

ACADEMIA DE CIENCIAS DE LA REGIÓN DE MURCIA

ATAQUE A LA MAQUINARIA EPIGENÉTICA DEL CÁNCER

Discurso de ingreso leído por el Académico electo

Ilmo. Sr. D. José Neptuno Rodríguez López

en el acto de la Sesión Solemne de su Toma de Posesión como
Académico de Número, celebrado el día 22 de noviembre de 2023

Y discurso de contestación del Académico de Número

Ilmo. Sr. D. Alberto Tárraga Tomás



Academia
asociada al
Instituto de
España





ACADEMIA DE CIENCIAS DE LA REGIÓN DE MURCIA

Ataque a la maquinaria epigenética del cáncer

Discurso de ingreso leído por el Académico electo

Ilmo. Sr. D. José Neptuno Rodríguez López

en el acto de la Sesión Solemne de su Toma de Posesión como Académico de Número, celebrado el día 22 de noviembre de 2023

Y discurso de contestación del Académico de Número

Ilmo. Sr. D. Alberto Tárraga Tomás

Murcia 2023





Este discurso se ha impreso con financiación y colaboración de la Dirección General de Universidades e Investigación, dependiente de la Consejería de Medioambiente, Universidades, Investigación y Mar Menor de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.

Todos los derechos reservados.

Queda prohibida, salvo excepción prevista en la Ley, cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública y transformación de esta obra sin contar con autorización de los titulares de la propiedad intelectual. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual (arts. 270 y ss. del Código Penal).

© Academia de Ciencias de la Región de Murcia, 2023

© José Neptuno Rodríguez López

ISBN: 978-84-09-55776-9

Depósito Legal: MU 1148-2023

Impresión: Compobell S.L., Murcia

Excmo. Sr. Presidente de la Academia

Ilmos. Sras. y Sres. Académicos

Excmas. e Ilmas. autoridades

Queridos familiares, compañeros y amigos

Señoras y señores

En primer lugar, quisiera expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a los miembros de esta Academia por acogerme como nuevo Académico de Número. La vocación de las Ciencias es comprender al ser humano y el mundo que lo rodea. Sin embargo, como decía Carl Sagan (eminente científico y divulgador estadounidense) *"Vivimos en una sociedad profundamente dependiente de la ciencia y la tecnología, y en la que casi nadie sabe nada de ellas. Esto constituye una fórmula segura para el desastre"*. En este contexto, las Academias de Ciencias en general y la de la Región de Murcia en particular, juegan un importante papel en nuestra sociedad. Entre las misiones de las Academias de Ciencias podemos enumerar: (1) Promover la vida científica; (2) Promover la enseñanza de las Ciencias; (3) Fomentar la divulgación científica; (4) Favorecer la colaboración entre las entidades públicas de investigación y el tejido empresarial y (5) Asumir una labor de asesoría y consultoría a solicitud de los poderes públicos o por propia iniciativa. Así pues, quiero expresar públicamente que quedo a disposición de esta Academia para colaborar en estas tareas y en cualquier otra que se me encomiende.

En cualquier Tribunal de Tesis o de Oposición que he compartido con el Profesor Ramón Varón Castellanos (mi maestro, compañero y amigo y al que todavía seguimos añorando) siempre le gustaba dejar constancia de la importancia de ser agradecido y no nos privaba nunca de la célebre frase “*Es de bien nacido ser agradecido*”. Por lo tanto, me gustaría empezar aquí un largo capítulo de agradecimientos sinceros.

Mi gratitud a los doctores y académicos D. Ángel Ferrández Izquierdo, D. Cecilio Vidal Moreno y D. Alberto Tárraga Tomás, quienes, conociendo mi trabajo y mi curriculum académico y profesional, promovieron y avalaron mi candidatura de ingreso en la Academia. Con el Profesor Cecilio Vidal me unen largos años compartiendo pasillo, experiencias y vivencias, que no hicieron más que afianzar mi admiración por su persona. Cecilio es para sus alumnos (entre los que siempre me ha gustado “infiltrarme” por todo lo que he aprendido de él) sinónimo de excelencia científica y paradigma de la labor docente. Llegado el momento, también me gustaría tener su integridad, honestidad y rebeldía para luchar contra la injusticia (él y algunos de los presentes en esta sala saben de lo que hablo). Para acabar este primer apartado ¿qué decir de mi paisano, maestro y amigo, el Profesor Alberto Tárraga? Gracias a él (o igual debería decir gracias a nuestras madres) a mi llegada a Murcia residí en el Colegio Mayor Universitario Ruiz de Alda donde, quizás sazonado por el entusiasmo que da la juventud, pasé una de las etapas más felices de mi vida. Alberto no sólo ha sido mi profesor particular de Química Orgánica y mi colaborador y asesor científico en el diseño y síntesis de nuevas moléculas (de las que les hablaré más tarde), sino que ahora, también me honra con la contestación a este discurso de ingreso en la Academia de Ciencias de la Región de Murcia. Una vez leí una dedicatoria que prometí utilizarla llegado un momento único y especial. Alberto, ese momento ha llegado, “*Es cierto que la suerte son personas*”.

No suele ser una de las materias favoritas de los alumnos de Bioquímica, pero es imposible no aprender Enzimología si tienes como maestros a expertos tan excepcionales como Francisco García Cánovas, José Tudela y Ramón Varón (mis directores de Tesis). El Profesor Francisco García Cánovas (Paco, mi jefe, mi maestro) merece una mención especial. Él, no sólo me acogió en su grupo de investigación, sino que fue capaz de transmitirme todo su entusiasmo por la ciencia. Siempre he contado con su apoyo incondicional y aun me viene a la memoria aquellos magníficos años que pasamos desguazando a la enzima tirosinasa. La constante k_1 para la unión del monofenol, la k_2 para la unión del difenol o la k_8 para la unión del oxígeno.... Permítanme la expresión, pero “fue una verdadera gozada” aprender cinética enzimática con el número 1.

De mis estancias en el Reino Unido, en la Universidad de Sussex en Brighton y en el John Innes Centre en Norwich me quedo con casi todo. Allí forjé grandes amistades, entre ellas la del Profesor Roger Thorneley. Su forma de ver la investigación, el laboratorio, las colaboraciones internacionales y otros aspectos de la vida en general me sirvieron de enseñanza vital para desarrollar mi carrera científica.

Siempre me he sentido orgulloso de haber creado una nueva línea de investigación contra el cáncer en nuestro laboratorio (de la que les hablaré a continuación); pero también soy consciente de que esta línea nunca hubiera visto la luz de no haberme rodeado de excelentes profesionales. No sólo por orden cronológico, sino también por su aportación fundamental, aquí tengo que nombrar al Dr. Juan Cabezas Herrera. Desde el principio y hasta estos días he tenido el privilegio de contar con su entusiasmo y maestría. Juntos generamos esta línea de investigación y siempre le he considerado más un amigo que un colaborador. ¡Sé que el sentimiento es mutuo! Y por supuesto, mi más sincero agradecimiento y reconocimiento a

todos los becarios, doctorandos y postdocs que han trabajado y trabajan en nuestro equipo. Gracias a aquellos que han fomentado la unión de nuestro equipo de investigación y que nos han permitido obtener más y mejores resultados, haciéndonos sentir como una verdadera familia. No puedo dejar de nombrar entre otros a Luis, Fernanda, Sole, Magali, Mapi, o a Román, el último en llegar, pero no por ello el menos importante. Gracias también a todos mis compañeros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, con los que comparto amistad y buen compañerismo. Mención especial merece el Profesor Juan Carmelo Gómez, académico de número de esta Academia, de la que también fue Presidente, y que nos dejó no hace mucho tiempo. Con él compartí, además de departamento, también buenos momentos alrededor de una buena copa de vino. ¡Te echamos de menos!

No quisiera pasar la oportunidad de expresar mi gratitud a los Servicios de Investigación de nuestra universidad (por mucho que se empeñen en cambiarles el nombre para mí siempre serán el SACE). Ellos son “la joya de la corona” de nuestra institución y el orgullo de todos los investigadores. Aunque estos servicios tienen todo lo que tienen que tener, buena instrumentación (afortunadamente cada vez mejor) y una amplia disponibilidad de técnicas, sin duda, lo que los hace excepcionales es la calidad profesional y humana de las personas que los componen. Por lo tanto, muchas gracias a María Teresa Castells, Maruja, María Dolores y Régulo, Carmen Lagares, Toñi, Juana y Pepe, César y Álex, y también a mi tocayo Pepe Rodríguez por hacernos la investigación, y sobre todo la vida, mucho más sencilla. Gracias a todos y a los que no nombro no es por olvido, sino por falta de tiempo.

Capítulo especial, dentro de estos agradecimientos, merece mi familia: mis padres (Belén y Neptuno), mis hermanos (Emeterio y Pilar), mi hijo (Neptuno Jr., del que me siento muy orgulloso, aunque no se diga las veces

necesarias), mis tíos, mis cuñados y sobrinos y mis abuelos (con especial recuerdo a mi abuelo José, ferroviario de profesión y cocinero de vocación y que me transmitió su pasión por los trenes y la cocina). Siempre me ha gustado creer que he heredado algo del “gen emprendedor” de las mujeres de mi familia; por ejemplo, mi abuela Lute fue la mayor y mejor bordadora de ajuares de la comarca de Almansa en la post-guerra y mi madre una magistral modista que, con el apoyo de mi padre y hermanos, consiguió levantar un negocio que nos permitió vivir sin necesidades e incluso les permitió mandar al pequeño de sus hijos (el aquí presente) a estudiar a Murcia. Aunque algunos de ellos ya no estén presentes, sé que se hubieran sentido muy orgullosos de haber estado escuchando este discurso. No es para menos, ya que sin su cariño y apoyo no estaría aquí en este momento. Finalmente, quisiera resaltar el afecto y estímulo que a lo largo de estos años he recibido de mis amigos. Va para vosotros mi gratitud y reconocimiento. Teneros aquí hoy, junto con mi familia, me enorgullece y estimula.

A continuación, les hablaré sobre nuestra línea de investigación contra el cáncer. Esta línea, que nació hace ya casi 20 años (¡cuánta razón tenía Gardell!), nos ha permitido avanzar en tres aspectos relevantes de la oncología molecular y clínica.

(1) Epigenética del cáncer: Conocer los procesos epigenéticos que controlan la fisiopatología del cáncer. Esta línea se centra en conocer la metilación de histonas y factores de transcripción que intervienen en el desarrollo del cáncer con el fin de diseñar fármacos y combinaciones antimetilantes para controlar su proliferación y metástasis.

(2) Entender los mecanismos de resistencia a fármacos y otras terapias antitumorales: Conocer estos mecanismos puede conducir a estrategias más efectivas para el tratamiento del cáncer. Descubrir cómo afecta la

metilación de proteínas a la resistencia a la radio o inmunoterapia es un objetivo importante de nuestra línea de investigación.

(3) Diseñar y sintetizar nuevos agentes antitumorales: En colaboración con el Prof. Alberto Tárraga (Universidad de Murcia), nuestro grupo trabaja en la síntesis de nuevos antifolatos como fármacos antitumorales.

Créanme si les digo que el desarrollo de esta línea de investigación no hubiese sido posible sin la financiación recibida por instituciones tanto públicas como privadas. Por ello, me van a permitir que cierre este capítulo de agradecimientos expresando mi profunda gratitud a la Fundación Séneca, al Ministerio de Ciencia e Innovación, a la Unión Europea, a la Fundación de la Asociación Española contra el Cáncer (FAECC) y a las empresas IDP Pharma y PDL.

***ATAQUE A LA MAQUINARIA EPIGENÉTICA DEL
CÁNCER***

Introducción

El cáncer o el triunfo de unas células egoístas

Nuestra sociedad vive en una lucha continua contra el cáncer (Yu *et al.*, 2023). A pesar de los nuevos retos sanitarios que, desafortunadamente, han surgido a raíz de la aparición del COVID-19, no debemos olvidar que cada año mueren unos 10 millones de personas a causa del cáncer y que se trata de la segunda causa de muerte en el mundo, solamente superado por las enfermedades cardiovasculares (Siegel *et al.*, 2023).

Pero ¿qué es, en realidad, el cáncer?

El origen de la palabra cáncer se le atribuye al médico griego Hipócrates, considerado el padre de la medicina moderna, quien utilizó la palabra *karkinos* (del griego cangrejo) para referirse a esta enfermedad por la homología entre la forma de un cangrejo y las proyecciones en forma de dedos que emergen de un tumor infiltrante (Figura 1).



Figura 1. Las prolongaciones de un tumor cancerígeno se asemejan a las patas de un cangrejo.

Hoy en día sabemos que el término cáncer no hace referencia a una única enfermedad, sino a un conjunto de enfermedades que tienen su origen en el crecimiento descontrolado de las células de nuestro cuerpo. Además, estas células tumorales o cancerígenas tienen la capacidad de invadir el tejido sano adyacente y diseminarse a otras partes del organismo (que es lo que se conoce como metástasis) (Figura 2).

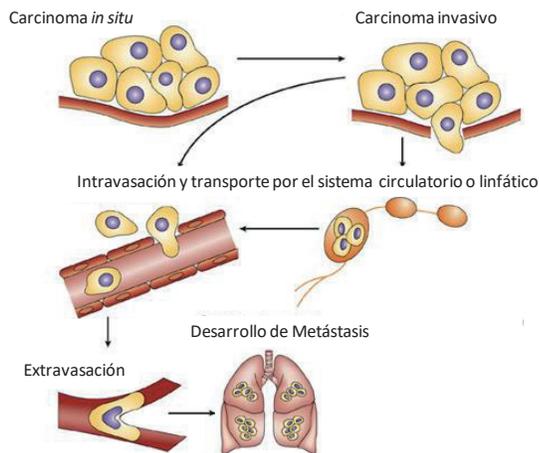


Figura 2. Etapas de los procesos de carcinogénesis y metástasis.

Lo más curioso es que el cáncer no es en sí una enfermedad en el sentido infeccioso de la palabra (es decir, no está provocada por un patógeno que nos ataca), sino un mal funcionamiento de algunas de nuestras células que provoca que nuestro cuerpo se vuelva contra nosotros mismos, generando una serie de consecuencias que pueden resultar letales. De este modo, la incidencia del cáncer aumenta con la edad y, debido al envejecimiento de la población, el cáncer ha pasado de ser una enfermedad testimonial a principios del siglo XX a alcanzar una gran incidencia en la actualidad (Li *et al.*, 2023).

Y ¿cómo se origina un cáncer?

Aunque se trata de un proceso muy complejo, quizás una de las teorías más descriptivas es la propuesta por la Dra. Athena Aktipis de la Universidad

Estatad de Arizona en Estados Unidos. Según esta investigadora “En los organismos complejos, las células conviven gracias a la colaboración. Cuando algunas rompen las reglas, aparece el cáncer” (Aktipis *et al.*, 2015; Aktipis, 2021) (Figura 3).

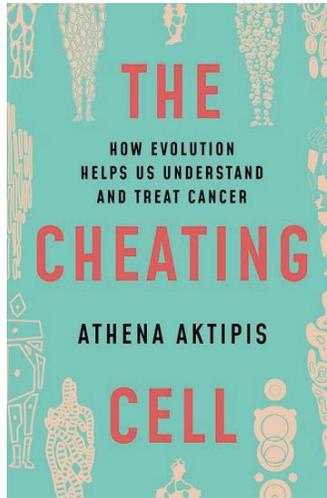


Figura 3. Portada del libro “La célula tramposa” en el que la Prof. Aktipis adopta un enfoque evolutivo del cáncer, analizando las formas en que las células “engañan” a la selección natural y mostrando cómo el cuerpo humano evolucionó para burlar muchas de esas amenazas.

Lo que viene a decir esta teoría es que en los organismos pluricelulares (como es nuestro caso, los humanos) la colaboración entre nuestras células, tejidos y órganos permite generar un entorno adecuado para, entre otras cosas, obtener y asimilar nutrientes, defenderse de depredadores y patógenos o para reproducirse y perpetuar la especie. Sólo tienen que hacer un ejercicio muy sencillo: miren su mano y den la orden a su cerebro para que mueva los dedos. Lo que están observando no es más que un maravilloso sistema de colaboración entre las neuronas de nuestro cerebro y un montón de nervios, músculos y células epiteliales trabajando en sintonía para obtener un fin.

