

Informe final publicable de proyecto Bioenergética mitocondrial en la senescencia inducida por la terapia en el melanoma: evaluando el impacto sobre el desarrollo tumoral

Código de proyecto ANII: FCE_1_2017_1_136021

05/04/2021

QUIJANO HERRERA, Celia Lía (Responsable Técnico - Científico)

TARALLO CHAIBÚN, Doménica (Investigador)

AGORIO NORSTROM, Caroline Isabel (Investigador)

ESCANDE CASTRO, Carlos Jose (Investigador)

IRIGOÍN COSTA, Florencia (Investigador)

MORENO JAUGE, María (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA (Institución Proponente) \\
INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO \\
PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS. FUNDACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS

Resumen del proyecto

El melanoma es un cáncer de incidencia creciente que en la fase metastásica presenta un mal pronóstico. La quimioterapia, las terapias dirigidas e inmunoterapias son utilizadas para el tratamiento, pero las células presentan resistencia a la apoptosis y evaden el sistema inmune disminuyendo la eficacia de los tratamientos.

Los quimioterápicos, como la temozolomida o su análogo la dacarbazina, pueden conducir al melanoma a la senescencia celular, un estado en el cual la célula deja de dividirse y comienza a secretar factores que afectan su entorno. Nuestros estudios indican que en las células de melanoma senescentes hay un aumento importante en la función, masa y tamaño de las mitocondrias, el organelo donde se sintetiza el ATP, la "moneda" de intercambio de energía de las células. También observamos un aumento en los niveles de las proteínas mitofusinas, que participan en los procesos de fusión de las mitocondrias.

Al interferir con la expresión de las mitofusinas, y disminuir sus niveles en la célula, notamos que disminuía la secreción de factores, incluyendo proteínas que podían afectar a células del sistema inmune y por tanto al desarrollo del tumor. Establecimos tumores en ratones con células de melanoma, con y sin mitofusinas, y sometimos a los animales a quimioterapia con dacarbazina. Observamos que en ausencia de mitofusinas los tumores son más chicos, tanto en ausencia como en presencia de tratamiento. Además constatamos la presencia de un mayor número de macrófagos en los tumores sin mitofusina de animales tratados con quimioterapia.

En suma, nuestros resultados indican que los cambios que ocurren en la mitocondria son necesarios para la secreción de factores por las células de melanoma, senescentes y no senescentes. En particular, las mitofusinas parecen importantes para el desarrollo tumoral y la respuesta a la quimioterapia, y podrían constituir nuevos blancos para el tratamiento del cáncer.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Metabolismo y bioenergética de la célula senescente

Palabras clave: senescencia / mitocondria / melanoma /

Introducción

Melanoma y resistencia a la terapia

El melanoma se origina a partir de la transformación maligna de los melanocitos (1) por mutaciones en el ADN que conducen a la activación de oncogenes o la inactivación de supresores de tumores. El inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 (CDK4/6) p16INK4A (p16) se encuentra afectado en un 80- 90% de los melanomas (2). En la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK: mitogen activated kinase, RAS-RAF-MEK-ERK), se encuentran mutaciones en la GTPasa N-RAS (NRAS) y en la quinasa B-RAF (BRAF) en 15% y 50% de los melanomas respectivamente (3). Por último el supresor tumoral fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN) se encuentra mutado o ausente en un 20 o 40% de melanomas respectivamente (4). En muchos tumores encontramos más de una de estas mutaciones, que cooperan promoviendo la proliferación y supervivencia celular (1).

La tasa de incidencia de esta enfermedad ha ido en aumento durante los últimos 30 años en nuestro país y el mundo (1, 5). El Uruguay presenta tasas de incidencia y mortalidad altas de acuerdo con los estándares de la organización mundial de la salud (6-8). Cuando el melanoma es detectado tempranamente, el tratamiento potencialmente curativo es la cirugía. Sin embargo, en estadios metastásicos y/o no operables las opciones terapéuticas son poco eficaces, siendo la supervivencia media menor a un año y la mortalidad a los 5 años cercana al 90% (5). Hasta el 2011 los tratamientos para el melanoma metastásico se limitaban a la quimioterapia con agentes alquilantes del ADN (9), principalmente dacarbazina y temozolomida (TMZ), y con Interleukina 2 (5). Lamentablemente la respuesta a estas drogas es baja (10-25%) y los análisis clínicos de fase 3 demuestran que no mejoran la supervivencia global de los pacientes en relación a un placebo. De cualquier forma, los agentes alquilantes han sido utilizado como quimioterapéuticos durante muchos años, y son la referencia al evaluar la eficacia de nuevos tratamientos (5).

