, S., N. Braidly, et al. (2012). "The kynurenine pathway in brain tumor pathogenesis." *Cancer Res* **72**(22): 5649-5657.
- Alamgeer, M., V. Ganju, et al. (2013). "The prognostic significance of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) and CD133 expression in early stage non-small cell lung cancer." *Thorax*.
- Andersson, P., J. McGuire, et al. (2002). "A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(15): 9990-9995.
- Andersson, P., C. Rubio, et al. (2005). "Gastric hamartomatous tumours in a transgenic mouse model expressing an activated dioxin/Ah receptor." *Anticancer Res* **25**(2A): 903-911.
- Andreola, F., D. F. Calvisi, et al. (2004). "Reversal of liver fibrosis in aryl hydrocarbon receptor null mice by dietary vitamin A depletion." *Hepatology* **39**(1): 157-166.
- Andreola, F., P. M. Fernandez-Salguero, et al. (1997). "Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR<sup>-/-</sup>) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism." *Cancer Res* **57**(14): 2835-2838.
- Androutsopoulos, V. P., A. M. Tsatsakis, et al. (2009). "Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention." *BMC Cancer* **9**: 187.
- Armstrong, B. K. and A. Krickler (2001). "The epidemiology of UV induced skin cancer." *J Photochem Photobiol B* **63**(1-3): 8-18.
- Armstrong, L., M. Stojkovic, et al. (2004). "Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity." *STEM CELLS* **22**(7): 1142-1151.
- Baba, T., J. Mimura, et al. (2005). "Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction." *Mol Cell Biol* **25**(22): 10040-10051.
- Bar Hoover, M. A., J. M. Hall, et al. (2010). "Aryl hydrocarbon receptor regulates cell cycle progression in human breast cancer cells via a functional interaction with cyclin-dependent kinase 4." *Mol Pharmacol* **77**(2): 195-201.
- Barouki, R., X. Coumoul, et al. (2007). "The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein." *FEBS Lett* **581**(19): 3608-3615.
- Benedict, J. C., T. M. Lin, et al. (2000). "Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development." *Toxicol Sci* **56**(2): 382-388.
- Berg, P. and I. Pongratz (2001). "Differential Usage of Nuclear Export Sequences Regulates Intracellular Localization of the Dioxin (Aryl Hydrocarbon) Receptor." *J Biol Chem* **276**(46): 43231-43238.
- Bergander, L., N. Wahlstrom, et al. (2003). "Characterization of in vitro metabolites of the aryl hydrocarbon receptor ligand 6-formylindolo[3,2-b]carbazole by liquid chromatography-mass spectrometry and NMR." *Drug Metab Dispos* **31**(2): 233-241.
- Bernshausen, T., B. Jux, et al. (2006). "Tissue distribution and function of the Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl hydrocarbon receptor deficient mice." *Arch Toxicol* **80**(4): 206-211.

- Black, W. and V. Vasiliou (2009). "The aldehyde dehydrogenase gene superfamily resource center." *Hum Genomics* **4**(2): 136-142.
- Blankenship, A. and F. Matsumura (1997). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced activation of a protein tyrosine kinase, pp60src, in murine hepatic cytosol using a cell-free system." *Mol Pharmacol* **52**(4): 667-675.
- Boiko, A. D., O. V. Razorenova, et al. (2010). "Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271." *Nature* **466**(7302): 133-137.
- Boitano, A. E., J. Wang, et al. (2010). "Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells." *Science* **329**(5997): 1345-1348.
- Boverhof, D. R., L. D. Burgoon, et al. (2005). "Temporal and dose-dependent hepatic gene expression patterns in mice provide new insights into TCDD-Mediated hepatotoxicity." *Toxicol Sci* **85**(2): 1048-1063.
- Breslow, A. (1970). "Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma." *Ann Surg* **172**(5): 902-908.
- Bui, L. C., C. Tomkiewicz, et al. (2009). "Nedd9/Hef1/Cas-L mediates the effects of environmental pollutants on cell migration and plasticity." *Oncogene* **28**(41): 3642-3651.
- Bunaciu, R. P. and A. Yen (2011). "Activation of the aryl hydrocarbon receptor AhR Promotes retinoic acid-induced differentiation of myeloblastic leukemia cells by restricting expression of the stem cell transcription factor Oct4." *Cancer Res* **71**(6): 2371-2380.
- Burbach, K. M., A. Poland, et al. (1992). "Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(17): 8185-8189.
- Burger, P. E., R. Gupta, et al. (2009). "High aldehyde dehydrogenase activity: a novel functional marker of murine prostate stem/progenitor cells." *STEM CELLS* **27**(9): 2220-2228.
- Caruso, J. A., P. A. Mathieu, et al. (2004). "Differential susceptibilities of murine hepatoma 1c1c7 and Tao cells to the lysosomal photosensitizer NPe6: influence of aryl hydrocarbon receptor on lysosomal fragility and protease contents." *Mol Pharmacol* **65**(4): 1016-1028.