Sin embargo, no todas las células del organismo aceptan de buen grado esta colaboración. En determinados casos aparecen células egoístas o

tramposas que deciden romper las reglas del juego y que, si nada se lo impide, se multiplicarán sin ningún control para formar un tumor maligno. Tendremos entonces una masa de células descontroladas, que no producen más que problemas. Además, como siguen siendo nuestras células, el sistema inmune no tiene capacidad de luchar contra ellas, ya que las identifica como parte de nuestro cuerpo. Al final, el cáncer no es otra cosa que el triunfo de unas células tramposas que han adquirido capacidades especiales y que determinan el crecimiento maligno (Hanahan y Weinberg, 2000; 2011) (Figura 4).

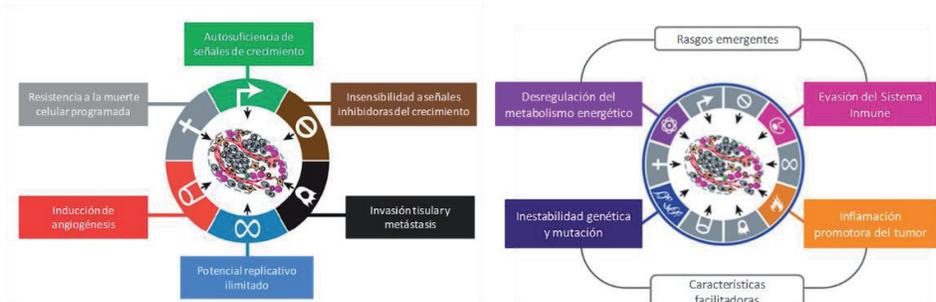


Figura 4. Esquema de los rasgos distintivos del cáncer según el modelo de Hanahan y Weinberg del año 2000 (Derecha). En el año 2011, estos mismos autores publicaron una revisión de estos “rasgos del cáncer” en la que, además de redefinir y actualizar estas características, añadieron la inestabilidad genómica y la mutación, como fuente de la diversidad de alteraciones genéticas que facilita la adquisición de dichas características; y la inflamación, como promotora del desarrollo de las mismas. Así mismo, añadieron dos características emergentes, de las células cancerígenas: la reprogramación del metabolismo energético y la evasión del sistema inmune (Izquierda). Por último, resaltaron el papel del microambiente tumoral en la adquisición de dichas características distintivas del cáncer.

No sólo genética: también epigenética

En febrero de 2001 se conocía lo que marcaría un antes y después en la investigación biomédica mundial: la publicación del mapa del genoma humano (Venter *et al.*, 2001). Esto ha permitido conocer que existen múltiples genes implicados en el desarrollo del cáncer y hay quien afirma que “el cáncer es una enfermedad de los genes”. Años más tarde (en febrero de 2015) se dio a conocer el mapa del epigenoma humano (Schultz *et al.*, 2015), es decir, la

maquinaria que regula la activación genética y las funciones celulares. Vamos a ir por partes...

Genética del cáncer

Hoy en día sabemos que existen 2 tipos de genes relacionados con el cáncer (Figura 5): (1) Los **oncogenes** que son genes que se generan por mutación de genes normales y que están implicados en la transformación tumoral (llamémoslos genes malos) y (2) los **genes supresores de tumores** (los genes buenos) que son genes que impiden la proliferación celular y promueven la apoptosis (muerte) de las células tumorales. Entre estos el más famoso es el p53 que es conocido como la policía antitumoral (Olivier *et al.*, 2010).

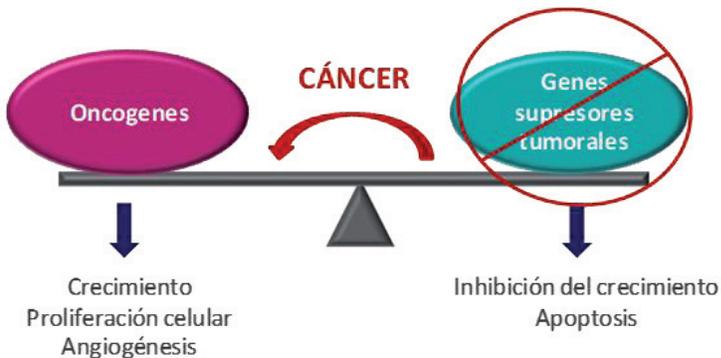


Figura 5. Modelo de desarrollo del cáncer como consecuencia de la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores.

Lo más curioso es que algunos factores que producen cáncer, entre ellos algunos virus, lo que hacen es destruir a esta “policía antitumoral” para poder desarrollar los tumores. El caso más conocido es el del virus del papiloma humano (HPV) que provoca cáncer de útero mediante la inactivación de la proteína p53 (Bernard *et al.*, 2011) (Figura 6).

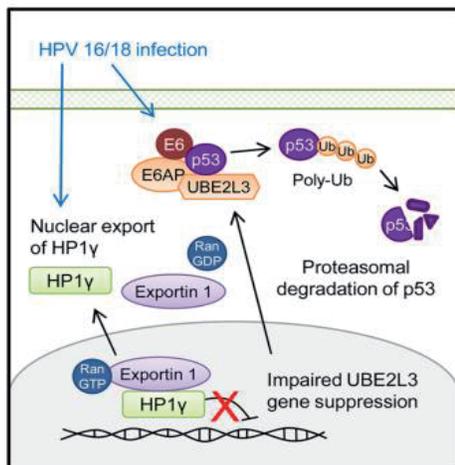


Figura 6. Esquema que muestra como el HPV dirige al p53 a su degradación en el proteosoma (Bernard *et al.*, 2011).

¿Qué es la epigenética?

No toda la información que se encuentra en nuestros genes se está transcribiendo continuamente. Los genes necesitan de una serie de señales para activarse o detenerse (Esteller *et al.*, 2001). Precisamente, estas señales están gobernadas por la epigenética. Podríamos, por lo tanto, decir que la epigenética son marcas químicas que se añaden al material genético y permiten su correcta actividad (Maleknia *et al.*, 2023). (Luego veremos que estas marcas vienen en forma de grupos metilo) (Figura 7).

Como no quiero que se vayan de aquí sin saber lo que es la epigenética les voy a poner el ejemplo más típico que se suele dar para explicar este concepto y les voy a hacer también una analogía. El ejemplo, es el de los gemelos monozigóticos. Aunque ambos tienen el mismo ADN estos pueden ser diferentes y, sobre todo, tener enfermedades diferentes. ¿Cómo es posible, si disponen del mismo material genético? Pues porque, aunque comparten el ADN, en cada individuo se regula de una manera distinta determinado por el epigenoma.

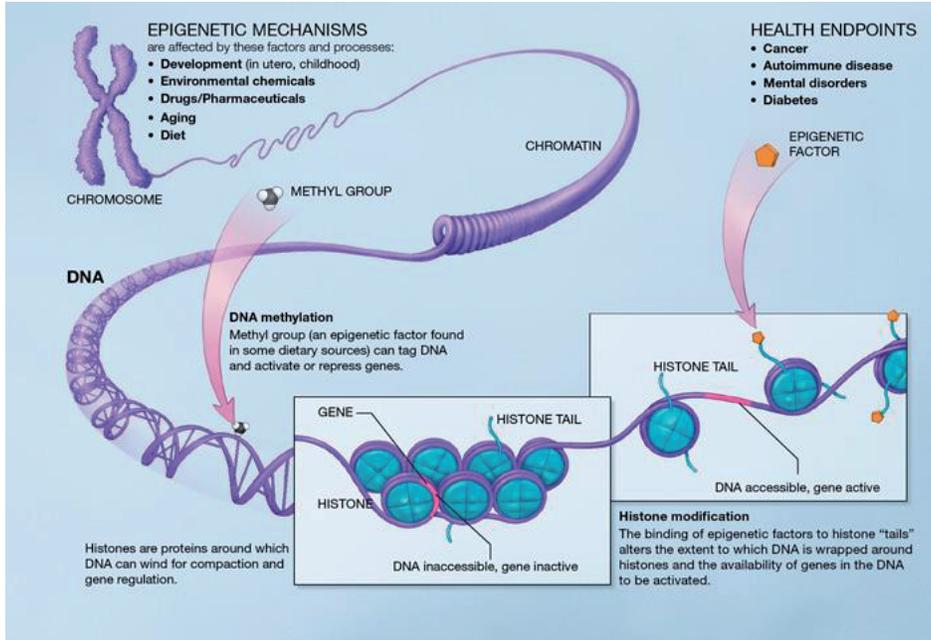


Figura 7. El gráfico muestra los mecanismos que activan los cambios epigenéticos. Fuente: Apnabi.org

En cuanto al símil, vamos a imaginar a una orquesta en la que los músicos con sus instrumentos (violín, violonchelo, trompeta, clarinete...) serían el material genético, el ADN, mientras que el director de la orquesta es el que da las señales (marcas) con su batuta para que vaya entrando cada instrumento en el momento y con la duración adecuada; por lo que podríamos considerarlo el epigenoma de esta orquesta.

Pero entonces ¿es más sencillo modificar el epigenoma que el genoma?

La respuesta es sí. Morimos con un genoma prácticamente idéntico con el que nacemos; sin embargo, el epigenoma sí que varía. Este dinamismo hace que sea más sencillo intervenir sobre el epigenoma que sobre el genoma y esto nos permite utilizar fármacos para reprogramar la célula y conseguir que recuerde como era su epigenoma normal, antes de haberse transformado en una célula tumoral (Berdasco & Esteller, 2010; Marini *et al.*, 2006).

Y ¿cómo podemos modificar el epigenoma?

Pues aquí no tengo más que apelar al título de este discurso: atacando a la maquinaria epigenética de la célula tumoral.

Si alguien me preguntara ¿a qué se dedica un oncólogo molecular? Le respondería que pasamos mucho tiempo intentando encontrar vulnerabilidades (puntos débiles) en las células tumorales para poderlas atacar con las herramientas que disponemos en la oncología clínica. Hace ya algunos años, nuestro grupo de investigación observó que bloqueando la maquinaria epigenética de las células éramos capaces, no solo de destruirlas, sino también de vencer la resistencia de estas células a otras terapias convencionales, como la quimio-, la radio- o la inmunoterapia (Montenegro *et al.*, 2012; 2015). Ahora que lo pienso ¡parece mentira, pero nuestro grupo ha pasado más de 20 años intentando cargarse a un director de orquesta!

Para simplificar, podemos decir que la maquinaria epigenética de las células está formada por dos ciclos: el ciclo del ácido fólico y el ciclo de la metionina (Figura 8). Ambos trabajan continua y conjuntamente en la célula (como si fuera un engranaje perfecto) para generar grupos metilo, que posteriormente, se unirán covalentemente al ADN y a las proteínas mediante unas enzimas llamadas metiltransferasas y que dependen del donador universal de grupos metilo: la S-adenosilmetionina o SAM (Cellarier *et al.*, 2003). Hasta ahora, los científicos siempre han considerado a la metilación del ADN o de las proteínas histonas (proteínas que permiten la organización del material genético) como mecanismos epigenéticos. Nuestro grupo, además, también ha observado que si atacamos a la maquinaria epigenética también modificamos los patrones de metilación de otras proteínas no histonas. Muchas de ellas, factores de transcripción fundamentales para el desarrollo del cáncer, entre ellos BRCA, p53, E2F1, C-MYC y un largo etcétera (Guendel *et al.*, 2010; Montenegro *et al.*, 2012; Scoumanne & Chen, 2008; Tikhanovich *et*

conoce como un antifolato (Jackson *et al.*, 1984). Aquí partíamos con ventaja, ya que unos años atrás nuestro grupo, en colaboración con el Profesor Alberto Tárraga, había desarrollado unas moléculas derivadas de las catequinas del té verde y que poseían actividad antifolato (después les contaré como se nos ocurrió sintetizar estas moléculas) (Sáez-Ayala *et al.*, 2011; Sánchez-del-Campo *et al.*, 2008). Por tanto, disponíamos de una molécula denominada TMCG [3-O-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-(-)-catequina], un inhibidor de la DHFR que nos permitiría bloquear el ciclo del ácido fólico (Figura 9).

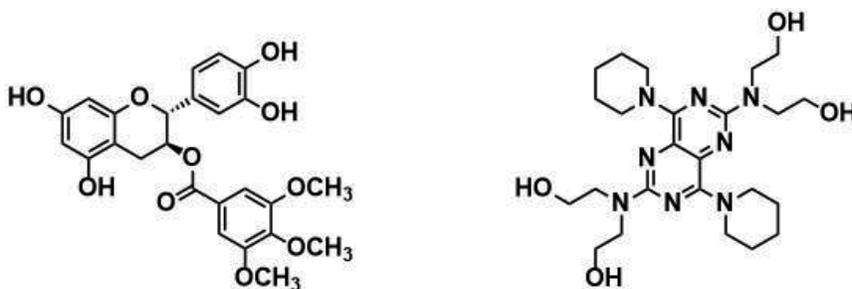


Figura 9. Estructura química del TMCG (izquierda) y DIPY (derecha) componentes de la terapia HMT

Más quebraderos de cabeza nos dio la búsqueda de una molécula que bloqueara el ciclo de la metionina. Tras muchos días (meses) de mirar el mismo esquema que están ustedes viendo en este momento, recabamos en la reversibilidad de la reacción catalizada por la S-adenosilhomocisteína hidrolasa (AHYC). Sabíamos que la SAH (el producto tras la acción de las metilasas) era un inhibidor muy potente de todas las metiltransferasas celulares (tanto del ADN como de proteínas), por lo que nuestro objetivo se centró en acumular SAH en la célula tumoral. Para ello, y aprovechando la reversibilidad de la reacción marcada, lo que hicimos fue aumentar los niveles intracelulares de adenosina utilizando el dipiridamol (DIPY) (Figura 9), un fármaco capaz de inhibir no sólo el metabolismo de la adenosina, sino también su transporte al exterior de la célula tumoral. Esta acumulación de adenosina, en combinación con los elevados niveles de homocisteína (por acción del

TMCG) da lugar a una acumulación de SAH y la efectiva inhibición de todas las metiltransferasas dependientes de SAM. Al uso combinado de estos fármacos la denominamos terapia hipometilante o tratamiento HMT.

A continuación, les contaré como hemos usado esta terapia hipometilante para aumentar la sensibilidad del cáncer de mama a la radioterapia (Montenegro et al., 2016).

Sensibilización de las células de cáncer de mama a la radiación ionizante

La radioterapia induce daño en el ADN con fines terapéuticos

Radioterapia

La radioterapia (también llamada terapia con rayos X o irradiación) es el uso de la radiación ionizante para destruir las células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores. La radioterapia lesiona o destruye las células en el área que recibe tratamiento al dañar su material genético y hacer imposible que crezcan y se dividan. Aunque la radiación daña las células cancerosas, así como las normales, muchas células normales se recuperan de los efectos de la radiación y funcionan adecuadamente. El objeto de la radioterapia es destruir el mayor número posible de células cancerosas y limitar el daño que sufre el tejido sano de alrededor.

La radioterapia es en la actualidad, una de las terapias oncológicas más empleadas en el tratamiento de los tumores malignos. Los avances científicos y tecnológicos de las últimas décadas han permitido que el tratamiento radioterápico se realice con gran precisión, preservando y minimizando los efectos secundarios en los tejidos sanos. El progresivo desarrollo de los

distintos fármacos empleados, tanto para el tratamiento del cáncer como para disminuir los efectos secundarios de la radiación, permite el uso de terapias combinadas más intensivas y eficaces (Okunieff *et al.*, 2018). Hoy en día, es frecuente que numerosos pacientes reciban radioterapia como parte de la terapia oncológica (Figura 10). En multitud de ocasiones, este tratamiento, se asocia a otros como la cirugía, la quimioterapia o la inmunoterapia, con el objetivo de aumentar el porcentaje de curaciones; sin embargo, en algunos casos pueden aparecer efectos de resistencia tumoral a la radiación.