Actualmente también contamos con las terapias dirigidas con inhibidores de las MAPK. El 48% de los pacientes responden al tratamiento con inhibidores del mutante BRAFV600E (ej. vemurafenib) (10). Sin embargo las células adquieren resistencia luego de un breve periodo (11), en muchos casos por la aparición de una mutación MEK121S activa constitutivamente (1). Esto ha llevado al uso combinado de inhibidores de BRAF y MEK (ej. trametinib) en el tratamiento (5,

12).

Por último encontramos las inmunoterapias, que potencian la eliminación del tumor por el sistema inmune (13). Los anticuerpos que bloquean la interacción del antígeno 4 del linfocito citotóxico T (CTLA-4) con su ligando B7 (14) y los anticuerpos contra la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1, en el linfocito T) y su ligando (PD-L1, en las células presentadoras de antígenos o en el tumor) evitan la inmunosupresión y evasión del tumor (5). Aunque la inmunoterapia aparece como una alternativa muy prometedora para el tratamiento del melanoma metastásico, la respuesta se limita a un porcentaje bajo de pacientes, y puede tener efectos secundarios severos asociados con procesos autoinmunes (5, 15).

La combinación de inmunoterapias (16) y también de quimioterapias, radioterapias o terapias dirigidas con inmunoterapias ha presentado resultados prometedores (17), aunque pueden resultar más tóxicas que las monoterapias (16). El concepto detrás de estas últimas es que las terapias convencionales y dirigidas pueden aumentar la sensibilidad del tumor a la inmunoterapia por medio de distintas estrategias: a) inducir una regresión que disminuye la inmunosupresión inducida por el tumor, b) producir muerte de células tumorales que actúan como una vacuna in situ al ser captadas por células dendríticas, c) inducir la senescencia de las células tumorales que pueden ser eliminadas por células T y macrófagos (17).

Senescencia celular inducida por la terapia en melanoma

La senescencia celular es una de las consecuencias de la terapia del melanoma y un destino alternativo a la muerte por apoptosis o catástrofe mitótica (18, 19). La senescencia se caracteriza por el cese irreversible de la proliferación, debido a la expresión de supresores tumorales (p53) e inhibidores de las CDKs (p16, p21) que conducen a la hipofosforilación de pRB (20). Otros marcadores de senescencia son el aumento de tamaño y actividad β -galactosidasa (SA- β Gal), activación de la respuesta al daño al ADN (DDR), aparición de focos de heterocromatina y adquisición de un fenotipo secretor asociado a la senescencia (20).

La senescencia es una barrera importante para el desarrollo del melanoma y otros tumores y el proceso de transformación neoplásica involucra la evasión de la senescencia (2, 21, 22). De cualquier forma, muchos tumores retienen la capacidad de senescer. La inactivación de oncogenes (23), la restauración de genes supresores de tumores (24), el daño al ADN por dacarbazina, TMZ (23, 25, 26) o radiación (27), así como las terapias dirigidas (28), inducen a la senescencia confirmando la integridad de la vía en estas células.

El rol de la senescencia en el cáncer es controversial ya que los factores de crecimiento, citoquinas y proteasas secretados pueden suprimir o promover el desarrollo tumoral. Componentes del secretoma pueden inducir la senescencia en células vecinas y colaborar con la reparación de tejidos o promover la proliferación, migración e invasividad de las células tumorales (29). El secretoma de la célula tumoral senescente también afecta a células de la respuesta inmune innata y adaptativa, reclutando y activando linfocitos Th-1, macrófagos M1 y células natural killer, conduciendo a la eliminación de las células senescentes y controlando la progresión tumoral (30). En el melanoma la senescencia inducida por la TMZ aumenta la secreción de la quimioquina CCL2, que potencia la supervivencia e invasividad de las células de melanoma no senescentes (23). El vemurafenib también promueve la secreción de factores capaces de estimular el crecimiento y diseminación de las células tumorales resistentes (31); sin embargo no se sabe si este fenómeno está vinculado con la inducción de la senescencia.

Bioenergética, biogénesis y dinámica mitocondria

La capacidad de adaptación de las células tumorales a las demandas energéticas impuestas por el entorno es clave para su supervivencia (32), ya que se encuentran expuestas a cambios continuos en el microambiente y a situaciones de estrés, como la exposición a quimioterápicos y células del sistema inmune.

La mitocondria es responsable de gran parte de la síntesis de ATP en la fosforilación oxidativa, una vía en la que se acopla el transporte de electrones en la cadena respiratoria a la fosforilación del ADP por la ATP sintasa. (33). La función mitocondrial se encuentra regulada por una compleja red de señalización que modula la biogénesis, dinámica y autofagia mitocondrial (34). Entre los principales sensores del estado energético encontramos a la quinasa activada por AMP (AMPK) (35) y las sirtuinas (36). (37). Sus blancos incluyen a los coactivadores transcripcionales de PPAR- γ de la familia PGC-1 que regulan la biogénesis mitocondrial (38).