- Carvajal-Gonzalez, J. M., S. Mulero-Navarro, et al. (2009). "The dioxin receptor regulates the constitutive expression of the vav3 proto-oncogene and modulates cell shape and adhesion." *Mol Biol Cell* **20**(6): 1715-1727.
- Carvajal-Gonzalez, J. M., A. C. Roman, et al. (2009). "Loss of dioxin-receptor expression accelerates wound healing in vivo by a mechanism involving TGF{beta}." *J Cell Sci* **122**(Pt 11): 1823-1833.
- Carver, L. A. and C. A. Bradfield (1997). "Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo." *J Biol Chem* **272**(17): 11452-11456.
- Casado, F. L., K. P. Singh, et al. (2010). "The aryl hydrocarbon receptor: regulation of hematopoiesis and involvement in the progression of blood diseases." *Blood Cells Mol Dis* **44**(4): 199-206.
- Collins, A. T., P. A. Berry, et al. (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." *Cancer Res* **65**(23): 10946-10951.
- Corchero, J., G. Martin-Partido, et al. (2004). "Liver portal fibrosis in dioxin receptor-null mice that overexpress the latent transforming growth factor-beta-binding protein-1." *Int J Exp Pathol* **85**(5): 295-302.
- Corti, S., F. Locatelli, et al. (2006). "Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity." *STEM CELLS* **24**(4): 975-985.
- Crews, S. T. (1998). "Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins." *Genes Dev* **12**(5): 607-620.
- Crocker, A. K., D. Goodale, et al. (2009). "High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability." *J Cell Mol Med* **13**(8B): 2236-2252.



- Cunningham, B. D. M., M. D. Threadgill, et al. (1996). "Substituted Flavones as Aryl Hydrocarbon (Ah) Receptor Agonists and Antagonists." *Biochemical Pharmacology* **51**(8): 1077-1087.
- Chan, W. K., G. Yao, et al. (1999). "Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation." *J Biol Chem* **274**(17): 12115-12123.
- Chang, X., Y. Fan, et al. (2007). "Ligand-independent regulation of transforming growth factor beta1 expression and cell cycle progression by the aryl hydrocarbon receptor." *Mol Cell Biol* **27**(17): 6127-6139.
- Cho, Y. C., W. Zheng, et al. (2004). "Disruption of cell-cell contact maximally but transiently activates AhR-mediated transcription in 10T1/2 fibroblasts." *Toxicol Appl Pharmacol* **199**(3): 220-238.
- Davarinos, N. A. and R. S. Pollenz (1999). "Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export." *J.Biol.Chem.* **274**(40): 28708-28715.
- Davies, H., G. R. Bignell, et al. (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." *Nature* **417**(6892): 949-954.
- de Oliveira, S. K., M. Hoffmeister, et al. (2007). "Phosphodiesterase 2A forms a complex with the co-chaperone XAP2 and regulates nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor." *J Biol Chem* **282**(18): 13656-13663.
- Degner, S. C., A. J. Papoutsis, et al. (2009). "Targeting of aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of cyclooxygenase-2 expression by the indole-3-carbinol metabolite 3,3'-diindolylmethane in breast cancer cells." *J Nutr* **139**(1): 26-32.
- Dever, D. P. and L. A. Opanashuk (2012). "The Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Contributes to the Proliferation of Human Medulloblastoma Cells." *Mol Pharmacol*.
- Diry, M., C. Tomkiewicz, et al. (2006). "Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism." *Oncogene* **25**(40): 5570-5574.
- Dong, J., R. G. Phelps, et al. (2003). "BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma." *Cancer Res* **63**(14): 3883-3885.
- Elferink, C. J., N. L. Ge, et al. (2001). "Maximal aryl hydrocarbon receptor activity depends on an interaction with the retinoblastoma protein." *Mol Pharmacol* **59**(4): 664-673.
- Elizondo, G., P. Fernandez-Salguero, et al. (2000). "Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast." *Mol.Pharmacol.* **57**(5): 1056-1063.
- Elizondo, G., P. Fernandez-Salguero, et al. (2000). "Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast." *Mol Pharmacol* **57**(5): 1056-1063.
- Ema, M., K. Sogawa, et al. (1992). "cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **184**(1): 246-253.
- Fan, Y., G. P. Boivin, et al. (2010). "The aryl hydrocarbon receptor functions as a tumor suppressor of liver carcinogenesis." *Cancer Res* **70**(1): 212-220.
- Fang, D., T. K. Nguyen, et al. (2005). "A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas." *Cancer Res* **65**(20): 9328-9337.
- Fernandez-Salguero, P., T. Pineau, et al. (1995). "Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor." *Science* **268**(5211): 722-726.