Figura 10. Nuevo sistema de irradiación para tratar con radioterapia el cáncer de mama

La radiación ionizante y el daño al ADN

La radiación de alta frecuencia (radiación ionizante) choca con una célula viva con suficiente energía como para liberar electrones de las moléculas que componen la célula generando unos radicales libres que interrumpen el funcionamiento normal de la célula. El daño más severo a la célula resulta cuando se daña al ADN, puesto que es el que contiene todas las instrucciones para producir nuevas células. El daño producido en el ADN por la radiación se produce a través de dos rutas (Sureka & Armpilia 2017): (a) ruta indirecta: mediante la interacción de los radicales libres, generados al absorber el agua

del cuerpo una gran porción de radiación, con el ADN de la célula (Figura 11) y (b) ruta directa: mediante la interacción directa de la radiación con el ADN, ionizándolo y dañándolo (Figura 11).

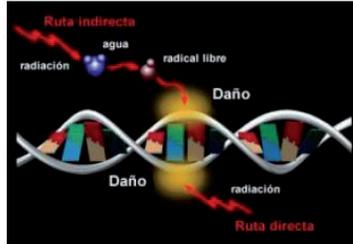


Figura 11. Mecanismos de daño en el ADN inducido por radiaciones ionizantes

El que una célula pueda repararse después de ser dañada por radiación depende del tipo de daño del ADN de la célula. La radiación puede dañar el ADN de tres maneras diferentes: romper una sola cadena, romper ambas cadenas, o producir un cambio químico o mutación (Figura 12). Sin duda, las lesiones más importantes del ADN ante una radiación ionizante, son las de doble cadena (DBS) (Lomax *et al.*, 2013). Son de gran importancia ya que con sólo una DBS se puede inducir con eficiencia la muerte celular, en organismos superiores, y porque una mala reparación de estas lesiones puede causar mutaciones, deleciones o translocaciones.

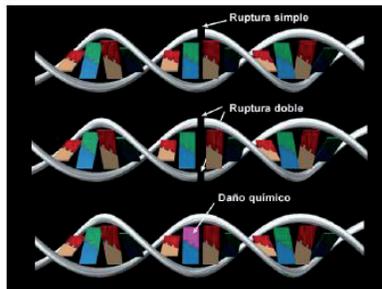


Figura 12. Tipos de daño en el ADN inducido por radiaciones ionizantes

Resistencia a la radioterapia

Origen de la resistencia

Aunque la molécula de ADN es bastante inerte a la degradación espontánea o inducida por el entorno, su enorme tamaño hace inevitable que le ocurran lesiones. Así, se estima que una célula metabólicamente activa de mamífero padece alrededor de 10.000 alteraciones en su genoma, cada día. Para corregir tales alteraciones, la célula ha desarrollado sistemas que los detecta, señalizan y reparan la lesión (Lomax *et al.*, 2013). Estos sistemas suelen ser específicos de un tipo de lesión concreta.

Lo más curioso y preocupante, y que a la vez nos sirve para entender la complejidad del cáncer, es que los mecanismos de reparación que en las células normales aseguran la estabilidad genómica, en las células tumorales son los que dan lugar a la resistencia a la radioterapia (Liu *et al.*, 2016). Si bien, la reparación del ADN es un proceso altamente deseable para mantener la integridad celular en los seres humanos, en algunos casos, sería deseable evitar estos sistemas de reparación. Por ejemplo, estos sistemas de reparación son los responsables de la resistencia a la radioterapia en pacientes con cáncer (Nakshatri, 2010). Conseguir que las células tumorales no pudieran reparar su ADN, después de ser sometidas a radiaciones ionizantes, permitiría sensibilizar a estas células malignas frente a la radiación, lo que haría que la radioterapia fuera un tratamiento más eficaz contra el cáncer. Conocer los mecanismos moleculares de reparación del ADN en estas células tumorales permitiría diseñar terapias combinadas de quimioterapia y radioterapia más efectivas (Okunieff *et al.*, 2018).

Mecanismos de resistencia

Las radiaciones ionizantes (IR) matan las células cancerosas por la inducción de rupturas de doble filamento en el ADN (DSBs). Dado que ambas

hebras del ADN están dañadas, las DSBs son más difíciles de reparar que cuando el daño se produce en una sola hebra del ADN (SSBs), ya que la hebra intacta sirve como plantilla o modelo para guiar la reparación (Hoeijmakers, 2001). Por lo tanto, el DSB debe activar un sistema de señalización que sea capaz de detectar los focos de ruptura. La activación de la señal DSB a menudo resulta en muerte celular o en la parada del ciclo celular. Debido a que los DSBs son más tóxicos en las células de crecimiento rápido, los agentes que inducen DSBs se utilizan con frecuencia para tratar el cáncer (Iliakis *et al.*, 2004). Sin embargo, algunas células tumorales disponen de sistemas de reparación muy eficaces que les permite sobrevivir a la IR.

En los organismos eucariotas existen mecanismos de detección y respuesta al daño en el ADN. Estos mecanismos se engloban en la DDR (*DNA Damage Response*), una cascada de activación de proteínas que se pone en marcha en respuesta a la presencia de daño y/o roturas en el ADN. ATM (*Ataxiatelangiectasia mutated*) es una proteína esencial en esta vía, donde realiza funciones de transmisión de la señal de daño (Tomita, 2010). ATM fosforila a los genes supresores p53 y BRCA1, lo que dispara el estado de protección y reparación (Figura 13) (Daley & Sung, 2014).

La histona H2AX forma parte del conjunto de proteínas sobre las que se empaqueta la doble hélice del ADN y es inmediatamente fosforilada – volviéndose γ H2AX- cuando éste sufre un daño (Rogakou *et al.*, 1999). La presencia de esta proteína es importantísima para que otras proteínas de reparación sean reclutadas en el lugar del daño. Esto ha hecho que la H2AX se haya denominado “la histona guardiana del genoma”.

Otra proteína de gran importancia para la reparación de la ruptura de doble cadena del ADN (DSB) es la 53BP1 (Daley & Sung, 2014). En este sentido, 53BP1 colabora con H2AX y Mdc1 en la reparación de DSB. Así, 53BP1 ha sido encontrado cerca de los sitios de DSBs y necesita de la metilación

específica de dos histonas (H3 y H4) para su anclaje (Huyen *et al.*, 2004; Pei *et al.*, 2011; Wakeman *et al.*, 2012).

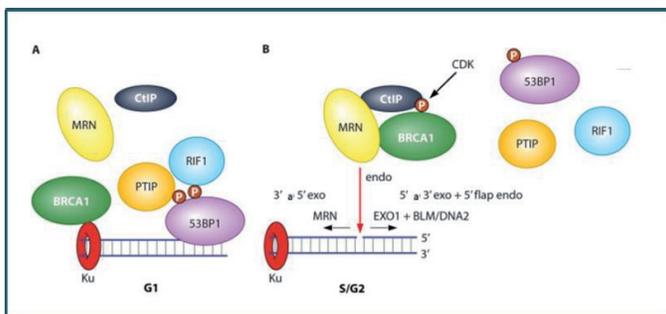


Figura 13. Esquema de la ocupación de los DSBs por las proteínas de reparación. Imagen obtenida de Daley y Sung, 2014.

Defensa epigenética de las células de cáncer de mama frente a la radioterapia

Varios descubrimientos recientes indican que la resistencia tumoral a la radiación ionizante podría estar mediada por factores epigenéticos en los que están implicados la metilación de varias proteínas histonas y no histonas (Huyen *et al.*, 2004; Montenegro *et al.*, 2020; Pei *et al.*, 2011; Wakeman *et al.*, 2012). Por lo tanto, pensamos que, si éramos capaces de evitar la metilación de proteínas en las células de cáncer de mama mediante nuestra terapia HMT, también podríamos evitar la reparación del ADN y, consecuentemente, la resistencia a la radioterapia.

Papel de la metilación de histonas en la respuesta al daño del ADN

Se conoce que la resistencia tumoral a la radioterapia está asociada con la dimetilación de las histonas H4 (K20) y H3 (K79) por dos metilasas de proteínas dependientes de S-adenosilmetionina (SAM), MMSET y DOT1L, respectivamente (Figura 14) (Pei *et al.*, 2011; Wakeman *et al.*, 2012). Estas metilaciones permiten la unión de la proteína 53BP1 a los sitios de doble

ruptura del ADN, lo que produce una parada del ciclo celular y una protección frente a la apoptosis celular. El silenciamiento, a nivel de ARNm, de estas dos metilasas produjo una mayor sensibilidad de las células tumorales a la radiación ionizante (Pei *et al.*, 2011; Wakeman *et al.*, 2012).

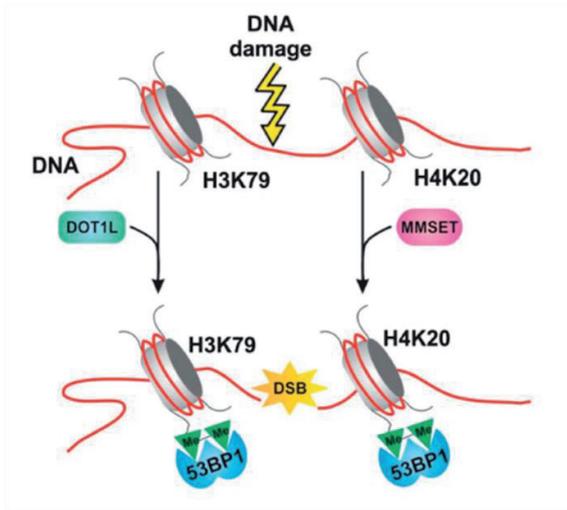


Figura 14. Papel de la metilación de histonas en la respuesta al daño del ADN.

La metilación de BRCA1 por PRMT1 contribuye a la defensa epigenética de las células de cáncer de mama frente a la radiación ionizante.

Si bien los mecanismos de reparación responsables de la supervivencia celular tras el daño en el ADN han sido ampliamente estudiados, se conoce mucho menos acerca de los mecanismos epigenéticos que posibilitan la resistencia a la radioterapia. Aunque los cambios en la metilación del ADN pudieran estar relacionados con mecanismos de resistencia a largo plazo, es más probable que el estado de metilación de una serie de proteínas pudiera ser responsable de la primera línea de defensa de las células tumorales frente a la irradiación. En este estudio se observó que la irradiación de las células de cáncer de mama se acompañó de una sobreproducción de SAM, que aumenta la actividad de las metiltransferasas celulares (Montenegro *et al.*, 2020).

Encontramos que, mediante la activación de PRMT1, la irradiación inicia un programa dependiente de BRCA1 que da lugar a una reparación eficiente del ADN y a la inhibición de la apoptosis. La depleción de PRMT1 en células de cáncer de mama irradiadas dio lugar a un cambio en las funciones de BRCA1, desde funciones de reparación y supervivencia en el núcleo, a la activación de señalización proapoptótica en el citoplasma. Concluimos que mediante el control de la localización de BRCA1, PRMT1 constituye un importante regulador de las funciones oncogénicas de BRCA1, contribuyendo así a la defensa epigenética de las células de cáncer de mama frente a la radiación ionizante (Figura 15).

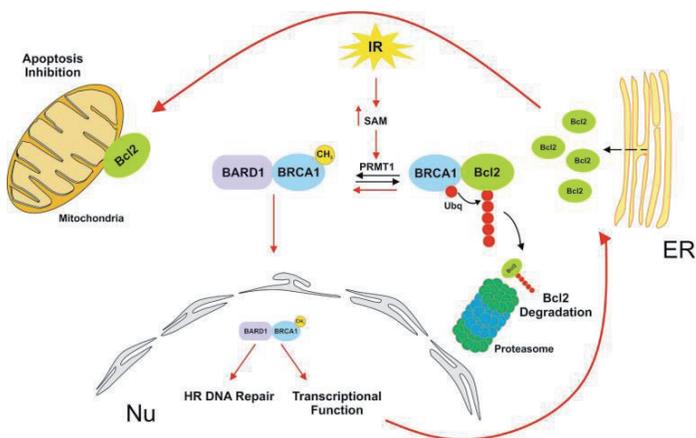


Figura 15. Control epigenético de BRCA1 en células de cáncer de mama (Montenegro et al., 2020)

El HMT evita la resistencia a la radioterapia en cáncer de mama

El HMT impide la reparación del ADN después de la radiación ionizante

Una de los primeros eventos después de la inducción de DSBs es la fosforilación de una forma especial de la histona 2A (H2AX) que forma parte

del 10% de todos los nucleosomas en las células. La H2AX contiene una zona en el extremo carboxilo terminal que puede fosforilarse. La fosforilación de la H2AX está mediada por la enzima ATM y da lugar a la γ H2AX (H2AX fosforilada). Esta fosforilación ocurre en cuestión de minutos después del daño celular. A continuación, estudiamos la señalización por γ H2AX en células de cáncer de mama después de ser sometidas a una radiación de rayos X (Figura 16). Una hora después de la radiación, la γ H2AX fue visualizada utilizando microscopia confocal y Western blot y se observó que en células no irradiadas no se detectaba la presencia de γ H2AX, mientras que poco después de la radiación la γ H2AX se detectaba en el núcleo de las células como pequeños puntos que coincidían con la doble ruptura del ADN (Figura 16).

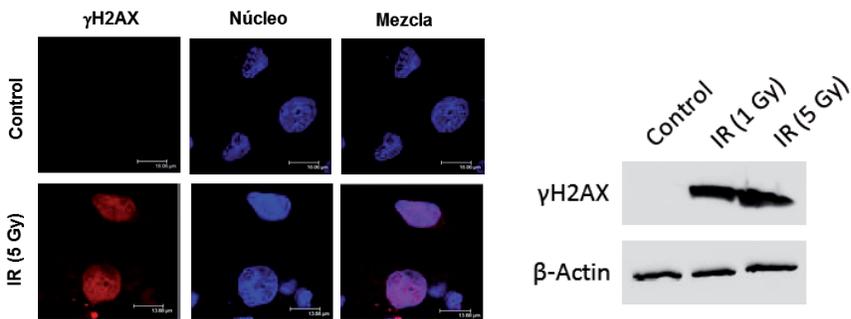


Figura 16. Acumulación y señalización de DSBs en células de cáncer de mama (MDA-MB-231) antes (control) y 1 hora después de ser sometidas a irradiación con Rayos X (5 Gy).

Debido a que todas las líneas celulares de cáncer de mama estudiadas mostraban un sistema de reparación intacto, nos preguntamos si estas células eran capaces de reparar su ADN y sobrevivir a la radiación o si, por el contrario, las células morirían después de su exposición a una IR. En células en las que se produce un daño irreparable del ADN, la γ H2AX se observa durante todo el proceso de muerte celular (apoptosis); sin embargo, en aquellas células donde se ha producido la reparación del ADN la γ H2AX desaparece del ADN puesto que ya no existe daño que reparar. Para este experimento, las células de

cáncer de mama MDA-MB-231 fueron irradiadas con Rayos X (5 Gy) y, posteriormente, la acumulación de la γ H2AX fue visualizada a 1, 10 y 24 horas después de la radiación. Como se observa en la Figura 17, la γ H2AX prácticamente no se encontraba presente en el núcleo de las células pasadas 24 horas de la irradiación, lo que indicaba que estas células habían sido capaces de reparar su ADN y sobrevivir a la radiación.

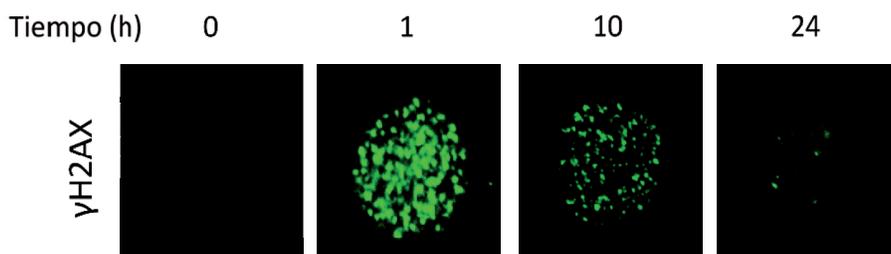


Figura 17. Las células de cáncer de mama (MDA-MB-231) son capaces de reparar su ADN después de ser sometidas a irradiación con Rayos X (5 Gy).

Para comprobar si el tratamiento HMT impedía la reparación del ADN de las células de cáncer de mama sometidas a una IR, evaluamos la cantidad de γ H2AX a distintos tiempos después de la radiación. Como se vio anteriormente, en ausencia de HMT, las células repararon su ADN antes de las 24 horas transcurridas desde la IR (Figura 17). Sin embargo, la presencia de HMT impidió completamente la reparación. En este caso, a las 24 horas después de la IR, además de una gran acumulación de γ H2AX en el núcleo de las células, también se observó la ruptura de la estructura nuclear, lo que indicaba que las células sometidas a quimioterapia y radioterapia eran sensibles al tratamiento y era una primera indicación de que se estaba produciendo su muerte celular (Figura 18).