La dinámica mitocondrial comprende los procesos de fusión, fisión y movimiento que ocurren en la mitocondria en respuesta a la demanda energética celular y otros estímulos (39). La forma de la mitocondria depende del balance entre la fusión y fisión, yendo de estructuras pequeñas y fragmentadas con baja fosforilación oxidativa, hasta tubulares largas y entrelazadas con alta fosforilación oxidativa (40). La GTPasa Drp1, el principal componente de la maquinaria de fisión, es

una proteína citosólica que migra a la membrana mitocondrial externa donde se une a las proteínas transmembrana Fis1, Mff, o MiD49/50, formando estructuras helicoidales que se enrollan alrededor de la mitocondria llevando a su división (39). En el proceso de fusión participan las GTPasas mitofusina 1 y 2 (Mfn1y Mfn2) y atrofia óptica 1 (Opa1).

Metabolismo energético del melanoma y su potencial como blanco farmacológico

Al igual que otras células tumorales las células de melanoma presentan un metabolismo altamente glucolítico, donde la glucosa es fermentada a lactato (41). Sin embargo, hay evidencia que sugiere que la fosforilación oxidativa también cumple un rol relevante en el metabolismo energético del melanoma (42, 43): Varias líneas de melanoma humano poseen niveles elevados del PGC-1alfa (43) y dependen de la fosforilación oxidativa para la obtención de energía (44, 45). Los pacientes con tumores con niveles altos de PGC-1alfa tienen una menor supervivencia global que aquellos con niveles bajos (45, 46). Por otra parte la resistencia de las células con BRAFV600E al tratamiento con inhibidores se asocia a un aumento en la biogénesis mitocondrial y fosforilación oxidativa (42). De hecho la inhibición farmacológica de estas vías sensibiliza a las células del melanoma a los inhibidores de las MAPK, conduciendo a la apoptosis y evitando la resistencia al tratamiento (46, 47).

Los procesos de fusión y fisión mitocondriales también son claves en la resistencia de las células de melanoma a las terapias dirigidas (47). La fosforilación de Drp1 por la quinasa ERK de la vía de las MAPK, ha sido detectada en un alto porcentaje de biopsias de tumores con BRAF mutado. Esta modificación postraduccional promueve la fisión mitocondrial en el melanoma y es necesaria para el crecimiento del tumor (47, 48). Los inhibidores de las MAPK inhiben la fosforilación de Drp y la fisión, llevando a la formación de redes de mitocondrias tubulares en células de melanoma con BRAFV600E (47). Los procesos de fusión y fisión mitocondrial parecen estar involucrados tanto en la resistencia a la apoptosis frente a la terapia como a la proliferación y migración de las células cancerosas (49).

En la senescencia inducida por oncogenes, estudios recientes realizados por nosotros y otros muestran que los fibroblastos senescentes presentan un aumento la actividad de AMPK, β -oxidación de ácidos grasos (50, 51), piruvato deshidrogenasa (52), biogénesis mitocondrial (50) y fosforilación oxidativa (53, 54); y una disminución en la actividad de la enzima málica (55). En conjunto estos estudios indican que las células senescentes dependen del metabolismo mitocondrial para la producción de energía. Además, tanto en la senescencia inducida por el oncogén HRASG12V en fibroblastos, como en la senescencia inducida por exposición a quimioterápicos en el linfoma, el aumento del consumo de oxígeno mitocondrial y la biogénesis mitocondrial se ha asociado al aumento en la síntesis y secreción de factores pro-inflamatorios (51, 53, 56).

Abordaje

En este proyecto trabajamos en torno tres temas generales íntimamente relacionados:

- 1) Estudiamos si los cambios en el metabolismo energético y dinámica mitocondrial son necesarios para la inducción de la senescencia y el fenotipo secretor del melanoma. Para esto caracterizamos las alteraciones en la fosforilación oxidativa, el proteoma y dinámica mitocondrial de la células de melanoma senescentes.
- 2) Evaluamos el rol de la proteínas de dinámica mitocondrial en la fosforilación oxidativa la inducción y mantenimiento de la senescencia y el fenotipo secretor.
- 3) Evaluamos el efecto de la célula senescente y proteínas de dinámica mitocondrial sobre el desarrollo tumoral. En particular sobre el crecimiento del tumor y células del sistema inmune.