- Fernandez-Salguero, P. M., D. M. Hilbert, et al. (1996). "Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity." *Toxicol Appl Pharmacol* **140**(1): 173-179.
- Fernandez-Salguero, P. M., J. M. Ward, et al. (1997). "Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice." *Vet Pathol* **34**(6): 605-614.

- Frericks, M., M. Meissner, et al. (2007). "Microarray analysis of the AHR system: tissue-specific flexibility in signal and target genes." *Toxicol Appl Pharmacol* **220**(3): 320-332.
- Fujii-Kuriyama, Y. and K. Kawajiri (2010). "Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli." *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **86**(1): 40-53.
- Fukunaga, B. N., M. R. Probst, et al. (1995). "Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor." *J Biol Chem* **270**(49): 29270-29278.
- Gasiewicz, T. A., E. C. Henry, et al. (2008). "Expression and activity of aryl hydrocarbon receptors in development and cancer." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **18**(4): 279-321.
- Gasiewicz, T. A., K. P. Singh, et al. (2010). "The aryl hydrocarbon receptor has an important role in the regulation of hematopoiesis: implications for benzene-induced hematopoietic toxicity." *Chem Biol Interact* **184**(1-2): 246-251.
- Ginestier, C., M. H. Hur, et al. (2007). "ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome." *Cell Stem Cell* **1**(5): 555-567.
- Ginestier, C., J. Wicinski, et al. (2009). "Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation." *Cell Cycle* **8**(20): 3297-3302.
- Gluschnaider, U., G. Hidas, et al. (2010). "beta-TrCP inhibition reduces prostate cancer cell growth via upregulation of the aryl hydrocarbon receptor." *PLoS One* **5**(2): e9060.
- Gomez-Duran, A., E. Ballestar, et al. (2008). "Recruitment of CREB1 and histone deacetylase 2 (HDAC2) to the mouse Ltbp-1 promoter regulates its constitutive expression in a dioxin receptor-dependent manner." *J Mol Biol* **380**(1): 1-16.
- Gomez-Duran, A., J. M. Carvajal-Gonzalez, et al. (2009). "Fitting a xenobiotic receptor into cell homeostasis: how the dioxin receptor interacts with TGFbeta signaling." *Biochem Pharmacol* **77**(4): 700-712.
- Gomez-Duran, A., S. Mulero-Navarro, et al. (2006). "LTBP-1 blockade in dioxin receptor-null mouse embryo fibroblasts decreases TGF-beta activity: Role of extracellular proteases plasmin and elastase." *J Cell Biochem* **97**(2): 380-392.
- Gonzalez, F. J. and P. Fernandez-Salguero (1998). "The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice." *Drug Metab Dispos* **26**(12): 1194-1198.
- Gramatzki, D., G. Pantazis, et al. (2009). "Aryl hydrocarbon receptor inhibition downregulates the TGF-beta/Smad pathway in human glioblastoma cells." *Oncogene* **28**(28): 2593-2605.
- Greenlee, W. F. and A. Poland (1979). "Nuclear uptake of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57BL/6J and DBA/2J mice. Role of the hepatic cytosol receptor protein." *J Biol Chem* **254**(19): 9814-9821.
- Guo, J., M. Sartor, et al. (2004). "Expression of genes in the TGF-beta signaling pathway is significantly deregulated in smooth muscle cells from aorta of aryl hydrocarbon receptor knockout mice." *Toxicol Appl Pharmacol* **194**(1): 79-89.
- Hahn, M. E. (2002). "Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution." *Chem Biol Interact* **141**(1-2): 131-160.
- Hahn, M. E., S. I. Karchner, et al. (1997). "Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13743-13748.
- Hall, J. M., M. A. Barhoover, et al. (2010). "Activation of the aryl-hydrocarbon receptor inhibits invasive and metastatic features of human breast cancer cells and promotes breast cancer cell differentiation." *Mol Endocrinol* **24**(2): 359-369.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hankinson, O. (1995). "The aryl hydrocarbon receptor complex." *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **35**: 307-340.

- Hayashibara, T., Y. Yamada, et al. (2003). "Possible involvement of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult T-cell leukemia (ATL) leukemogenesis: constitutive activation of AhR in ATL." *Biochem Biophys Res Commun* **300**(1): 128-134.
- Hazen, B. P., A. C. Bhatia, et al. (1999). "The clinical diagnosis of early malignant melanoma: expansion of the ABCD criteria to improve diagnostic sensitivity." *Dermatol Online J* **5**(2): 3.
- Hirabayashi, Y. and T. Inoue (2009). "Aryl hydrocarbon receptor biology and xenobiotic responses in hematopoietic progenitor cells." *Biochem Pharmacol* **77**(4): 521-535.