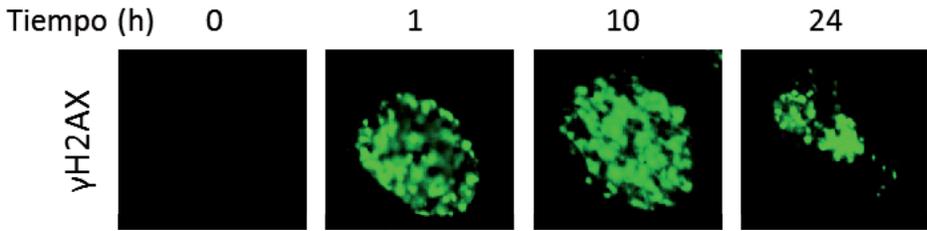


Figura 18. Las células de cáncer de mama (MDA-MB-231) no fueron capaces de reparar su ADN después de ser sometidas a irradiación con Rayos X (5 Gy) y un tratamiento HMT.

Para comprobar si el tratamiento combinado de IR con HMT producía la ruptura del ADN de las células, a continuación, realizamos el ensayo del cometa que permite visualizar la integridad del ADN. En este ensayo el ADN es teñido con bromuro de etidio (un compuesto fluorescente que se intercala entre las dos hebras del ADN) en las células sin romper y, posteriormente, se realiza una electroforesis en agarosa. En células donde el ADN está intacto se observa que la fluorescencia está centrada en el núcleo de la célula, apareciendo como una esfera homogénea. Sin embargo, en células con ADN degradado lo que se observa es una cola fluorescente debido a la presencia de moléculas de ADN de tamaño más pequeño y heterogéneo. Al igual que en el ensayo anterior, se observó que el tratamiento con IR no fue capaz de producir la ruptura del ADN, sin embargo, la IR más el tratamiento HMT produjo una ruptura masiva del ADN (Figura 19).

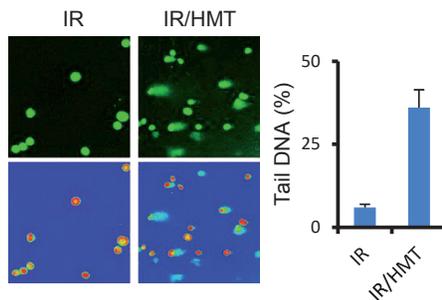


Figura 19. Ensayo del cometa en células MDA-MB-231 sometidas a irradiación con Rayos X (5 Gy) y un tratamiento HMT.

El HMT induce apoptosis en las células de cáncer de mama tras la radiación ionizante

Una vez observado que el doble tratamiento (quimioterapia y radioterapia) era capaz de producir la ruptura del ADN, posteriormente, estudiamos si este tratamiento era capaz de inducir muerte celular por un proceso de apoptosis. Para evaluar si los efectos inducidos por la combinación provocaban la muerte por apoptosis de las células tratadas, se realizaron diversos ensayos de apoptosis en diversas líneas celulares. Se utilizaron técnicas de microscopía para evaluar los cambios morfológicos y un ensayo por microscopía de fluorescencia con la tinción de Hoechst para determinar el estado de la cromatina de las células tratadas.

Estudios microscópicos en diversas líneas tumorales de cáncer de mama indicaron que la IR más el tratamiento HMT inducía apoptosis en las líneas MDA-MB-231 humanas y 4T1 de ratón, como lo ponen de manifiesto los cambios morfológicos significativos que se produjeron tras el tratamiento. Se observó la zeiosis de la membrana o blebbing, formándose protuberancias en su superficie, se perdió el contacto entre células y se produjo una fragmentación de la membrana plasmática y nuclear (Figura 20).

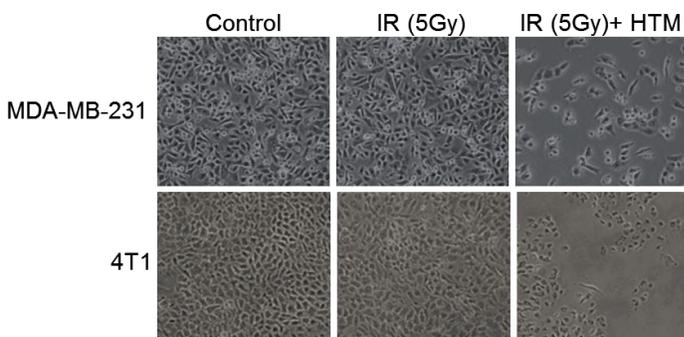


Figura 20. Ensayo de morfología celular en células MDA-MB-231 y 4T1 sometidas a varios tratamientos

También se realizó un ensayo por microscopía de fluorescencia con la tinción de Hoechst para determinar el estado de la cromatina de las células de

cáncer de mama MDA-MB-231 y 4T1 tratadas con IR y HMT (Figura 21). Con este estudio se puso de manifiesto que las células tratadas sufrían condensación de la cromatina y fragmentación de los núcleos, características típicas de la apoptosis celular.

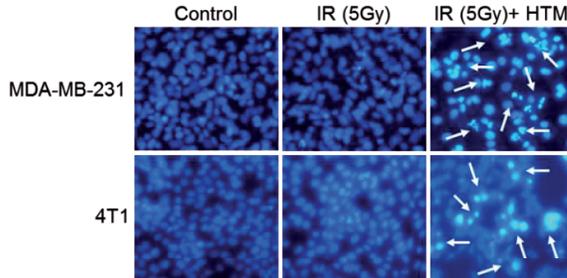


Figura 21. Ensayo de apoptosis con tinción de Hoechst en células MDA-MB-231 y 4T1 sometidas a varios tratamientos.

El HMT inhibe la metilación de las histonas H3 y H4 en células de cáncer de mama e impide la unión de 53BP1 a las zonas de daño de ADN inducidas por la radiación ionizante

Una vez señalizado el daño de doble hebra del ADN por la γ H2AX, una serie de proteínas participan en la reparación del ADN. Una proteína que es primordial para esta reparación es la 53BP1. Ensayos de IR en células en las que la 53BP1 estaba ausente demostraron que las células no podían reparar su ADN si esta proteína no estaba presente (Pei *et al.*, 2011; Wakeman *et al.*, 2012). A continuación, comprobamos la existencia de 53BP1 en células de cáncer de mama y su acumulación en las zonas de DSBs. Observamos que la 53BP1 se encuentra en todas las células de cáncer de mama estudiadas y que esta proteína interactuaba físicamente con la γ H2AX. Así, en zonas de DSBs se observó una colocalización de ambas proteínas al estudiar a las células irradiadas por microscopía confocal (Figura 22). Posteriormente, para determinar si la terapia HMT era capaz de inhibir la metilación de las histonas H3 y H4 en las células de cáncer de mama, las células fueron sometidas a este tratamiento durante 3 días. Al tercer día de tratamiento con estas drogas, las

células fueron irradiadas con una IR de 120 Gy y una hora después las células fueron recogidas y ensayadas por western blot para la presencia de H4K20me2 y H3K79me2. Los resultados indicaban que la combinación TMCG/DIPY inhibía en más de un 70% la metilación de estas histonas (Figura 22a).

Una vez que comprobamos que la combinación TMCG/DIPY inhibía la metilación de las histonas H3 y H4 pasamos a investigar si esta desmetilación de las histonas impedía la unión de la proteína reparadora 53BP1 a las zonas de DSBs inducidas por la IR. Utilizando la microscopia confocal observamos que el tratamiento HMT no impedía la unión de la γ H2AX a las zonas de DSBs, pero si la unión de la 53BP1 (Figura 22). En estas condiciones las células fueron capaces de señalar el daño al ADN, pero, posiblemente, no podrían repararlo, debido a que necesitarían a la 53BP1 para ello (Figura 22). La gran acumulación de γ H2AX en las zonas de DSBs, a 1 hora de la radiación, ya nos indicaba que el daño al ADN era mucho mayor en presencia del tratamiento HMT que cuando se trataron únicamente con la IR (Figura 22).

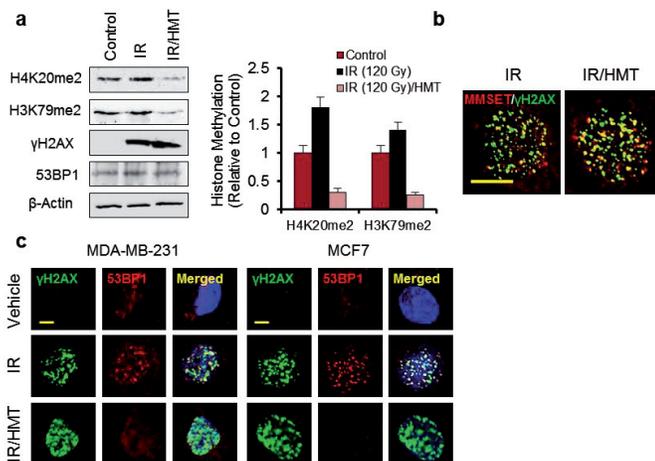


Figura 22. HMT suprime la formación de focos de 53BP1 inducida por daño en el ADN en células de cáncer de mama.

La hipometilación de BRCA1 impide su translocación nuclear tras la exposición a la radiación ionizante.

Nuestro grupo de investigación, junto con otros grupos, hemos demostrado que las funciones de BRCA1 están controladas por la metilación de su proteína (Guendel *et al.*, 2010; Montenegro *et al.*, 2020). De acuerdo con su actividad desmetilante propuesta, observamos que el HMT causó una fuerte reducción en la metilación de BRCA1 en los residuos de arginina en dos líneas celulares de cáncer de mama (Figura 23a). Recientemente, también se ha sugerido que el estado de metilación de la proteína BRCA1 puede desempeñar un papel importante en su localización celular (Guendel *et al.*, 2010); sin embargo, no se ha investigado si el estado de metilación de BRCA1 afecta sus funciones en condiciones que implican estrés genotóxico. Para responder a esta pregunta, marcamos BRCA1 en células de cáncer de mama usando un anticuerpo anti-BRCA1 y luego se analizó su localización mediante microscopía confocal (Figura 23b,c). Las células MCF7 y MDA-MB-231 en reposo demostraron algunas diferencias en la localización de BRCA1, donde BRCA1 se localizó exclusivamente en el citoplasma de las células MCF7 no tratadas. Sin embargo, la respuesta a la IR fue similar en ambas líneas celulares; por lo tanto, después de la IR, el BRCA1 citosólico se transportó claramente al núcleo y 1 h después de la irradiación, el BRCA1 se localizó principalmente en focos nucleares. Curiosamente, la intervención epigenética, utilizando el HMT inmediatamente antes de la IR, no solo aumentó la localización citosólica de BRCA1, sino que también suprimió la formación de focos de BRCA1 inducida por daño al ADN en las células estudiadas (Figura 23b,c). A continuación, silenciamos PRMT1 en células MCF7 para determinar si el estado de metilación de BRCA1 estaba implicado en su localización diferencial. La eliminación de PRMT1 resultó en la acumulación citosólica de BRCA1 después de la IR y en un aumento de la susceptibilidad en las células MCF7 a la apoptosis inducida por IR (Figura 23d). Debido a que BRCA1

necesita ser transportado al núcleo para realizar sus funciones de reparación del ADN (Figura 15), estos resultados indican que las condiciones de hipometilación pueden prevenir la reparación del ADN dependiente de BRCA1 en células de cáncer de mama que están sometidas a la IR.

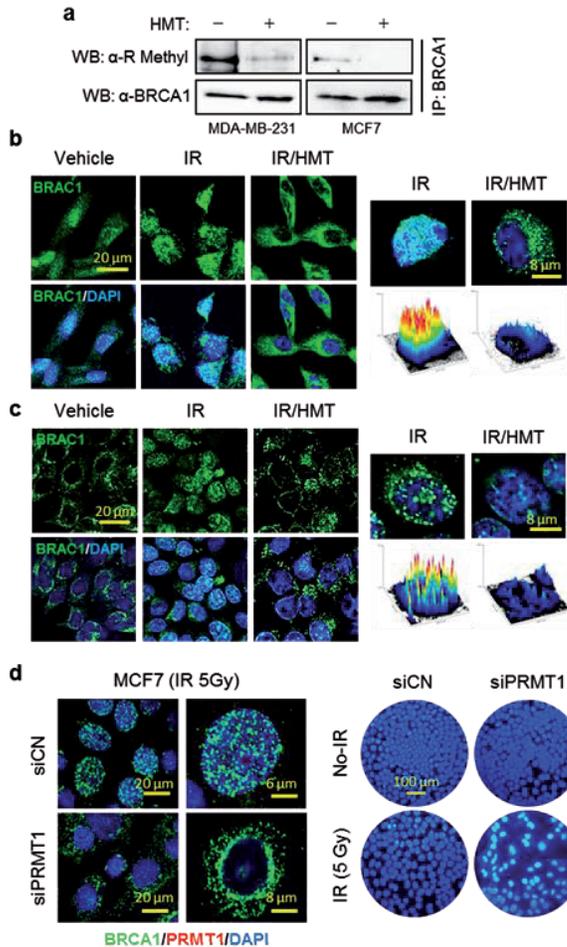


Figura 23. El estado de metilación de BRCA1 altera su localización celular.

El HMT sensibiliza los tumores de cáncer de mama a la radioterapia en sistemas *in vivo*.

Para determinar la eficacia antitumoral y antimetastásica de esta actuación terapéutica *in vivo*, utilizamos células 4T1 de ratón que expresan luciferasa como un modelo de cáncer de mama. En comparación con los ratones no tratados, la radioterapia o la HMT por sí solas no redujeron significativamente el crecimiento del tumor, pero si aquellos tratados con la combinación HMT/IR (Figura 24a). Además, los ratones tratados con esta combinación de radio y quimioterapia tuvieron mejores tasas de supervivencia (Figura 24b). Las imágenes de luciferasa mostraron que el 87% de los ratones control presentaban metástasis a distancia (Figura 24c). El tratamiento de los animales con un régimen de radioterapia no redujo la formación de metástasis a distancia; por el contrario, y en comparación con los ratones no tratados, se observó un aumento no significativo en el número de ratones con metástasis. El tratamiento de ratones con HMT redujo la cantidad de ratones con metástasis a distancia en comparación con los grupos de control, pero es importante destacar que se observó una reducción más significativa cuando los animales fueron tratados con una combinación de HMT/IR.

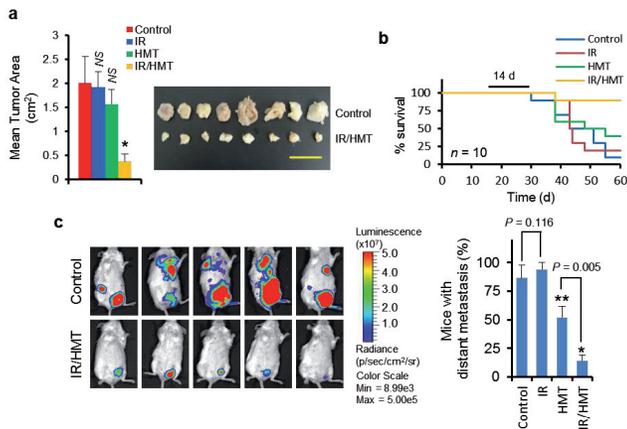


Figura 24. HMT sensibiliza las células de cáncer de mama a la radioterapia *in vivo*.