Pensamos que los resultados obtenidos aportarían a evaluar el potencial de proteínas de dinámica mitocondrial como blancos farmacológicos para el tratamiento del melanoma. Muy en particular en el marco de terapias capaces de inducir la senescencia de las células de melanoma.

Metodología/diseño del estudio

Detallaremos los modelos, las estrategias y metodologías utilizadas:

Modelos celulares de melanoma: La senescencia inducida por el quimioterápico TMZ se estudió en las líneas de melanoma murino B16-F1 (tumor primario, ATCC CRL-6323) y B16-F10 (tumor metastásico, ATCC CRL-6475) con BRAF salvaje, NRAS

salvaje, p53 salvaje, que presentan una deleción en el locus Ink4a/Arf y no expresan a p16 (57). Los estudios de senescencia inducida por la terapia dirigida se llevaron a cabo en las líneas celulares de melanoma humano SK-Mel-28 y Malme-3M (ATCC HTB-72 y HTB-64, respectivamente) con BRAFV600E (28).

Modelo animal de melanoma: Utilizamos ratones hembra C57BL/6 (6- 8 semanas, Instituto de Higiene) donde se establecieron los tumores realizando una inoculación subcutánea o subdérmica de acuerdo con (58). Se trataron los ratones con tres dosis de dacarbazina 250 mg/kg i.p. Al finalizar el tratamiento sacrificamos los ratones y se obtuvieron los tumores.

#1 Caracterización de las alteraciones en el metabolismo energético y dinámica mitocondrial de las células de melanoma senescentes.

Realizamos los estudios para evaluar la fosforilación oxidativa (vía de síntesis de ATP mitocondrial), la masa, proteoma y dinámica mitocondrial en modelos de senescencia. También intentamos detectar la presencia de alteraciones mitocondriales en células senescentes obtenidas de tumores de ratones tratados con dacarbazina.

Inducción de senescencia por exposición a TMZ y vemurafenib

Las líneas celulares fueron de la fuente acreditada ATCC. Se cultivaron las líneas celulares de melanoma humano (SK-MEL-28) y ratón (B16-F1 y B16-F10) en medio DMEM 10 % de suero fetal bovino, penicilina 50 U/ml (Sigma) y estreptomicina 50 µg/ml (Sigma) en una atmósfera de 5 % de CO₂.

Se estableció la senescencia por exposición a TMZ (Sigma) en la línea celular de melanoma B16-F1 y B16-F10 exponiendo las células dos veces a 200 µM TMZ durante 5 horas con un intervalo de 24 horas. La exposición a vemurafenib (Selleck) se realizó en las células de melanoma SK-MEL-28 de acuerdo con (28).

Verificamos la inducción de la senescencia evaluando varios marcadores (59): proliferación, actividad de la SA-beta-Gal, niveles y fosforilación de p53 y niveles de inhibidores de CDKs (p16, p21), fosforilación de pRB, activación de DDR como se describe en (60).

Se evaluó el fenotipo secretor midiendo la transcripción de genes por RT-PCR en tiempo real, con primers específicos para varias citoquinas, usando el kit Syber Green (Quiagen) empleando β -actina como gen reportero. La secreción de las citoquinas IL-6 se evaluó en el medio de cultivo por ELISA utilizando DuoSet ELISA kits (R&D Systems). Se normalizó con la concentración de proteínas del lisado medida con ácido bicinónico.

Fosforilación oxidativa mitocondrial

Medimos la velocidad de consumo de oxígeno en el Seahorse Extracellular Flux Analyzer XFe24, antes y después del agregado de oligomicina (inhibidor de ATP sintasa), carbonil cianuro-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP, un desacoplante) y antimicina A (inhibidor del complejo III de la cadena respiratoria) (61).

Dinámica y masa mitocondrial

Constatamos la existencia de cambios en la masa y morfología mitocondrial en los distintos modelos utilizando MitoTracker Green FM y analizamos las imágenes con el NIH ImageJ software (acceso público) (62). Evaluaremos los niveles de proteínas involucradas en los procesos de fusión y fisión mitocondrial por WB con anticuerpos anti-: Fis1, Drp1, Mff, Mfn1, Mfn2, Opa1 (Abcam).

Proteoma mitocondrial

Se realizó un fraccionamiento subcelular, se obtuvo la fracción enriquecida en mitocondrias y se llevó a cabo el análisis de la composición proteica por espectrometría de masa. Estudios realizados en colaboración con la Dra. Durán (Institut Pasteur de Montevideo).

Estudio de las mitocondrias en tumores de ratones tratados con dacarbazina

Se generó una línea que expresa establemente una proteína fluorescente verde dirigida a la mitocondria (B16-F1-Mito-GFP). Se inocularon los ratones con estas células y se expusieron a dacarbazina como se indica arriba. Se verificó la senescencia celular midiendo actividad SA-beta-Gal y expresión de p21 por RT-PCR en tiempo real y se evaluó la masa mitocondrial por citometría.