- Hosoya, T., N. Harada, et al. (2008). "Inducibility of cytochrome P450 1A1 and chemical carcinogenesis by benzo[a]pyrene in AhR repressor-deficient mice." *Biochem Biophys Res Commun* **365**(3): 562-567.
- Huang, G. and C. J. Elferink (2005). "Multiple mechanisms are involved in Ah receptor-mediated cell cycle arrest." *Mol Pharmacol* **67**(1): 88-96.
- Ikuta, T., H. Eguchi, et al. (1998). "Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor." *J Biol Chem* **273**(5): 2895-2904.
- Ikuta, T. and K. Kawajiri (2006). "Zinc finger transcription factor Slug is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor." *Exp Cell Res* **312**(18): 3585-3594.
- Ikuta, T. and K. Kawajiri (2006). "Zinc finger transcription factor Slug is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor." *Experimental Cell Research* **312**(18): 3585-3594.
- Ikuta, T., Y. Kobayashi, et al. (2004). "Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor." *J Biol Chem* **279**(18): 19209-19216.
- Ikuta, T., Y. Kobayashi, et al. (2004). "Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **317**(2): 545-550.
- Ikuta, T., T. Namiki, et al. (2009). "AhR protein trafficking and function in the skin." *Biochem Pharmacol* **77**(4): 588-596.
- Ikuta, T., M. Ohba, et al. (2010). "B lymphocyte-induced maturation protein 1 is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor." *J Dermatol Sci* **58**(3): 211-216.
- Ikuta, T., T. Tachibana, et al. (2000). "Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor." *J Biochem (Tokyo)* **127**(3): 503-509.
- Ito, T., S. Tsukumo, et al. (2004). "A constitutively active arylhydrocarbon receptor induces growth inhibition of jurkat T cells through changes in the expression of genes related to apoptosis and cell cycle arrest." *J Biol Chem* **279**(24): 25204-25210.
- Jeffy, B. D., R. B. Chirnomas, et al. (2002). "Epigenetics of breast cancer: polycyclic aromatic hydrocarbons as risk factors." *Environ Mol Mutagen* **39**(2-3): 235-244.
- Jordan, C. T., M. L. Guzman, et al. (2006). "Cancer stem cells." *N Engl J Med* **355**: 1253-1261.
- Kanitakis, J. (2002). "Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin." *Eur J Dermatol* **12**(4): 390-399; quiz 400-391.
- Kawajiri, K., Y. Kobayashi, et al. (2009). "Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice with natural ligands." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(32): 13481-13486.
- Kazlauskas, A., L. Poellinger, et al. (1999). "Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor." *J Biol Chem* **274**(19): 13519-13524.
- Kazlauskas, A., S. Sundstrom, et al. (2001). "The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor." *Mol Cell Biol* **21**(7): 2594-2607.
- Klinge, C. M., J. L. Bowers, et al. (1999). "The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements." *Mol Cell Endocrinol* **157**(1-2): 105-119.
- Koliopanos, A., J. Kleeff, et al. (2002). "Increased arylhydrocarbon receptor expression offers a potential therapeutic target for pancreatic cancer." *Oncogene* **21**(39): 6059-6070.

- Kolluri, S. K., C. Balduf, et al. (2001). "Novel target genes of the Ah (dioxin) receptor: transcriptional induction of N-myristoyltransferase 2." *Cancer Res* **61**(23): 8534-8539.
- Kolluri, S. K., C. Weiss, et al. (1999). "p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells." *Genes Dev* **13**(13): 1742-1753.
- Korzeniewski, N., S. Wheeler, et al. (2010). "A novel role of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in centrosome amplification - implications for chemoprevention." *Mol Cancer* **9**: 153.
- Kudo, K., T. Takeuchi, et al. (2009). "Characterization of the region of the aryl hydrocarbon receptor required for ligand dependency of transactivation using chimeric receptor between *Drosophila* and *Mus musculus*." *Biochim Biophys Acta* **1789**(6-8): 477-486.
- Kumar, M. B., R. W. Tarpey, et al. (1999). "Differential recruitment of coactivator RIP140 by Ah and estrogen receptors. Absence of a role for LXXLL motifs." *J Biol Chem* **274**(32): 22155-22164.
- Kumar, R., S. Angelini, et al. (2003). "Activating BRAF and N-Ras mutations in sporadic primary melanomas: an inverse association with allelic loss on chromosome 9." *Oncogene* **22**(58): 9217-9224.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lahvis, G. P., S. L. Lindell, et al. (2000). "Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(19): 10442-10447.
- Lahvis, G. P., R. W. Pyzalski, et al. (2005). "The aryl hydrocarbon receptor is required for developmental closure of the ductus venosus in the neonatal mouse." *Mol Pharmacol* **67**(3): 714-720.
- Lapidot, T., C. Sirard, et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." *Nature* **367**(6464): 645-648.
- Lee, S. S., T. Pineau, et al. (1995). "Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators." *Mol Cell Biol* **15**(6): 3012-3022.