Nuevos antifolatos derivados de las catequinas del té

El té: composición y propiedades

El té es una de las bebidas más consumidas en todo el mundo, con aproximadamente tres billones de kilogramos producidos y consumidos anualmente. Esta bebida se prepara a partir de la planta *Camellia sinensis* bajo la forma de té verde, negro u oolong principalmente (Khan & Mukhtar, 2007). En las últimas décadas, el té ha despertado la atención de los científicos y de los consumidores debido a sus propiedades beneficiosas para la salud en relación con diversas enfermedades. Estas propiedades beneficiosas se han atribuido a los compuestos polifenólicos que contiene esta planta, en particular a las catequinas, las cuales suponen entre un 15 y un 30% del peso seco de las hojas de la planta (Graham, 1992). Estas catequinas están presentes en mayor cantidad en el té verde que en el negro o el oolong, debido a las diferencias en el procesamiento de las hojas. En el caso del té verde, las hojas frescas de la planta se cuecen al vapor y se secan para inactivar la enzima polifenol oxidasa, un proceso que mantiene esencialmente los polifenoles en sus formas monoméricas. Por otra parte, el té negro se produce mediante una fermentación prolongada de las hojas que da lugar a la formación de polímeros denominados terubiginas y teaflavinas. Entre ambos está el té oolong, que es

un producto parcialmente fermentado que contiene una mezcla de polifenoles monoméricos y teaflavinas de alto peso molecular. Además de estas tres variedades principales, existen otras dos formas de té denominadas té blanco y té rojo. El té blanco se elabora de forma similar al té verde, pero empleando los brotes más tiernos de la planta, por lo que tiene un color verde pálido o blanquecino. La elaboración del té rojo es más similar al té oolong, experimentando una fermentación intermedia. Todas las variedades de té contienen cantidades significativas de cafeína (3-6%) que no se ven afectadas por los métodos de procesamiento (Graham, 1992).

Entre estas variedades, el té verde es el que ha demostrado mayores propiedades beneficiosas para la salud al preservar un mayor contenido en catequinas monoméricas. Estas catequinas son de varios tipos: epicatequina (EC), epicatequina-3-galato (ECG), epigalocatequina (EGC), epigalocatequina-3-galato (EGCG), catequina (C) y galocatequina (GC) (Figura 1.40). La catequina más abundante es el EGCG, la cual supone un 65% del contenido total en catequinas. Una taza de té verde contiene entre 100 y 200 mg de EGCG. La catequina y la galocatequina están presentes en cantidades traza (Graham, 1992). La mayor parte de las propiedades medicinales del té verde se asocian a las epicatequinas, más que a las catequinas.

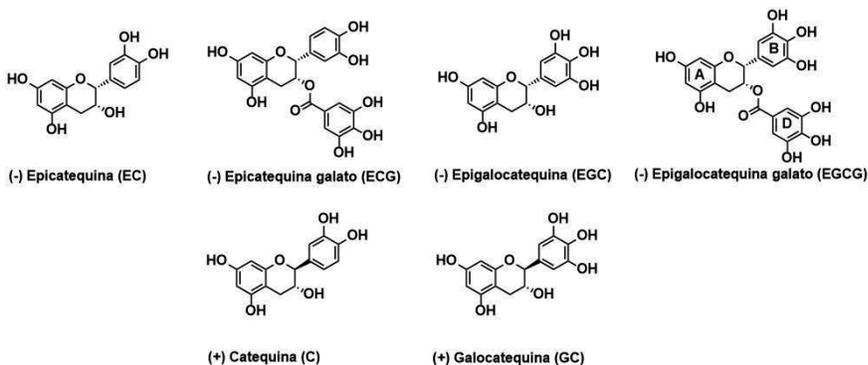


Figura 25. Estructura química de las catequinas del té.

Como hemos dicho anteriormente, el té ha demostrado tener diversas propiedades beneficiosas para la salud. Estos efectos beneficiosos se han relacionado tradicionalmente con las propiedades antioxidantes de las catequinas polifenólicas. Pero, además, se ha descrito que las catequinas del té tienen efectos sobre diversas dianas celulares y moleculares que intervienen en las vías de transducción de señales asociadas con la muerte y la supervivencia celular (Gouni-Berthold & Sachinidis, 2004). A nivel cardiovascular, el té verde previene la formación de placas ateroscleróticas (Chyu *et al.*, 2004) y tiene un efecto hipocolesterolemizante (Yang & Koo, 2000). Entre las patologías asociadas con el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas, el té verde ha demostrado proporcionar una protección significativa frente al desarrollo de Parkinson y de la enfermedad de Alzheimer, así como frente a daños isquémicos (Mandel & Youdim, 2004). El té verde ha demostrado tener efectos antidiabéticos en modelos animales de resistencia a la insulina y además promueve el gasto energético, por lo que se le atribuye un efecto protector frente a la obesidad (Dulloo *et al.*, 1999). El consumo de té también se ha relacionado con un efecto protector frente a varias enfermedades inflamatorias como la artritis, el asma y diversas enfermedades autoinmunes como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn, la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso, el síndrome de Sjögren y la psoriasis, entre otras. Asimismo, diversos estudios han puesto de manifiesto que el té verde presenta propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales (Hamilton-Miller, 2001; Stapleton *et al.*, 2004).

Pero quizás, la cualidad por la que es más conocido el té verde es por sus propiedades anticancerígenas. Diversos estudios epidemiológicos, así como diversos modelos animales, han demostrado que el té verde tiene un efecto protector frente a varios cánceres entre los que están el cáncer de piel, de mama, de próstata y de pulmón. Estos efectos se correlacionan con estudios *in vitro* en los que se ha visto que los extractos de té verde son capaces de

estimular la apoptosis en diversas líneas celulares de cáncer de próstata, linfoma, colon y pulmón, entre otras (Mukhtar & Ahmad, 2000; Yang *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado que té verde y el EGCG inhiben la invasión tumoral, tienen un papel antiangiogénico y antimutagénico, lo cual contribuiría también a la protección frente al cáncer.

Las catequinas del té como antifolatos

A pesar de los esfuerzos realizados en las últimas décadas por comprender la actividad antitumoral del té, hasta hace unos años, todavía no se había descrito el mecanismo exacto por el cual ejerce sus propiedades antiproliferativas. En base a la observación de la similitud existente entre la estructura química de los antifolatos clásicos (como el MTX) y no clásicos (como la tetrahydroquinazolina (TQD) y algunos polifenoles del té, nuestro laboratorio comenzó a trabajar en la hipótesis de que las catequinas del té podrían actuar como inhibidores de la enzima DHFR (Figura 26).

Las catequinas comparten con estos inhibidores la estructura de dos anillos de 6 carbonos fusionados, unidos a un anillo bencénico mediante un enlace que contiene un heteroátomo en la posición 6 del ácido fólico y los antifolatos. Además, el EGCG presenta dos grupos OH fenólicos en la región A equivalentes a las aminas C2 y C4 del ácido fólico y los antifolatos, mediante las cuales se unen al residuo ácido en el centro activo de la enzima (Glu-30 en la DHFR humana). Las regiones B y C presentan una mayor flexibilidad, aunque es importante no modificar la posición de la cadena lateral unida a la posición 6 de los folatos y antifolatos o a la posición 3 de las catequinas, donde se encuentra unido por enlace éster el ácido gálico en las catequinas galato. La región D es la misma en los esteres del gálico de las catequinas y en los antifolatos, sin embargo, la cadena lateral del glutámico (regiones E y F), característica de los antifolatos clásicos, no se encuentra en las catequinas. La mayor diferencia estructural entre las catequinas del té y los antifolatos, reside

en la zona del trihidroxibenceno no unido por enlace éster, la cual no existe en los inhibidores ni en los sustratos de DHFR (Figura 26).

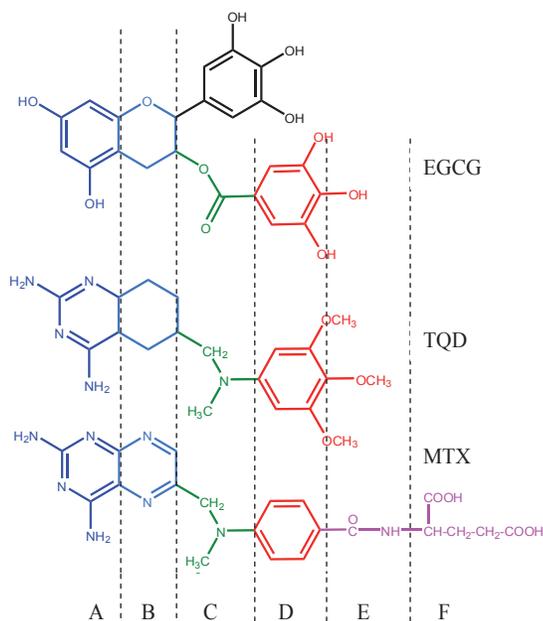


Figura 26. Comparación estructural del EGCG con el MTX (antifolato clásico) y con el TQD (antifolato no clásico).

Trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron que los ésteres galato de las catequinas aisladas del té verde, como el EGCG y el ECG actúan como potentes inhibidores de la enzima DHFR *in vitro* a concentraciones similares a las encontradas en el suero y los tejidos de los bebedores usuales de té verde (0.1-1 μM) (Navarro-Perán *et al.*, 2005b). El EGCG mostró características cinéticas de un inhibidor de unión lenta para la reacción de reducción de DHF por la DHFR de hígado bovino. Sin embargo, mostró características de un inhibidor competitivo y reversible clásico en el caso de la DHFR de hígado de pollo. Estudios de modelaje estructural mostraron que el EGCG se puede unir a la DHFR humana en una orientación similar a la

observada para un gran número de inhibidores (Figura 27) (Navarro Perán *et al.*, 2005a).

Además, se llevaron a cabo experimentos con cultivos celulares para tratar de demostrar los efectos de la inhibición de la DHFR a nivel celular. En estos experimentos, el EGCG demostró tener una actividad antifolato capaz de inhibir el crecimiento de células de linfoma murino (L1210) y de células de adenocarcinoma de colon humano (CACO-2) (Navarro-Perán *et al.*, 2005a).

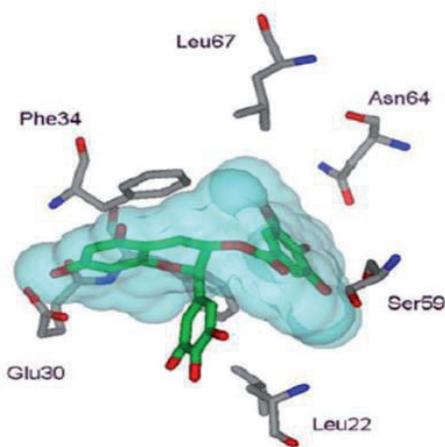


Figura 27. Modelo molecular de la unión del EGCG al sitio de unión del folato en la enzima DHFR humana. Los esqueletos carbonados de la molécula de EGCG y DHFR se muestran en verde y en gris, respectivamente.

Análogos sintéticos de las catequinas: el TMECG

A pesar de las excelentes propiedades de las catequinas del té, éstas presentan una baja disponibilidad *in vivo*, lo que supone una importante limitación (Nakagawa & Miyazawa, 1997). Los factores responsables de esta baja biodisponibilidad podrían estar relacionados con su baja estabilidad en soluciones neutras o ligeramente alcalinas y con su incapacidad de atravesar membranas (Hong *et al.*, 2002). En un intento por solucionar estos problemas de biodisponibilidad, nuestro laboratorio sintetizó un análogo del ECG, el 3-O-

(3,4,5-trimetoxibenzoil)-(-)-epicatequina o TMECG (Sánchez-del-Campo *et al.*, 2008).

El TMECG como una prodroga activada por tirosinasa en melanoma

Cuando se comparó la actividad antiproliferativa del TMECG sobre varias líneas celulares, se comprobó que este compuesto tenía una actividad mucho mayor sobre células de melanoma que sobre melanocitos normales y sobre líneas celulares de otros cánceres epiteliales como el cáncer de mama, de pulmón y de colon (Sánchez-del-Campo *et al.*, 2008; Sánchez-del-Campo *et al.*, 2009b). A continuación, nuestro grupo de investigación se centró en desvelar la causa de la elevada actividad del TMECG sobre las células de melanoma. Una de las diferencias más llamativas entre las células de melanoma y otras células epiteliales es que las primeras poseen el enzima tirosinasa, que es una fenol oxidasa que cataliza las reacciones clave en la ruta de síntesis de melaninas. Por tanto, nuestro grupo se planteó estudiar si la citotoxicidad del TMECG frente al melanoma podía estar mediada por una activación celular del TMECG catalizada por la enzima tirosinasa. Los resultados mostraron que, efectivamente, la tirosinasa oxidaba al TMECG a su correspondiente o-quinona, la cual rápidamente evolucionaba a través de una serie de reacciones químicas a una quinona metide (QM), la cual mostraba una elevada estabilidad en un amplio rango de pH (Figura 28). El TMECG-QM resultó ser un potente inhibidor irreversible de la DHFR humana, por lo que la gran actividad de este compuesto sobre las células de melanoma podía ser explicada por la gran estabilidad de esta quinona metide generada por la activación catalizada por la tirosinasa (Sánchez-del-Campo *et al.*, 2009b). Para explicar la irreversibilidad de la unión del TMECG-QM a la DHFR humana se llevaron a cabo experimentos de modelaje molecular *in silico*. El TMECG resultó unirse a la DHFR de un modo similar al descrito para el EGCG (Navarro Perán *et al.*, 2005a) con puentes de hidrógeno específicos que implicaban al Glu-30 del centro activo (Figura 29a). Sin embargo, la estructura abierta de la

QM aumenta su flexibilidad molecular y adopta una conformación diferente en el centro activo de la DHFR humana (Figura 9B). La QM mantiene el puente de hidrógeno con la cadena lateral del Glu-30, pero además establece tres nuevas interacciones. El otro grupo fenólico del anillo A forma un puente de hidrógeno con el residuo Ile-7, mientras que los otros dos puentes de hidrógeno se establecen entre dos oxígenos de los grupos metoxi del anillo D y los residuos Ser-59 e Ile-60. La irreversibilidad del complejo DHFR-TMECG-QM vendría explicada por la fuerte interacción entre la quinona metide y los distintos residuos de la proteína.

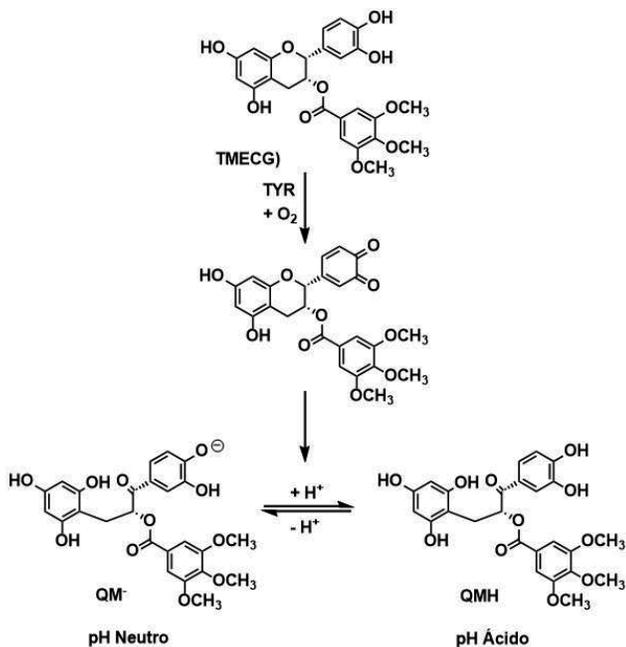


Figura 28. Esquema de la reacción de oxidación del TMECG por la enzima tirosinasa y de la formación de quinona metide.

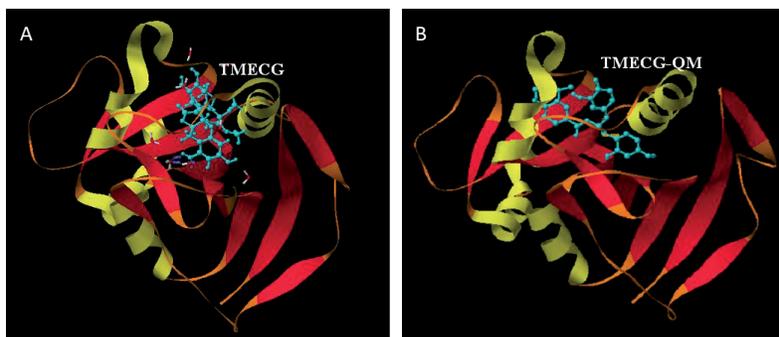


Figura 29. Modelo molecular de la unión del TMECG(A) y de la TMECG-QM (B) a la enzima DHFR humana

Las prodrogas son compuestos que necesitan ser transformados para mostrar su actividad farmacológica y, generalmente, se clasifican en dos grupos: aquellas diseñadas para aumentar su biodisponibilidad y mejorar sus propiedades farmacocinéticas y aquellas diseñadas para ejercer sus propiedades antitumorales de forma local (Rooseboom *et al.*, 2004). Por tanto, el TMECG puede ser considerado como una prodroga contra el melanoma dado que muestra ambas características. Por una parte, la terapia con TMECG incrementaría su biodisponibilidad y podría alcanzar concentraciones elevadas en melanoma. Pero, además, el suave efecto antifolato de la prodroga (TMECG), su activación específica a TMECG-QM en las células de melanoma y el hecho de que los antifolatos son mucho más activos en células cancerígenas que se dividen rápidamente que en células normales, hacen que este compuesto sea ideal para el tratamiento de esta patología.