#2 Evaluación del rol de proteínas de dinámica mitocondria en la fosforilación oxidativa mitocondrial, la inducción de la senescencia y el fenotipo secretor.

Inicialmente planteamos evaluar a la proteína Fis1, sin embargo estudios realizados en el periodo posterior a la presentación del proyecto y antes del comienzo del mismo mostraron que las proteínas mitofusinas eran las responsables del aumento en el tamaño de las mitocondrias (y no Fis1). Para evaluar el rol de estas proteínas generaremos líneas celulares B16-F1 en las cuales la Mfn1 o Mfn2 se encontraban silenciadas y las expusimos a TMZ. En estas células se midió el tamaño y forma de las mitocondrias, la fosforilación oxidativa, la inducción de la senescencia y la expresión y secreción del IL-6 como se indica arriba. También Se evaluó la composición del secretoma por técnicas de espectrometría de masa, este abordaje permitió un conocimiento profundo del fenotipo secretor en las distintas condiciones.

Generación de células B16-F1 con Mfn1 o Mfn2 silenciadas:

Se silenció la expresión de Mfn1 o Mfn2 utilizando lentivirus portadores de plásmidos con shARN (Dharmacon). La preparación de partículas lentivirales y la infección y selección de las células con puromicina se realizaron de acuerdo con lo descrito en (63) y (51). Se verificó que la expresión de la proteína no afectara la inducción de la senescencia ni la función mitocondrial.

Estudio del secretoma por espectrometría de masa

Se obtuvo medio condicionado de células de melanoma en ausencia de suero. Se centrifugó a 12000g durante 45 min para eliminar restos celulares y se precipitaron las proteínas de acuerdo con (64). Los estudios fueron realizados en colaboración con la Dra. Durán (Institut Pasteur de Montevideo).

3) Evaluación el efecto de la célula senescente y las proteínas de dinámica mitocondrial sobre el desarrollo tumoral y el sistema inmune.

Generación y evaluación de crecimiento de tumores portadores de células con Mfn1 silenciada:

Generamos tumores de melanoma en ratones, utilizando células donde se silenció la expresión de Mfn1. Los ratones fueron tratados con vehículo o dacarbazina y se evaluó el crecimiento de los tumores, la infiltración de células del sistema inmune y la supervivencia de los animales.

Análisis de la infiltración de células del sistema inmune en tumores portadores de células senescentes.

Se sacrificaron los animales y se obtuvieron los tumores, que se homogeneizaron mecánicamente. Se evaluó la infiltración de neutrófilos, macrófagos, células supresoras de origen mielóide (MDSC), células dendríticas, células NK, linfocitos T CD4+ y CD8+, linfocitos B por citometría de flujo multiparamétrica. Para ello se utilizó un amplio panel de anticuerpos marcados con diferentes fluoróforos (65).

Resultados, análisis y discusión

1) Muchos de los resultados obtenidos fueron publicados en un manuscrito y dieron lugar a una revisión por invitación (ver adjuntos):

Martínez J, Tarallo D, Martínez-Palma L, Victoria S, Bresque M, Rodríguez-Bottero S, Marmisolle I, Escande C, Cassina P, Casanova G, Bollati-Fogolín M, Agorio C, Moreno M, Quijano C. Mitofusins modulate the increase in mitochondrial length, bioenergetics and secretory phenotype in therapy-induced senescent melanoma cells. *Biochem J.* (2019) 476:2463-2486. doi: 10.1042/BCJ20190405.

Martínez J, Marmisolle I, Tarallo D, Quijano C. Mitochondrial Bioenergetics and Dynamics in Secretion Processes. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2020) 11:319. doi: 10.3389/fendo.2020.00319.

Los principales resultados que se presentan en el trabajo de Martínez et al (2019) son siguientes:

- El quimioterapéutico temozolomida (TMZ) induce la senescencia en las células de melanoma.

- Las células de melanoma senescentes presentan un aumento en la función mitocondrial.
- Las células de melanoma senescentes presentan un aumento en la masa, biogénesis y fusión de las mitocondrias.
- En las células de melanoma senescentes hay un aumento en la fusión mitocondrial, mediado por las Mfn1 y Mfn2.
- El silenciamiento de la expresión de Mfn2 disminuye el tamaño y respiración mitocondrial y afecta la secreción de IL-6 en las células senescentes.
- El silenciamiento de la expresión de Mfn1 disminuye el tamaño mitocondrial y afecta la secreción de IL-6 en las células senescentes.