- Lees, M. J. and M. L. Whitelaw (1999). "Multiple roles of ligand in transforming the dioxin receptor to an active basic helix-loop-helix/PAS transcription factor complex with the nuclear protein Arnt." *Mol Cell Biol* **19**(8): 5811-5822.
- Lund, A. K., M. B. Goens, et al. (2003). "Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1, and mean arterial blood pressure." *Toxicol Appl Pharmacol* **193**(2): 177-187.
- Luo, Y., K. Dallaglio, et al. (2012). "ALDH1A isozymes are markers of human melanoma stem cells and potential therapeutic targets." *Stem Cells* **30**(10): 2100-2113.
- Luo, Y., K. Dallaglio, et al. (2012). "ALDH1A Isozymes are Markers of Human Melanoma Stem Cells and Potential Therapeutic Targets." *STEM CELLS* **30**(10): 2100-2113.
- Ma, Q. and J. P. Whitlock, Jr. (1996). "The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin." *Mol Cell Biol* **16**(5): 2144-2150.
- Ma, Q. and J. P. Whitlock, Jr. (1997). "A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." *J Biol Chem* **272**(14): 8878-8884.
- Maltepe, E., J. V. Schmidt, et al. (1997). "Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT." *Nature* **386**(6623): 403-407.
- Mani, S. A., W. Guo, et al. (2008). "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." *Cell* **133**(4): 704-715.
- Marchitti, S. A., C. Brocker, et al. (2008). "Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**(6): 697-720.

- Marlowe, J. L., E. S. Knudsen, et al. (2004). "The aryl hydrocarbon receptor displaces p300 from E2F-dependent promoters and represses S phase-specific gene expression." *J Biol Chem* **279**(28): 29013-29022.
- Massague, J. (2000). "How cells read TGF-beta signals." *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(3): 169-178.
- Matikainen, T., G. I. Perez, et al. (2001). "Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals." *Nat Genet* **28**(4): 355-360.
- Matsumoto, Y., F. Ide, et al. (2007). "Aryl hydrocarbon receptor plays a significant role in mediating airborne particulate-induced carcinogenesis in mice." *Environ Sci Technol* **41**(10): 3775-3780.
- Meyer, B. K., M. G. Pray-Grant, et al. (1998). "Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity." *Mol Cell Biol* **18**(2): 978-988.
- Mimura, J., M. Ema, et al. (1999). "Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function." *Genes Dev* **13**(1): 20-25.
- Mimura, J., K. Yamashita, et al. (1997). "Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor." *Genes Cells* **2**(10): 645-654.
- Monteiro, P., D. Gilot, et al. (2007). "AhR- and c-maf-dependent induction of beta7-integrin expression in human macrophages in response to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons." *Biochem Biophys Res Commun* **358**(2): 442-448.
- Monzani, E., F. Facchetti, et al. (2007). "Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential." *Eur J Cancer* **43**(5): 935-946.
- Morris, R. J., K. A. Tryson, et al. (2000). "Evidence that the epidermal targets of carcinogen action are found in the interfollicular epidermis of infundibulum as well as in the hair follicles." *Cancer Res* **60**(2): 226-229.
- Mulero-Navarro, S., J. M. Carvajal-Gonzalez, et al. (2006). "The dioxin receptor is silenced by promoter hypermethylation in human acute lymphoblastic leukemia through inhibition of Sp1 binding." *Carcinogenesis* **27**(5): 1099-1104.
- Mulero-Navarro, S., E. Pozo-Guisado, et al. (2005). "Immortalized mouse mammary fibroblasts lacking dioxin receptor have impaired tumorigenicity in a subcutaneous mouse xenograft model." *J Biol Chem* **280**(31): 28731-28741.
- Nebert, D. W., T. P. Dalton, et al. (2004). "Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer." *J Biol Chem* **279**(23): 23847-23850.
- Nebert, D. W., A. L. Roe, et al. (2000). "Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis." *Biochem Pharmacol* **59**(1): 65-85.
- Nie, M., A. L. Blankenship, et al. (2001). "Interactions between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and hypoxia signaling pathways." *Environ Toxicol Pharmacol* **10**(1-2): 17-27.
- Niermann, T., S. Schmutz, et al. (2003). "Aryl hydrocarbon receptor ligands repress T-cadherin expression in vascular smooth muscle cells." *Biochem Biophys Res Commun* **300**(4): 943-949.
- Ogi, T., J. Mimura, et al. (2001). "Expression of human and mouse genes encoding polkappa: testis-specific developmental regulation and AhR-dependent inducible transcription." *Genes Cells* **6**(11): 943-953.
- Ohtake, F., K. Takeyama, et al. (2003). "Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor." *Nature* **423**(6939): 545-550.