Actividad del TMECG en líneas celulares y modelos animales de melanoma

Experimentos de tratamiento de diversas líneas celulares de melanoma con TMECG a distintas concentraciones durante 7 días demostraron que este compuesto es capaz de inducir la apoptosis en células de melanoma (Sánchez-del-Campo & Rodríguez-López, 2008). Sin embargo, los melanocitos normales resultaron ser altamente resistentes a la apoptosis

inducida por TMECG, lo que supone una gran ventaja de este agente antitumoral al reducirse los efectos sobre células sanas. Además, se estudió la actividad farmacológica del TMECG in vivo sobre melanomas inducidos por inyección subcutánea de células B16/F10 en ratones singénicos C57/B16. Los resultados mostraron que el tratamiento con TMECG lograba aumentar la supervivencia global respecto al grupo control. Además, el tratamiento con TMECG conseguía reducir tanto el crecimiento de los tumores primarios como el desarrollo de metástasis.

Mecanismo de acción del TMECG en melanoma

Dada la naturaleza hidrofóbica del TMECG, el mecanismo más probable de entrada en la célula es mediante difusión pasiva a través de la membrana plasmática a favor de gradiente de concentración (Figura 30). Esta independencia de transportadores de folato para su entrada, implicaría que el TMECG podría evitar los mecanismos de resistencia mediados por los sistemas de transporte (Ma et al., 2000). De hecho, se comprobó que el tratamiento con TMECG provocaba una disminución en los niveles de RFC, lo que suponía una importante ventaja para su efecto antiproliferativo al reducir el pool intracelular de folato y, con ello, la competencia con los folatos naturales por la diana DHFR. Una vez en el interior celular, el transporte al interior del melanosoma a favor de gradiente facilitaría la oxidación por tirosinasa y su activación a TMECG-QM. Experimentos realizados en nuestro laboratorio demostraron que el TMECG-QM no interacciona con las melaninas, lo que evitaría el atrapamiento melanosomal. Dado el bajo pH de este orgánulo, la forma predominante sería la QMH, la cual, dada su gran estabilidad y la ausencia de carga formal, podría salir del melanosoma al citosol (Figura 30).

Bajo las condiciones de pH ligeramente básico del citosol, la forma aniónica de la QM sería la forma predominante, por lo que este compuesto quedaría atrapado en el citosol de la célula debido a esta carga negativa. Este mecanismo de retención representaría una ventaja respecto a aquellos

antifolatos que necesitan ser poliglucosaminados para ser retenidos intracelularmente. Una vez en el citosol, TMECG-QM actuaría inhibiendo a la DHFR.

El hecho de que la tirosinasa esté altamente expresada en células de melanoma en comparación con los melanocitos normales, podría influir en el grado, la especificidad y la duración del efecto antifolato del TMECG-QM. Finalmente, los datos de la efectividad del TMECG en modelos de melanoma de ratón confirman la biodisponibilidad del TMECG para las células tumorales y evita, no solo los mecanismos de resistencia del melanoma a los antifolatos, sino que además los mecanismos relacionados con la activación corporal de la droga.

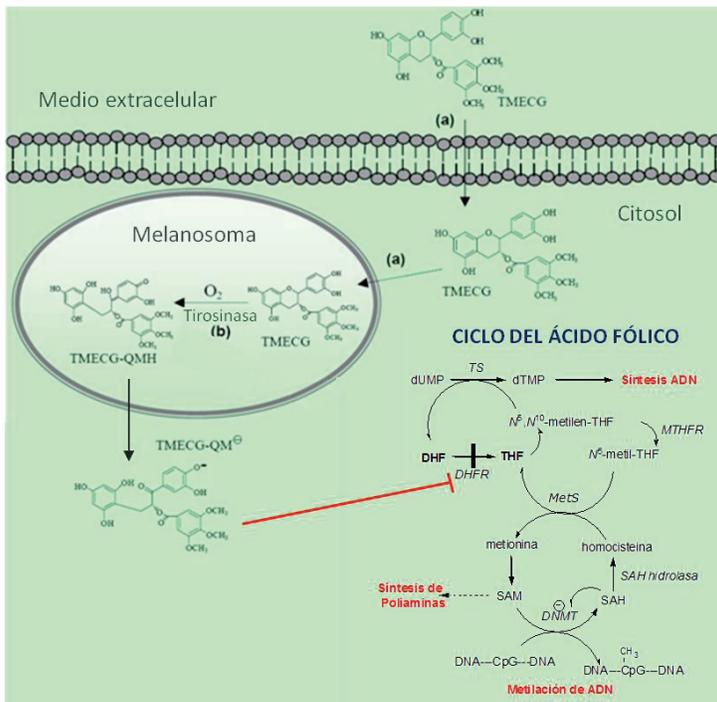


Figura 30. Esquema del mecanismo de acción del TMECG en células de melanoma.

Cómo convertir la resistencia al metotrexato en el talón de Aquiles del melanoma

Melanoma

El melanoma es una neoplasia que tiene su origen en los melanocitos que son las células responsables de dar coloración a la piel, el pelo y los ojos gracias a que producen un pigmento denominado melanina. El melanoma afecta a la piel en el 90% de los casos, pero también puede originarse a partir de melanocitos no cutáneos localizados en la coroides del ojo, las leptomeninges y los tractos genitourinario y gastrointestinal. Tiene una gran capacidad para metastatizar y, a pesar de ser menos frecuente que los cánceres de piel de tipo no melanoma, es el responsable del 75% de las muertes por cáncer de piel. El diagnóstico temprano es particularmente importante ya que la supervivencia disminuye de manera drástica a medida que el tumor profundiza en la dermis.

Melanocitos y melanoma

El melanoma cutáneo se origina por la proliferación incontrolada de los melanocitos epidérmicos que son las células responsables de dar coloración a la piel y protegerla de la luz ultravioleta (UV). Esta función la cumplen gracias

a su capacidad de sintetizar y almacenar melanina en unos orgánulos especiales denominados melanosomas. En la piel, los melanocitos se distribuyen en la membrana basal, situada entre la epidermis y la dermis (Figura 31), desde donde transfieren los melanosomas a los queratinocitos circundantes mediante un mecanismo de transporte que ocurre a nivel de sus dendritas.

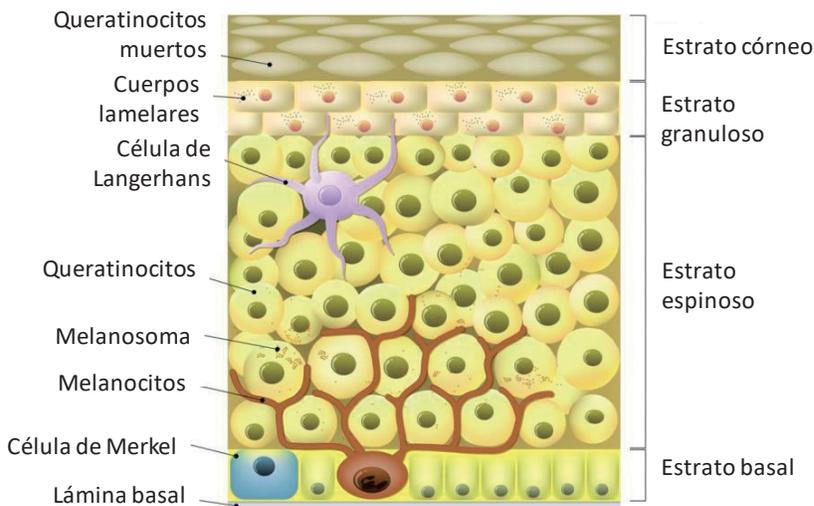


Figura 31. Esquema de los estratos de la epidermis y las distintas células presentes en cada uno de ellos.

Cuando la piel se expone a la luz UV, los queratinocitos estimulan a los melanocitos a producir melanina. La capacidad de los queratinocitos para estimular la producción de pigmento es consecuencia del daño en el ADN causado por la luz UV, que induce la estabilización de la proteína supresora de tumores p53. Ésta induce la expresión de la proopiomelanocortina (POMC) que es fragmentada para producir la hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH, acrónimo del inglés *melanocyte stimulating hormone*) que es liberada por los queratinocitos (Cui *et al.*, 2007). La α -MSH estimula a los melanocitos a través de su unión al receptor de melanocortina 1 (MC1R). Este receptor es altamente polimórfico y existen variantes que no desencadenan señalización

intracelular que son responsables del fenotipo de cabello pelirrojo y piel clara (Valverde *et al.*, 1995). La activación de MC1R conduce a la elevación de los niveles de AMPc en los melanocitos que induce un aumento de la expresión del factor de transcripción MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor*) que, a su vez, induce la expresión de los genes responsables de la síntesis de melanina y la biogénesis de melanosomas. La melanina sintetizada es empaquetada en los melanosomas y transportada hacia los queratinocitos que disponen estos melanosomas alrededor de su núcleo para proteger a su ADN de la luz UV (Figura 32) (Garibyan y Fisher, 2010).

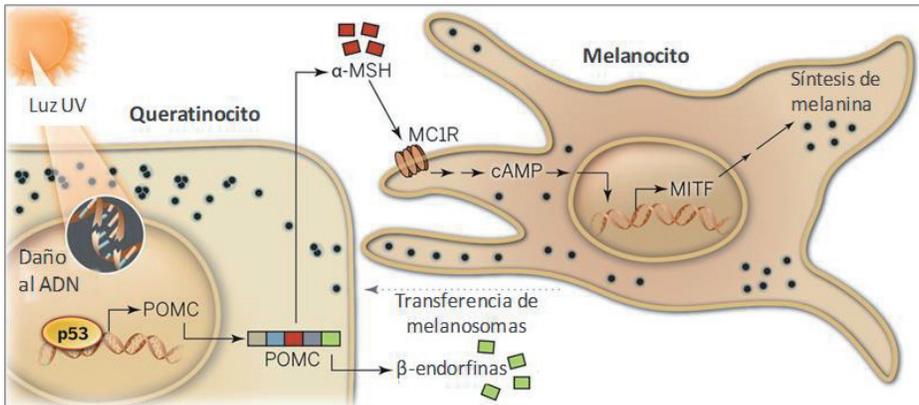


Figura 32. Mecanismo de estimulación de la síntesis de melanina por los melanocitos ante la radiación UV.

Patogénesis del melanoma

Se piensa que el melanoma se desarrolla según un modelo de progresión secuencial que comenzaría con una proliferación aberrante de los melanocitos debido a alguna alteración genética, presumiblemente causada por la radiación UV, que daría lugar a los nevi o lunares. Éstos son lesiones hiperplásicas benignas consistentes en una población clonal de melanocitos que no progresan gracias a los mecanismos de senescencia celular. Si continúan acumulándose alteraciones genéticas, los nevi pueden sobrepasar

estos mecanismos de senescencia, se vuelven displásicos y pueden progresar a una fase de crecimiento radial (RGP) en la que se produce una extensión superficial de los melanocitos confinada a la epidermis y con bajo potencial invasivo. Finalmente, las células pasan a una fase de crecimiento vertical (VGP), en la que adquieren la capacidad de invadir la dermis y alcanzar vasos sanguíneos o linfáticos para metastatizar, preferentemente a hígado, pulmón y cerebro (Figura 33).

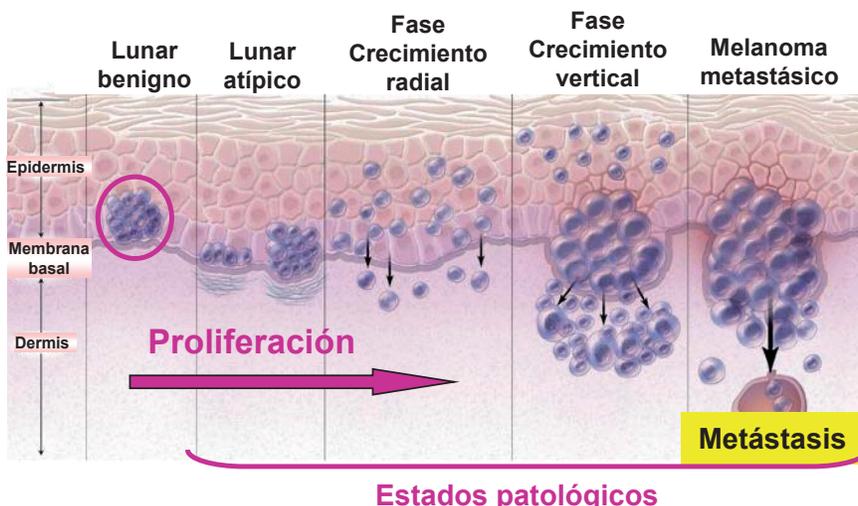


Figura 33. Esquema del modelo de desarrollo y progresión secuencial del melanoma.

Diagnóstico del melanoma

La detección y la extirpación quirúrgica del melanoma en las fases tempranas de su evolución biológica son determinantes para la supervivencia de los pacientes. La mayoría de las lesiones tempranas y algunos melanomas en estadios más avanzados pueden ser identificados empleando la regla ABCDE. Según este criterio, los melanomas son **A**simétricos (no pueden dividirse en dos mitades iguales), tienen **B**ordes irregulares, muestran un **C**olor

no homogéneo, su **D**ímetro suele ser superior a 6 mm y su **E**volución cambia con el tiempo (Abbasi *et al.*, 2004) (Figura 34).

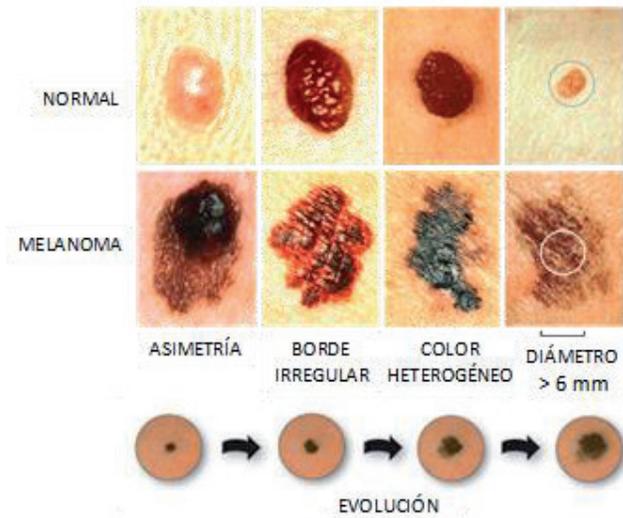


Figura 34. Regla ABCDE para el diagnóstico del melanoma.

Melanoma: un cáncer altamente resistente a las terapias convencionales

El melanoma es la forma más agresiva de cáncer de piel y es resistente a todas las modalidades de terapia anticancerígena disponibles en la actualidad, incluyendo inmunoterapia, radioterapia y quimioterapia (Soengas y Lowe, 2003). A día de hoy, el único tratamiento efectivo es la escisión quirúrgica de las lesiones tempranas, que tiene una tasa de éxito del 95% en estadios I/II y logra aumentar la supervivencia a largo plazo de los pacientes con afectación ganglionar (estadio III) (Balch *et al.*, 2001). A pesar de la multitud de ensayos

clínicos encaminados a probar una amplia variedad de estrategias contra el melanoma, la supervivencia media de esta enfermedad en estadio IV sigue siendo de 6 a 10 meses (Jemal *et al.*, 2002). Desafortunadamente, las lesiones de melanoma pueden permanecer asintomáticas por largos periodos de tiempo e incluso debutar en estadio IV (metastásico) sin una lesión primaria identificable.