2) Otros resultados obtenidos en este trabajo, que no han sido publicados aún son los siguientes:

- El vemurafenib no induce la senescencia en las células de melanoma y disminuye la función mitocondrial.
- Los estudios de proteómica mitocondrial de las células senescentes confirman el aumento en la biogénesis mitocondrial y la fusión mitocondrial. Además muestran un aumento en la vía de oxidación de ácidos grasos y amino ácidos. También se observa un aumento de algunas proteínas necesarias para la síntesis de ADNmt. Estos resultados están siendo validados actualmente.
- Los tumores de ratones tratados con dacarbazina presentan células senescentes con un aumento en la masa mitocondrial.
- El silenciamiento de Mfn1 afecta el desarrollo tumoral y el reclutamiento de células del sistema inmune al tumor. En particular se observa un aumento en el número de macrófagos frente al tratamiento con dacarbazina.
- Los estudios de proteómica del secretoma de las células senescentes indican que el silenciamiento de la Mfn1 afecta la secreción de factores por las células senescentes, tanto en ausencia como en presencia de tratamiento con TMZ. Algunos de estos resultados serán validados por medio de aproximaciones experimentales complementarias.

Conclusiones y recomendaciones

Nuestro trabajo, junto con el de otros autores presentes en la literatura, indica que las células senescentes experimentan cambios muy importantes en el metabolismo energético, la biogénesis y la dinámica mitocondrial (51, 52, 56, 66). Nuestro grupo, en particular, ha constatado que la inhibición de la carnitina palmitoil transferasa I, una enzima relevante para la oxidación de ácidos grasos mitocondrial, disminuye la secreción de múltiples citoquinas en la senescencia inducida por el oncogén Ras (51). Además, hemos observado en el marco de este proyecto, que el silenciamiento de la expresión de la Mfn1 o la Mfn2 disminuye fuertemente la secreción de la IL-6, en células de melanoma donde la senescencia fue inducida por el quimioterápico temozolomida (TMZ)(66). En ambos modelos de senescencia celular al inhibir una proteína mitocondrial se observó un impacto en la secreción, sin afectar la falta de proliferación o la viabilidad celular (51, 66). Estos estudios muestran que es posible desvincular las funciones "positivas" de la senescencia, como la inhibición de la proliferación de células con el ADN dañado, de la secreción de citoquinas, considerada dañina para el entorno celular y el organismo en muchos casos (20, 67-69). Al mismo tiempo, apoyan que la mitocondria cumple un rol en la secreción de factores proteicos por las células senescentes (70).

Para profundizar en estas observaciones se analizó la composición del secretoma de las células por medio de técnicas de espectrometría de masa. Estos estudios de proteómica, mostraron que el silenciamiento de la Mfn1 afecta fuertemente la secreción de proteínas por las células senescentes y no senescentes. Evaluamos si estos eventos podrían tener un impacto in vivo, utilizando un modelo de melanoma de ratón donde se trató a los animales con dacarbazina, un quimioterápico análogo a la temozolomida. Se generaron tumores con células donde la expresión de la Mfn1 se encontraba silenciada y se sometió a los ratones a tratamiento. La ausencia de las Mfn1 resultó en la generación de tumores más pequeños en ratones tratados tanto con vehículo como con dacarbazina y en un menor reclutamiento de macrófagos al tumor.

En conjunto, estas observaciones sugieren que la síntesis de ATP por la mitocondria es relevante para la secreción. Por esto, defectos en la fosforilación oxidativa o la dinámica mitocondrial pueden modificar la composición del secretoma y su

impacto en el entorno celular. Sin embargo, poco se sabe sobre las bases moleculares detrás de estos eventos. Es importante identificar los procesos y moléculas que vinculan a la mitocondria con la maquinaria de secreción, estudiando en particular el rol de las mitofusinas en la secreción de factores por las células senescentes.

Por otra parte, también es importante seguir caracterizando el secretoma de las células senescentes, y el impacto de estas moléculas sobre el sistema inmune en el marco del desarrollo tumoral y la respuesta al tratamiento