- Okey, A. B., G. P. Bondy, et al. (1979). "Regulatory gene product of the Ah locus. Characterization of the cytosolic inducer-receptor complex and evidence for its nuclear translocation." *J Biol Chem* **254**(22): 11636-11648.

- Park, K. T., K. A. Mitchell, et al. (2005). "The aryl hydrocarbon receptor predisposes hepatocytes to Fas-mediated apoptosis." *Mol Pharmacol* **67**(3): 612-622.
- Peng, L., C. N. Mayhew, et al. (2008). "Repression of Ah receptor and induction of transforming growth factor-beta genes in DEN-induced mouse liver tumors." *Toxicology* **246**(2-3): 242-247.
- Peng, T. L., J. Chen, et al. (2009). "Potential therapeutic significance of increased expression of aryl hydrocarbon receptor in human gastric cancer." *World J Gastroenterol* **15**(14): 1719-1729.
- Perdew, G. H. (1988). "Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein." *J Biol Chem* **263**(27): 13802-13805.
- Peters, J. M., M. G. Narotsky, et al. (1999). "Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice." *Toxicol Sci* **47**(1): 86-92.
- Phelan, D., G. M. Winter, et al. (1998). "Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin." *Arch Biochem Biophys* **357**(1): 155-163.
- Pinon, P. and B. Wehrle-Haller (2011). "Integrins: versatile receptors controlling melanocyte adhesion, migration and proliferation." *Pigment Cell Melanoma Res* **24**(2): 282-294.
- Platten, M., W. Wick, et al. (2012). "Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion." *Cancer Res* **72**(21): 5435-5440.
- Pohjanvirta, R. (2012). *The AH receptor in Biology and Toxicology*. New York, John Wiley & Sons.
- Pohjanvirta, R., Ed. (2012). *The AH Receptor in Biology and Toxicology*. New Jersey, USA, John Wiley and Sons Inc.
- Pohjanvirta, R. and J. Tuomisto (1994). "Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models." *Pharmacol Rev* **46**(4): 483-549.
- Poland, A., E. Glover, et al. (1976). "Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase." *J Biol Chem* **251**(16): 4936-4946.
- Poland, A. and J. C. Knutson (1982). "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **22**: 517-554.
- Polyak, K. and W. C. Hahn (2006). "Roots and stems: stem cells in cancer." *Nat Med* **12**(3): 296-300.
- Polyak, K. and R. A. Weinberg (2009). "Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits." *Nat Rev Cancer* **9**(4): 265-273.
- Pollenz, R. S. and C. Buggy (2006). "Ligand-dependent and -independent degradation of the human aryl hydrocarbon receptor (hAHR) in cell culture models." *Chem Biol Interact* **164**(1-2): 49-59.
- Pollock, P. M., U. L. Harper, et al. (2003). "High frequency of BRAF mutations in nevi." *Nat Genet* **33**(1): 19-20.
- Procopio, M., A. Lahm, et al. (2002). "A model for recognition of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by the aryl hydrocarbon receptor." *Eur J Biochem* **269**(1): 13-18.
- Prost-Squarcioni, C. (2006). "[Histology of skin and hair follicle]." *Med Sci (Paris)* **22**(2): 131-137.
- Puga, A., C. Ma, et al. (2009). "The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways." *Biochem Pharmacol* **77**(4): 713-722.
- Puga, A., J. Marlowe, et al. (2002). "Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation." *Toxicology* **181-182**: 171-177.
- Puga, A., C. R. Tomlinson, et al. (2005). "Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways." *Biochemical Pharmacology* **69**(2): 199-207.
- Quintana, F. J., A. S. Basso, et al. (2008). "Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor." *Nature* **453**(7191): 65-71.

- Radisky, D. C. (2005). "Epithelial-mesenchymal transition." *J Cell Sci* **118**: 4325-4326.
- Rappa, G., O. Fodstad, et al. (2008). "The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma." *STEM CELLS* **26**(12): 3008-3017.
- Rey-Barroso, J., G. P. Colo, et al. (2013). "The dioxin receptor controls beta1 integrin activation in fibroblasts through a Cbp-Csk-Src pathway." *Cell Signal* **25**(4): 848-859.
- Reyes, H., S. Reisz-Porszasz, et al. (1992). "Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor." *Science* **256**(5060): 1193-1195.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, et al. (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." *Nature* **445**(7123): 111-115.
- Rico-Leo, E. M., A. Alvarez-Barrientos, et al. (2013). "Dioxin Receptor Expression Inhibits Basal and Transforming Growth Factor beta-induced Epithelial-to-mesenchymal Transition." *J Biol Chem* **288**(11): 7841-7856.
- Richter, C. A., D. E. Tillitt, et al. (2001). "Regulation of subcellular localization of the aryl hydrocarbon receptor (AhR)." *Arch.Biochem.Biophys.* **389**(2): 207-217.