Un hecho que ha desconcertado tanto a los científicos básicos como a los clínicos durante décadas es que las células de melanoma adquieren simultáneamente la capacidad de escapar a los mecanismos de vigilancia del sistema inmune y de evadir la acción de diversos agentes citotóxicos que causan, por ejemplo, daño al ADN, desestabilización de microtúbulos o inhibición de la topoisomerasa. De hecho, tras la quimioterapia, raramente experimentan respuestas completas más de un 20% de los pacientes y el término “remisión” es prácticamente inexistente en melanoma. Por tanto, se piensa que en este tipo de tumor, la resistencia no se produciría como consecuencia de la adquisición de alteraciones genéticas durante o después de la terapia, sino que sería una capacidad inherente al comportamiento maligno de las células de melanoma ya presente al diagnóstico. Diversos estudios genéticos, funcionales y bioquímicos apoyan la hipótesis de que las células de melanoma “nacen para sobrevivir” y que su comportamiento agresivo provendría de las características intrínsecas de sus precursores, los melanocitos. De hecho, mientras que la mayoría de las células responden a la radiación ionizante muriendo o parando su ciclo celular para intentar reparar el daño inducido en el ADN, los melanocitos se activan para secretar melanina y proteger a los queratinocitos y a las demás células de la epidermis de estos daños. Estas características intrínsecas de supervivencia se verían aumentadas por alteraciones adicionales adquiridas durante la progresión tumoral (Soengas y Lowe, 2003).

Mecanismos de resistencia específico del melanoma al metotrexato

Recientemente se ha descrito un mecanismo de resistencia del melanoma frente a diversas drogas citotóxicas, incluido el MTX (Chen *et al.*, 2006; Sánchez-del-Campo *et al.*, 2009a; Xie *et al.*, 2009). Trabajos realizados por nuestro grupo y por otros grupos de investigación han proporcionado evidencias de que los melanosomas contribuyen a la resistencia del melanoma a diversas drogas citotóxicas gracias a que estos orgánulos secuestran estos fármacos y median su exportación. Concretamente, nuestro grupo de investigación describió que la endocitosis de MTX mediada por el FR- α facilitaba el secuestro de esta droga en los melanosomas y su expulsión al exterior celular, lo que reducía la acumulación intracelular de MTX (Figura 35) (Sánchez-del-Campo *et al.*, 2009a). Estos resultados sugieren que el MTX activa la maquinaria responsable de la biogénesis y el transporte de los melanosomas, pero el mecanismo por el cual esta droga controla estos procesos celulares es desconocido. En nuestro grupo nos hemos centrado en descifrar las bases moleculares de este mecanismo de resistencia con el objetivo de diseñar estrategias terapéuticas dirigidas contra dianas moleculares clave en el proceso para lograr evadir la resistencia del melanoma al MTX.

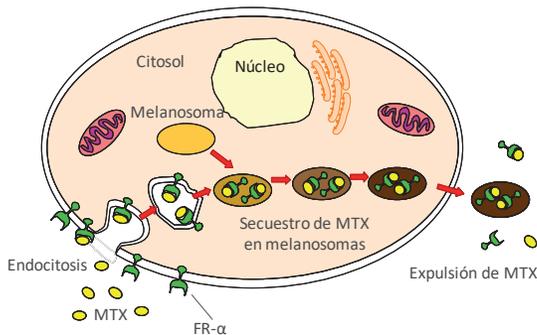


Figura 35. Mecanismo de resistencia del melanoma al MTX mediante su secuestro en melanosomas. La endocitosis mediada por el FR- α conduce al secuestro del MTX en los melanosomas y a su expulsión al exterior celular.

Implicaciones de la expulsión de MTX sobre la división celular y el metabolismo del ácido fólico

Los trabajos realizados por nuestro grupo de investigación (Sánchez-del-Campo *et al.*, 2009a) pusieron de manifiesto que las células de melanoma eran resistentes a la apoptosis inducida por MTX, pero respondían a esta droga parando su crecimiento. Por tanto, la baja acumulación de MTX intracelular provocada por la expulsión de la droga hacía que este fármaco se comportara como citoestático en lugar de citotóxico sobre las células de melanoma. Un efecto citoestático similar se observó al hacer crecer células de melanoma murino B16-F10 en un medio bajo en fólico. Estos resultados sugerían que el MTX podría inducir una depleción de coenzimas reducidos del folato, reduciendo su transporte a través del FR- α y compitiendo con ellos por el transporte mediado por el RFC. Las células de melanoma podrían ser muy sensibles a la depleción intracelular de los coenzimas del ácido fólico y, en esta situación, podrían entrar en un estado latente. Esta forma de melanoma sería altamente resistente al MTX, dado que la mayor efectividad de los antifolatos se produce sobre células que se están dividiendo activamente y que, por tanto, necesitan sintetizar ADN continuamente. Además, la sobreexpresión de DHFR observada en células tratadas con MTX (Kufe *et al.*, 1980) podría representar un mecanismo adaptativo que les permitiría sobrevivir a una baja concentración intracelular de folato. Al facilitar el reciclaje de las coenzimas reducidas del ácido fólico podrían mantener otras funciones celulares dependientes de estas biomoléculas. Esta forma latente de melanoma sería crítica para la resistencia al MTX *in vivo* ya que, aunque la quimioterapia con MTX podría inicialmente detener el desarrollo del tumor, las células de melanoma podrían reiniciar su crecimiento tras el aclaramiento de la droga del cuerpo del paciente (Branda *et al.*, 1988). De hecho, experimentos *in vitro* realizados en nuestro laboratorio demostraron que la eliminación del MTX del medio de cultivo permitía la reanudación del crecimiento de células de

melanoma que habían parado su crecimiento tras varios días de tratamiento con MTX (Sánchez-del-Campo *et al.*, 2009a).

¿Cómo es capaz el MTX de orquestar su propia expulsión celular?

Los melanocitos se originan a partir de células precursoras no pigmentadas derivadas de la cresta neural denominadas melanoblastos que, durante el desarrollo embrionario, migran hacia determinadas localizaciones en el ojo, el oído interno, la epidermis y los folículos pilosos, donde se diferencian hacia melanocitos maduros. Éstos se caracterizan principalmente por su aspecto dendrítico y su capacidad de sintetizar y almacenar melanina en los melanosomas, así como de exportarlos hacia los queratinocitos circundantes (Figura 36) (Ibrahim y Haluska, 2009).

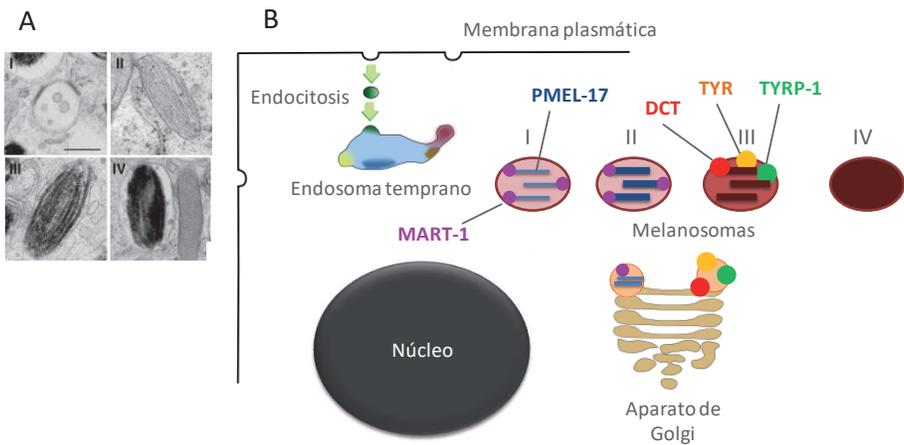


Figura 36. (A) Micrografía electrónica de transmisión de melanosomas en los distintos estadios de maduración (I-IV). (B) Esquema del proceso de formación y maduración de los melanosomas a partir de endosomas tempranos, indicando los elementos que se incorporan en cada estadio del proceso madurativo.

El punto crítico que compromete a estos precursores pluripotentes para su diferenciación hacia el linaje melanocítico es la activación de la expresión del factor de transcripción MITF (Goding, 2000). De hecho, diversos estudios han demostrado que la expresión de MITF en células madre embrionarias es suficiente para inducir su diferenciación hacia melanocitos. Se trata de uno de

los principales marcadores específicos del linaje melanocítico (Goding, 2000) que, además de regular el proceso de diferenciación, actúa como un modulador clave de la supervivencia y la proliferación de los melanocitos (Widlund y Fisher, 2003).

Dado que MITF parecía ser un punto clave en la diferenciación melanocítica, nos planteamos averiguar si este factor de transcripción podría estar implicado en el mecanismo de resistencia del melanoma al MTX descrito por nuestro grupo de investigación. Estudios realizados en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que el tratamiento con MTX inducía fuertemente la expresión del factor de transcripción MITF en células de melanoma, el cuál iniciaba el programa de diferenciación melanocítica gracias a la activación de la expresión de genes que codifican: (a) proteínas estructurales de los melanosomas (como PMEL-17 y MART-1), a los que iría a parar el MTX tras ser endocitado; (b) enzimas implicadas en la síntesis de melaninas (como TYR y TYRP-1), que interaccionarían con el MTX secuestrándolo en el interior del melanosoma y (c) proteínas implicadas en el transporte de melanosomas al exterior celular (como RAB-27a), que conducirían a la expulsión del MTX incluido en el interior de los melanosomas.

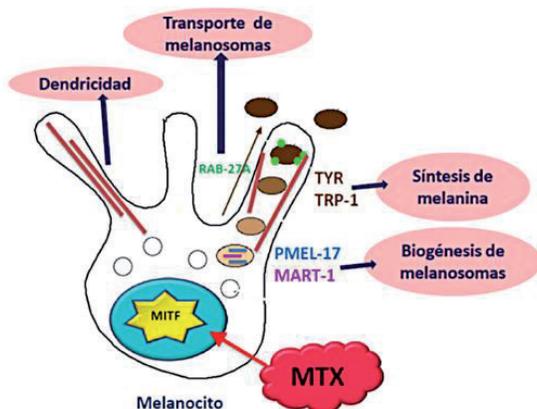


Figura 37. El MTX orquesta su propia expulsión a través de la inducción del factor de transcripción MITF

Por tanto, la inducción de dicho factor de transcripción por el MTX era responsable de la puesta en marcha de la biogénesis y exportación de melanosomas y, por ende, del mecanismo de resistencia descrito anteriormente por el que el MTX es secuestrado en los melanosomas y exportado al exterior celular (Figura 37) (Sáez-Ayala et al., 2013)

El factor de transcripción MITF como regulador clave de la heterogeneidad celular en el melanoma

Como en el caso de otros tumores, en el interior de un melanoma coexisten distintas sub-poblaciones de células cancerígenas que muestran distintas propiedades biológicas y distinto grado de diferenciación. Algunas de estas células podrían exhibir rasgos de diferenciación, otras podrían mostrar mayor capacidad proliferativa y solo unos pocos clones de células más indiferenciadas presentarían propiedades similares a las de las células madre (Visvader y Lindeman, 2008). Éstas últimas son las denominadas “*cancer stem cells* (CSC)” o “células madre del cáncer” que tendrían capacidad tanto de auto-renovación para mantener el pool de células madre del cáncer, como de diferenciación para dar lugar a toda una progenie de células tumorales. Los últimos estudios apuntan a que serían éstas las responsables de la iniciación y el mantenimiento del tumor, así como de las metástasis y las recaídas tras remisiones logradas con la quimioterapia (Menea *et al.*, 2009) (Figura 38).

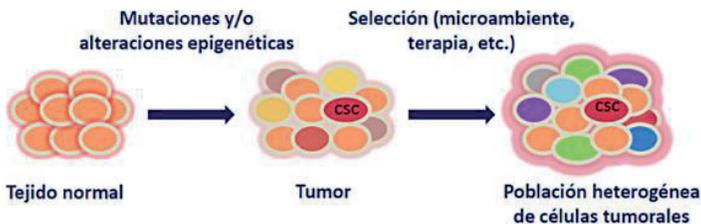


Figura 38. Modelo de heterogeneidad tumoral.

En melanoma, la identidad de las distintas subpoblaciones de células tumorales viene determinada por los niveles de expresión de MITF (Carreira et

al., 2006; Cheli *et al.*, 2011). De esta manera, aquellas células con baja expresión de MITF muestran propiedades de célula madre, tienen gran capacidad de iniciar tumores y son altamente invasivas (Carreira *et al.*, 2006; Cheli *et al.*, 2011). Por el contrario, aquellas células con elevada expresión de MITF presentan un bajo potencial invasivo y expresan genes de diferenciación que conducen a la producción de melanina y a la biogénesis y transporte de melanosomas (Cheli *et al.*, 2011). Entre ambas estarían aquellas células con niveles de expresión intermedios que serían las que tendrían capacidad proliferativa (Figura 39).

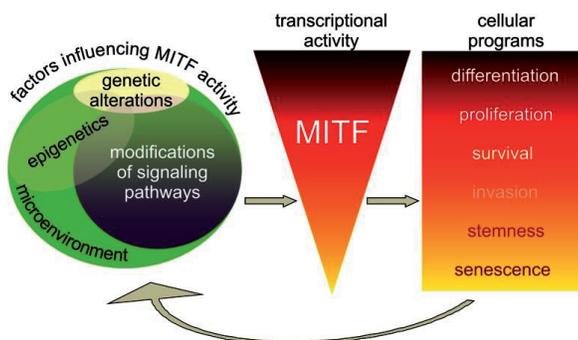


Figura 39. MITF y la plasticidad celular en melanoma.

Terapias epigenéticas dirigidas contra la plasticidad celular del melanoma

El descubrimiento, por parte de nuestro grupo (Sánchez-del-Campo *et al.*, 2009a) de las bases moleculares de este mecanismo de resistencia ha abierto el camino al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas contra dianas moleculares implicadas en el proceso, tales como proteínas implicadas en el transporte de los melanosomas o enzimas implicadas en la síntesis de melanina. Pero lo más importante de este descubrimiento es que el tratamiento con MTX, al inducir la diferenciación de las células de melanoma, supone una

herramienta para reducir la heterogeneidad existente en el tumor al conducir a todas las células tumorales a un fenotipo común, sensible a otras terapias dirigidas específicamente contra células más diferenciada

Puesto que los melanomas suponen una mezcla de células con distintos niveles de expresión de MITF, la inducción de la expresión de este factor de transcripción por el tratamiento con MTX conseguiría reducir la heterogeneidad celular existente en el tumor y, con ella, la probabilidad de que existan en el tumor células capaces de eludir terapias dirigidas contra dianas moleculares concretas. Además, esta terapia eliminaría aquellas células que expresan bajos niveles de MITF y muestran un fenotipo de células madre que son altamente invasivas (Sáez-Ayala *et al.*, 2013) (Figura 40).

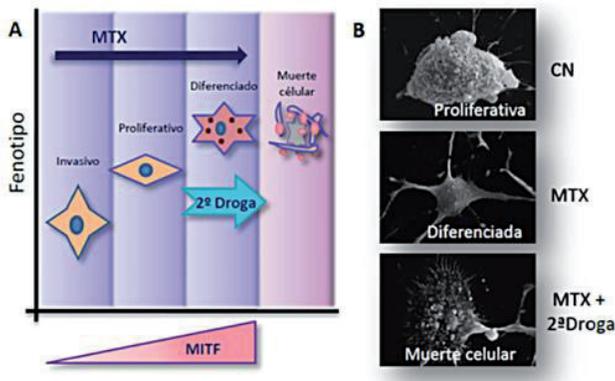


Figura 40. Regulación de la plasticidad celular en melanoma por los niveles de MITF y estrategias en dos etapas para la terapia del melanoma.

Siguiendo la estrategia similar a la descrita en la Figura 40, nuestro grupo de investigación ha realizado varias terapias experimentales en colaboración con grupos internacionales de referencia en la oncología molecular y clínica del melanoma que fueron publicadas en revistas de alto índice de impacto (Sáez-Ayala *et al.*, 2013; Chauvistré *et al.*, 2022).

“Directed phenotype switching as an effective antimelanoma strategy” (Sáez-Ayala et al., 2013). Cancer Cell 24:105.