Referencias bibliográficas

1. D. Schadendorf et al., Melanoma. *Nature Reviews Disease Primers* 1, 1 (2015).
2. K. E. Sheppard, G. A. McArthur, The cell-cycle regulator CDK4: an emerging therapeutic target in melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 5320 (Oct 1, 2013).
3. A. J. Miller, M. C. Mihm, Jr., Melanoma. *The New England journal of medicine* 355, 51 (Jul 6, 2006).
4. H. Tsao, L. Chin, L. A. Garraway, D. E. Fisher, Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev* 26, 1131 (Jun 1, 2012).
5. D. J. Shah, R. S. Dronca, Latest advances in chemotherapeutic, targeted, and immune approaches in the treatment of metastatic melanoma. *Mayo Clinic proceedings* 89, 504 (Apr, 2014).
6. "Tendencias de la mortalidad por Cancer en el Uruguay 1990-2012" (Comisión honoraria de lucha contra el cancer, Uruguay).
7. E. Barrios, C. Musetti, etal, "V Atlas de mortalidad por cancer en el Uruguay- Periodo 2009-2013. Registro Nacional de Cancer, Comisión Honoraria de Lucha contra el Cancer" (2014).
8. J. Ferlay et al. (2013).
9. F. Marchesi et al., Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacological research* 56, 275 (Oct, 2007).
10. K. T. Flaherty et al., Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 363, 809 (Aug 26, 2010).
11. R. Nazarian et al., Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468, 973 (Dec 16, 2010).
12. K. T. Flaherty et al., Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *The New England journal of medicine* 367, 1694 (Nov, 2012).
13. D. S. Chen, I. Mellman, Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 39, 1 (Jul 25, 2013).
14. M. Mansh, Ipilimumab and cancer immunotherapy: a new hope for advanced stage melanoma. *The Yale journal of biology and medicine* 84, 381 (Dec, 2011).
15. F. S. Hodi et al., Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 363, 711 (Aug 19, 2010).
16. J. Larkin, F. S. Hodi, J. D. Wolchok, Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England journal of medicine* 373, 1270 (Sep 24, 2015).
17. M. Vanneman, G. Dranoff, Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nature reviews. Cancer* 12, 237 (Apr, 2012).
18. J. C. Acosta, J. Gil, Senescence: a new weapon for cancer therapy. *Trends in cell biology* 22, 211 (Apr, 2012).
19. S. Giuliano, M. Ohanna, R. Ballotti, C. Bertolotto, Advances in melanoma senescence and potential clinical application. *Pigment cell & melanoma research* 24, 295 (Apr, 2011).
20. D. Munoz-Espin, M. Serrano, Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 482 (Jul, 2014).
21. V. K. Goel et al., Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene* 28, 2289 (Jun 11, 2009).
22. C. Michaloglou et al., BRAFV600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720 (Aug 4, 2005).
23. M. Ohanna et al., Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome (PNAS). *Genes & development* 25, 1245 (2011).
24. S. Haferkamp, T. M. Becker, L. L. Scurr, R. F. Kefford, H. Rizos, p16INK4a-induced senescence is disabled by melanoma-associated mutations. *Aging cell* 7, 733 (Oct, 2008).
25. N. Mhaidat et al., Temozolomide induces senescence but not apoptosis in human melanoma cells. *British journal of cancer* 97, 1225 (2007).
26. D. C. Lev et al., Dacarbazine Causes Transcriptional Up-Regulation of Interleukin 8 and Vascular Endothelial Growth Factor in Melanoma Cells: A Possible Escape Mechanism from Chemotherapy. *Molecular cancer therapeutics* 2, 753 (2003).
27. U. Schick et al., Trametinib radiosensitises RAS-and BRAF-mutated melanoma by perturbing cell cycle and inducing senescence. *Radiotherapy and Oncology*, (2015).
28. S. Haferkamp et al., Vemurafenib induces senescence features in melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology*