- Roberts, B. J. and M. L. Whitelaw (1999). "Degradation of the basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim homology domain dioxin receptor via the ubiquitin/proteasome pathway." *J Biol Chem* **274**(51): 36351-36356.
- Roman, A. C., D. A. Benitez, et al. (2008). "Genome-wide B1 retrotransposon binds the transcription factors dioxin receptor and Slug and regulates gene expression in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(5): 1632-1637.
- Roman, A. C., J. M. Carvajal-Gonzalez, et al. (2009). "Dioxin receptor deficiency impairs angiogenesis by a mechanism involving VEGF-A depletion in the endothelium and transforming growth factor-beta overexpression in the stroma." *J Biol Chem* **284**(37): 25135-25148.
- Roman, A. C., F. J. Gonzalez-Rico, et al. (2011). "B1-SINE retrotransposons: Establishing genomic insulatory networks." *Mob Genet Elements* **1**(1): 66-70.
- Roman, A. C., F. J. Gonzalez-Rico, et al. (2011). "Dioxin receptor and SLUG transcription factors regulate the insulator activity of B1 SINE retrotransposons via an RNA polymerase switch." *Genome Res* **21**(3): 422-432.
- Rowlands, J. C. and J. A. Gustafsson (1997). "Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction." *Crit Rev Toxicol* **27**(2): 109-134.
- Sadek, C. M. and B. L. Allen-Hoffmann (1994). "Suspension-mediated induction of Hepa 1c1c7 Cyp1a-1 expression is dependent on the Ah receptor signal transduction pathway." *J Biol.Chem.* **269**(50): 31505-31509.
- Safe, S., F. Wang, et al. (1998). "Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms." *Toxicol Lett* **102-103**: 343-347.
- Santiago-Josefat, B. and P. M. Fernandez-Salguero (2003). "Proteasome inhibition induces nuclear translocation of the dioxin receptor through an Sp1 and protein kinase C-dependent pathway." *J Mol Biol* **333**(2): 249-260.
- Santiago-Josefat, B., S. Mulero-Navarro, et al. (2004). "Overexpression of latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein 1 (LTBP-1) in dioxin receptor-null mouse embryo fibroblasts." *J Cell Sci* **117**(Pt 6): 849-859.
- Santiago-Josefat, B., E. Pozo-Guisado, et al. (2001). "Proteasome inhibition induces nuclear translocation and transcriptional activation of the dioxin receptor in mouse embryo primary fibroblasts in the absence of xenobiotics." *Mol Cell Biol* **21**(5): 1700-1709.
- Sauzeau, V., J. M. Carvajal-Gonzalez, et al. (2011). "Transcriptional factor aryl hydrocarbon receptor (Ahr) controls cardiovascular and respiratory functions by regulating the expression of the Vav3 proto-oncogene." *J Biol Chem* **286**(4): 2896-2909.
- Schatton, T., G. F. Murphy, et al. (2008). "Identification of cells initiating human melanomas." *Nature* **451**(7176): 345-349.

- Schmidt, J. V., G. H.-T. Su, et al. (1996). "Characterization of a murine Ahr null allele: Involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6731-6736.
- Seifert, A., H. Taubert, et al. (2009). "TCDD mediates inhibition of p53 and activation of ERalpha signaling in MCF-7 cells at moderate hypoxic conditions." *Int J Oncol* **35**(2): 417-424.
- Shimizu, Y., Y. Nakatsuru, et al. (2000). "Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2): 779-782.
- Silva, I. A., S. Bai, et al. (2008). "Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival." *Cancer Res* **71**(11): 3991-4001.
- Singh, K. P., R. W. Garrett, et al. (2011). "Aryl hydrocarbon receptor-null allele mice have hematopoietic stem/progenitor cells with abnormal characteristics and functions." *Stem Cells Dev* **20**(5): 769-784.
- Singh, S. K., C. Hawkins, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." *Nature* **432**(7015): 396-401.
- Singh, S. S., N. G. Hord, et al. (1996). "Characterization of the activated form of the aryl hydrocarbon receptor in the nucleus of HeLa cells in the absence of exogenous ligand." *Arch Biochem Biophys* **329**(1): 47-55.
- Sladek, N. E. (2003). "Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact." *J Biochem Mol Toxicol* **17**(1): 7-23.
- Song, J., M. Clagett-Dame, et al. (2002). "A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(23): 14694-14699.
- Steg, A. D., K. S. Bevis, et al. (2012). "Stem cell pathways contribute to clinical chemoresistance in ovarian cancer." *Clin Cancer Res* **18**(3): 869-881.
- Straussman, R., T. Morikawa, et al. (2012). "Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion." *Nature* **487**(7408): 500-504.
- Su, J. M., P. Lin, et al. (2009). "Overexpression of cytochrome P450 1B1 in advanced non-small cell lung cancer: a potential therapeutic target." *Anticancer Res* **29**(2): 509-515.