- 133, 1601 (2013).
29. P. Lecot, F. Alimirah, P. Y. Desprez, J. Campisi, C. Wiley, Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development. *Br J Cancer* 114, 1180 (May 24, 2016).
 30. D. Di Mitri, A. Alimonti, Non-Cell-Autonomous Regulation of Cellular Senescence in Cancer. *Trends in cell biology* 26, 215 (Mar, 2016).
 31. A. C. Obenauf et al., Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature*, (2015).
 32. D. Hanahan, R. A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646 (Mar 4, 2011).
 33. D. L. Nelson, M. M. Cox, in *Lehninger Principles of Biochemistry*. (W. H. Freeman and Company, New York, NY, United States of America, 2013).
 34. J. Nunnari, A. Suomalainen, Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148, 1145 (Mar 16, 2012).
 35. R. Lage, C. Dieguez, A. Vidal-Puig, M. Lopez, AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med* 14, 539 (Dec, 2008).
 36. E. Verdin, M. D. Hirschey, L. W. Finley, M. C. Haigis, Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. *Trends in biochemical sciences* 35, 669 (Dec, 2010).
 37. C. Quijano, M. Trujillo, L. Castro, A. Trostchansky, Interplay between oxidant species and energy metabolism. *Redox biology* 8, 28 (Nov 30, 2015).
 38. B. N. Finck, D. P. Kelly, PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *The Journal of clinical investigation* 116, 615 (Mar, 2006).
 39. M. Roy, P. H. Reddy, M. Iijima, H. Sesaki, Mitochondrial division and fusion in metabolism. *Current opinion in cell biology* 33, 111 (Apr, 2015).
 40. P. Mishra, D. C. Chan, Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *The Journal of cell biology* 212, 379 (Feb 15, 2016).
 41. D. A. Scott et al., Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect. *The Journal of biological chemistry* 286, 42626 (Dec 9, 2011).
 42. R. Haq et al., Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1alpha and MITF. *Cancer Cell* 23, 302 (Mar 18, 2013).
 43. F. Vazquez et al., PGC1alpha expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell* 23, 287 (Mar 18, 2013).
 44. P. Puigserver, B. M. Spiegelman, Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24, 78 (Feb, 2003).
 45. F. Vazquez et al., PGC1? expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer cell* 23, 287 (2013).
 46. G. Zhang et al., Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors. *The Journal of clinical investigation* 126, 1834 (May 2, 2016).
 47. M. N. Serasinghe et al., Mitochondrial division is requisite to RAS-induced transformation and targeted by oncogenic MAPK pathway inhibitors. *Mol Cell* 57, 521 (Feb 5, 2015).
 48. J. A. Kashatus et al., Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. *Mol Cell* 57, 537 (Feb 5, 2015).
 49. D. Senft, Z. A. Ronai, Regulators of mitochondrial dynamics in cancer. *Current opinion in cell biology* 39, 43 (Apr, 2016).
 50. O. Moiseeva, V. Bourdeau, A. Roux, X. Deschenes-Simard, G. Ferbeyre, Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Molecular and cellular biology* 29, 4495 (Aug, 2009).
 51. C. Quijano et al., Oncogene-induced senescence results in marked metabolic and bioenergetic alterations. *Cell Cycle* 11, 1383 (Apr 1, 2012).
 52. J. Kaplon et al., A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature* 498, 109 (Jun 6, 2013).
 53. C. Correia-Melo et al., Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *EMBO J* 35, 724 (Apr 1, 2016).
 54. S. Takebayashi et al., Retinoblastoma protein promotes oxidative phosphorylation through upregulation of glycolytic genes in oncogene-induced senescent cells. *Aging cell* 14, 689 (Aug, 2015).
 55. P. Jiang, W. Du, A. Mancuso, K. E. Wellen, X. Yang, Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. *Nature* 493, 689 (Jan 31, 2013).
 56. J. R. Dorr et al., Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* 501, 421 (Sep 19, 2013).
 57. V. O. Melnikova, S. V. Bolshakov, C. Walker, H. N. Ananthaswamy, Genomic alterations in spontaneous and carcinogen-induced murine melanoma cell lines. *Oncogene* 23, 2347 (Mar 25, 2004).

58. C. Agorio et al., Live attenuated Salmonella as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma. *The journal of gene medicine* 9, 416 (2007).
59. J. Campisi, Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* 75, 685 (2013).
60. I. Marmisolle et al., Reciprocal regulation of acetyl-CoA carboxylase 1 and senescence in human fibroblasts involves oxidant mediated p38 MAPK activation. *Archives of biochemistry and biophysics* 613, 12 (2016).
61. C. Quijano, L. Castro, G. Peluffo, V. Valez, R. Radi, Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H3404 (Dec, 2007).
62. R. K. Dagda et al., Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *The Journal of biological chemistry* 284, 13843 (May 15, 2009).
63. http://www.broadinstitute.org/genome_bio/trc/publicProtocols.html.
64. A. Bensadoun, D. Weinstein, Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical biochemistry* 70, 241 (Jan, 1976).
65. S. Grille et al., Salmonella enterica serovar Typhimurium immunotherapy for B-cell lymphoma induces broad anti-tumour immunity with therapeutic effect. *Immunology* 143, 428 (Nov, 2014).
66. J. Martinez et al., Mitofusins modulate the increase in mitochondrial length, bioenergetics and secretory phenotype in therapy-induced senescent melanoma cells. *The Biochemical journal* 476, 2463 (Sep 10, 2019).
67. J. P. Coppe et al., Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 6, 2853 (Dec 2, 2008).
68. T. Kuilman, D. S. Peeper, Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature reviews. Cancer* 9, 81 (Feb, 2009).
69. F. Rodier et al., Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 11, 973 (Aug, 2009).
70. J. Martinez, I. Marmisolle, D. Tarallo, C. Quijano, Mitochondrial Bioenergetics and Dynamics in Secretion Processes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11, 319 (2020).

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional. (CC BY-NC-SA)