- Swanson, H. I., W. K. Chan, et al. (1995). "DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins." *J Biol Chem* **270**(44): 26292-26302.
- Tan, Z., X. Chang, et al. (2002). "Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function." *Biochem Pharmacol* **64**(5-6): 771-780.
- Thackaberry, E. A., D. M. Gabaldon, et al. (2002). "Aryl hydrocarbon receptor null mice develop cardiac hypertrophy and increased hypoxia-inducible factor-1alpha in the absence of cardiac hypoxia." *Cardiovasc Toxicol* **2**(4): 263-274.
- Tian, W. M., W. Z. Wang, et al. (2002). "[Effect of gufuhuotang on hemorheology and lipid metabolism of hormonal necrosis of femoral head]." *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **27**(10): 769-771.
- Tian, Y., S. Ke, et al. (1999). "Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity." *J Biol Chem* **274**(1): 510-515.
- Tijet, N., P. C. Boutros, et al. (2006). "Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries." *Mol Pharmacol* **69**(1): 140-153.
- Trimmer, C., D. Whitaker-Menezes, et al. (2010). "CAV1 inhibits metastatic potential in melanomas through suppression of the integrin/Src/FAK signaling pathway." *Cancer Res* **70**(19): 7489-7499.
- Trimmer, C., D. Whitaker-Menezes, et al. (2012). "CAV1 inhibits metastatic potential in melanomas through suppression of the integrin/Src/FAK signaling pathway." *Cancer Res* **70**(19): 7489-7499.
- Ucar, D., C. R. Cogle, et al. (2009). "Aldehyde dehydrogenase activity as a functional marker for lung cancer." *Chem Biol Interact* **178**(1-3): 48-55.



- van den Hoogen, C., G. van der Horst, et al. (2010). "High aldehyde dehydrogenase activity identifies tumor-initiating and metastasis-initiating cells in human prostate cancer." *Cancer Res* **70**(12): 5163-5173.
- Veldhoen, M., K. Hirota, et al. (2008). "The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins." *Nature* **453**(7191): 106-109.
- Villano, C. M., K. A. Murphy, et al. (2006). "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces matrix metalloproteinase (MMP) expression and invasion in A2058 melanoma cells." *Toxicol Appl Pharmacol* **210**(3): 212-224.
- Vogel, C. F., W. Li, et al. (2007). "Pathogenesis of aryl hydrocarbon receptor-mediated development of lymphoma is associated with increased cyclooxygenase-2 expression." *Am J Pathol* **171**(5): 1538-1548.
- Vogel, C. F., E. Sciallo, et al. (2004). "Dioxin increases C/EBPbeta transcription by activating cAMP/protein kinase A." *J Biol Chem* **279**(10): 8886-8894.
- Wang, K., X. Chen, et al. (2013). "Increased expression of ALDH1A1 protein is associated with poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma." *Med Oncol* **30**(2): 574.
- Wang, K., Y. Li, et al. (2013). "An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand inhibits proliferation and migration of human ovarian cancer cells." *Cancer Lett* **340**(1): 63-71.
- Weiss, C., S. K. Kolluri, et al. (1996). "Complementation of Ah receptor deficiency in hepatoma cells: negative feedback regulation and cell cycle control by the Ah receptor." *Exp Cell Res* **226**(1): 154-163.
- Whitlock, J. P., Jr. (1999). "Induction of cytochrome P4501A1." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 103-125.
- Wilhelmsson, A., S. Cuthill, et al. (1990). "The specific DNA binding activity of the dioxin receptor is modulated by the 90 kd heat shock protein." *Embo J* **9**(1): 69-76.
- Wilson, S. R., A. D. Joshi, et al. (2013). "The tumor suppressor Kruppel-like factor 6 is a novel aryl hydrocarbon receptor DNA binding partner." *J Pharmacol Exp Ther* **345**(3): 419-429.
- Wincent, E., N. Amini, et al. (2009). "The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans." *J Biol Chem* **284**(5): 2690-2696.
- Wormke, M., M. Stoner, et al. (2000). "Crosstalk between estrogen receptor alpha and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes." *FEBS Lett* **478**(1-2): 109-112.
- Wormke, M., M. Stoner, et al. (2003). "The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes." *Mol Cell Biol* **23**(6): 1843-1855.
- Yang, X., D. Liu, et al. (2005). "The aryl hydrocarbon receptor constitutively represses c-myc transcription in human mammary tumor cells." *Oncogene* **24**(53): 7869-7881.
- Yang, X., S. Solomon, et al. (2008). "Constitutive regulation of CYP1B1 by the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in pre-malignant and malignant mammary tissue." *J Cell Biochem* **104**(2): 402-417.
- Zaher, H., P. M. Fernandez-Salguero, et al. (1998). "The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis." *Mol Pharmacol* **54**(2): 313-321.

-