Dada la gran resistencia del melanoma frente a todas las terapias clásicamente utilizadas y la escasa efectividad de las nuevas terapias dirigidas frente a dianas moleculares específicas, en nuestro laboratorio decidimos emplear un enfoque diferente. En lugar de descartar una droga como el MTX para la que se sabía desde hacía décadas que el melanoma es resistente, intentamos descifrar las bases moleculares del mecanismo de resistencia para identificar dianas terapéuticas a las que dirigir un segundo fármaco para intentar evadir dicha resistencia. En este caso, el segundo fármaco se trataba del TMECG, sintetizado en nuestro laboratorio. Esta terapia fue fruto de la intensa y duradera colaboración que llevamos a cabo con el Prof. Colin Godin en el Ludwig Institute for Cancer Research, en la Universidad de Oxford. Algunos de los resultados de este estudio se muestran en la Figura 41.

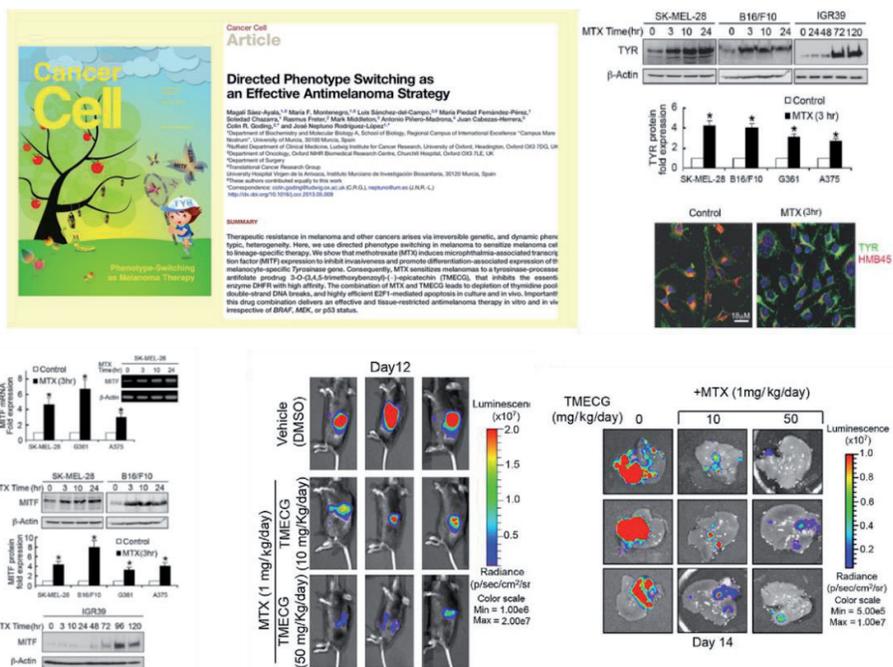


Figura 41. Portada, publicación y resultados de una estrategia combinada MTX/TMECG para el tratamiento del melanoma (Sáez-Ayala et al., 2013).

“Persist state-directed transitioning and vulnerability in melanoma” (Chauvistré et al., 2022). Nature Communications 13:3055.

El TMECG también fue incluido en una nueva terapia epigenética diseñada en colaboración con el Dr. Alexander Roesch del Departamento de Dermatología del Hospital Universitario de Essen en Alemania. En este estudio observamos que la expresión de KDM5B, una desmetilasa específica de lisina, también conocida como histona desmetilasa JARID1B, dirige a las células de melanoma hacia la diferenciación celular. Además, el tratamiento con Cpd1 (un activador de KDM5B) era capaz de estabilizar MITF y promover la expresión de tirosinasa; así, Cpd1 sensibilizaba específicamente a las células de melanoma contra el profármaco antifolato TMECG (Figura 42). En conjunto, los resultados indicaron que los factores que alteran los patrones de metilación de proteínas en el melanoma podrían manipularse para evitar la heterogeneidad de las células del melanoma y dirigir las células del melanoma hacia fenotipos más sensibles a los fármacos.



ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-022-30648-9>

OPEN

Persist state-directed transitioning and vulnerability in melanoma

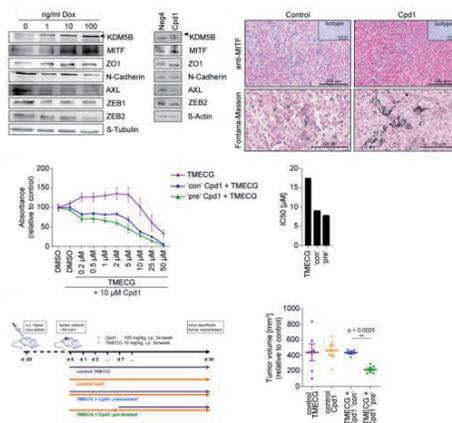
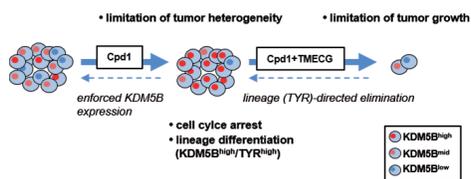


Figura 42. Portada, publicación y resultados de una estrategia combinada Cpd1/TMECG para el tratamiento del melanoma (Chauvistré et al., 2022).

Perspectivas de futuro: Epigenética y algo más...

Nuestro grupo es consciente de que la lucha contra el cáncer es larga y que las mejoras en sus tratamientos no vendrán desde una única aproximación experimental. En esta lucha cabe todo el mundo, desde aquellos que deciden llevar una vida más alejada de los posibles riesgos inductores del cáncer, como aquellos profesionales que dedican su vida a la investigación y a la cura de esta enfermedad. De vital importancia son, también, todas aquellas instituciones, empresas y organizaciones con y sin ánimo de lucro que ponen a disposición de hospitales y centros de investigación el capital y material necesario para seguir adelante. En todo caso, no debemos olvidar que el objetivo último de la oncología médica no es otro que el de mejorar la calidad de vida y supervivencia de los pacientes con cáncer y generar un impacto positivo en el bienestar de nuestra sociedad.

En este sentido, nuestro grupo de investigación sigue trabajando en varios aspectos relacionados con el cáncer. Además de seguir apostando por la epigenética (Montenegro et al., 2023), que a nivel científico nos ha dado muchas satisfacciones, el grupo también ha dado sus primeros pasos para entender la inmunología del cáncer y, hace apenas unos años, resolvimos el

mecanismo por el que el melanoma escapa a la respuesta inmune innata de nuestro organismo, es decir, aquella mediada por los Natural Killers (NKs) (Sánchez-del-Campo *et al.*, 2021) (Figuras 43 y 44). También, y en estrecha colaboración con el Dr. Cabezas-Herrera, estamos trabajando en el desarrollo de una terapia celular innovadora utilizando células manipuladas *ex vivo* como una vacuna contra el cáncer. Estos estudios están muy avanzados en modelos de cáncer de mama y melanoma.

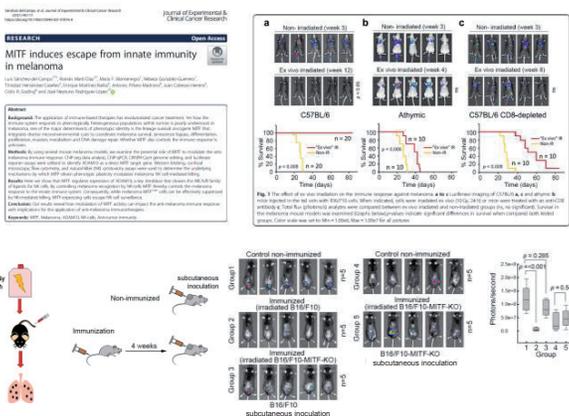


Figura 43. Publicación y resultados sobre el papel de MITF en la inmunología del melanoma (Sánchez-del-Campo *et al.*, 2021).

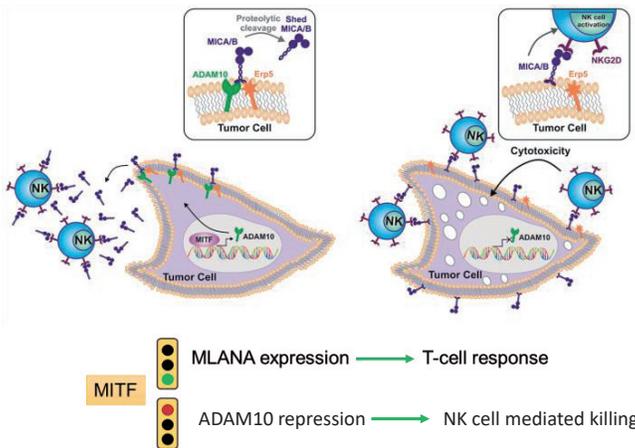


Figura 44. Mecanismo propuesto por el cual MITF induce el escape de la inmunidad innata en el melanoma (Sánchez-del-Campo *et al.*, 2021).

Además, nuestro grupo ha apostado siempre por la transferencia de tecnología y es este sentido hace ya más de cinco años que estamos colaborando con la empresa IDP Pharma. Esta empresa biotecnológica dispone de una plataforma (Intrametics™) única para bloquear a unas proteínas denominadas intrínsecamente desordenadas (IDP, del inglés *Intrinsically Disordered Proteins*) (Figura 45). Estas proteínas, muchas de ellas factores de transcripción fundamentales en el desarrollo de enfermedades, carecen de una estructura definida y son invisibles a la difracción de rayos X. Entre ellas, podemos encontrar al factor inducido por hipoxia (HIF) o factores claves para el desarrollo del melanoma como MITF.



Figura 45. Las proteínas intrínsecamente desestructuradas o desordenadas (IDP) son proteínas que se caracterizan por su falta de estructura terciaria estable cuando está en forma de cadena peptídica aislada bajo condiciones fisiológicas in vitro. Estas proteínas han sido llamadas proteínas invisibles y se ha considerado, hasta hace poco, que no podían ser inhibidas por una droga.

Recientemente, la Agencia Española del Medicamento (AEMPS) ha autorizado un ensayo clínico para mieloma múltiple, el segundo cáncer más

común de la sangre, utilizando IDP-121 (Figura 46). Este fármaco, desarrollado por IDP Pharma, inhibe la actividad de C-MYC, una oncoproteína implicada en el inicio y la progresión de algunos tipos de cáncer. El ensayo involucrará a varios centros de excelencia en investigación clínica, entre los que se encuentra el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia. El ensayo en este hospital estará a cargo del Dr. Valentín Cabañas del Servicio de Hematología y Hemoterapia. Además de participar en el estudio pre-clínico del IDP-121, nuestras investigaciones han servido para descubrir fármacos dirigidos al tratamiento de enfermedades respiratorias y oftalmológicas y que están siendo desarrollados por farmacéuticas europeas y norteamericanas.

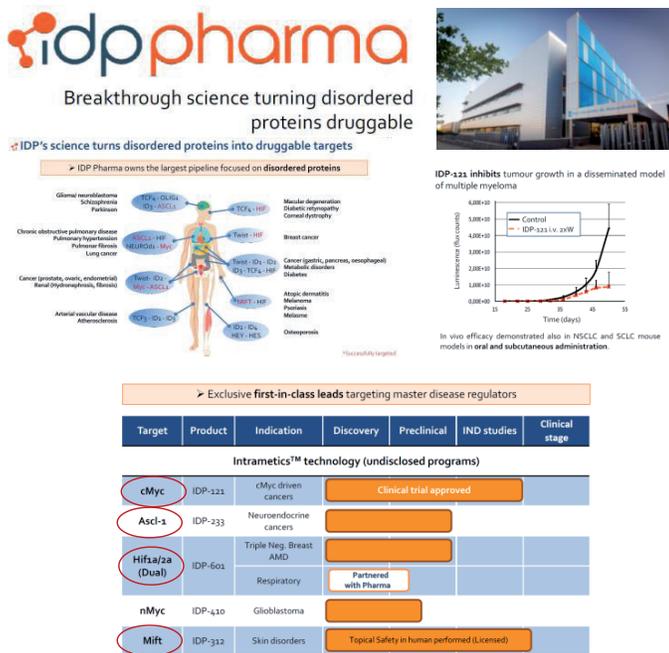


Figura 46. Nuestro grupo ha colaborado o está colaborando con IDP Pharma en varios proyectos (enmarcados en rojo) que implican la inhibición de ciertos factores de transcripción importantes en el desarrollo del cáncer y otras enfermedades.

Permítanme terminar agradeciendo, de nuevo a todo el equipo de investigación que de forma conjunta hemos trabajado en la Universidad de Murcia y el IMIB, para llevar a cabo esta investigación. Gracias a Juan Cabezas, Fernanda Montenegro, Luis Sánchez del Campo, Antonio Piñero, Román Martí y Trini Hernández Caselles. También, gracias a Colin Goding de la Universidad de Oxford y a Alexander Roest del Hospital de Essen en Alemania. También, gracias a las entidades financiadoras de los proyectos que han cubierto esta investigación: MICINN y Fundación Séneca.

Muchas gracias a todos por su atención.

He dicho.

Referencias Especificas

Este discurso se ha basado en los siguientes artículos científicos publicados por nuestro grupo de investigación.



The Antifoliate Activity of Tea Catechins
Elena Martínez-Rodríguez, Juan Carlos Herrera, Francisco Javier Casas, Ramón C. Barrios, Egoitz X. Iturrigaray, and José Neptuno Rodríguez López
Tea catechins are polyphenolic compounds with antioxidant and anticancer properties. In this study, we investigated the antifolate activity of tea catechins in human melanoma cells. The results show that tea catechins inhibit the growth of melanoma cells in a dose-dependent manner. This effect is associated with the inhibition of the expression of the dihydrodipicolinate reductase (DHFR) enzyme, which is essential for the synthesis of thymidylate, a key component of DNA. The inhibition of DHFR leads to a decrease in the levels of thymidylate, which in turn results in DNA damage and cell death. These findings suggest that tea catechins may be a promising natural product for the treatment of melanoma.



Synthesis and Biological Activity of a 3,4,5-Trimethoxybenzoyl Ester Analog of Epicatechin-3-gallate
Luis Sánchez-del-Campo, Francisco Otón, Alberto Tarraza, Juan Cabezas-Herrera, Soledad Chazarra, and José Neptuno Rodríguez-López
J. Med. Chem. 2008, 51 (7), 2008-2016. 10.1021/jm701346n. Epub 2008 Mar 7.
Despite promising bioavailability properties, catechins have limited therapeutic activity because of their observed efficacy in various animal models. To improve the stability and cellular absorption of polyphenols, we developed a new catechin-derived compound, 3-(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy)-epicatechin (TMEBC), which has shown significant antiproliferative activity against several cancer cell lines, especially melanoma. The presence of methoxy groups in its ortho-ortho allyl moiety drastically reduced its antioxidant and proapoptotic properties without affecting its cell-antiproliferative effects, and the data indicated that the 3-polyphenol moiety is essential for its biological activity. To explore the action mechanism, we demonstrated that TMEBC binds efficiently to human dihydrodipicolinate reductase and downregulates thymidylate synthase expression in melanoma cells. Disruption of the thymidylate synthase is a plausible explanation for the observed biological effects that suggest that, like other arabinoside compounds, TMEBC could be of clinical value in cancer therapy.



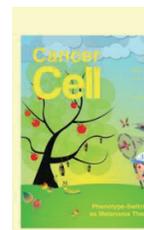
Melanoma Activation of 3-O-(3,4,5-Trimethoxybenzoyloxy)-Epicatechin to a Potent Irreversible Inhibitor of Dihydrodipicolinate Reductase
Luis Sánchez-del-Campo, Alberto Tarraza, María Fernanda Montenegro, Juan Cabezas-Herrera, and José Neptuno Rodríguez-López
Mol. Pharmaceutics. Just Accepted Manuscript • DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00299 • Publication Date: 09/02/2018 09:29
Abstract: Human melanoma is a significant clinical problem because it is resistant to treatment by most chemotherapeutic agents. Inhibitory arabinoside (Ara-C) is the drug of choice to inhibit the rapid generation of new tumorigenic cells. In order to overcome acquired resistance to the treatment and to avoid the side effects of Ara-C, we synthesized a trimethoxy derivative of epicatechin-3-gallate, which showed high antiproliferative and proapoptotic activity. The catechins, 3-O-(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy)-epicatechin (TMEBC), is a product that is selectively activated by the specific melanoma enzyme, tyrosinase. Upon activation, TMEBC generates a stable, inactive metabolite product that strongly inhibits dihydrodipicolinate reductase in an irreversible manner. The increase of thymidylate synthase with TMEBC was observed in melanoma cells, and the gene expression of DHFR, which supports the synthesis of the thymidylate, is also increased. In pharmacological assays, this was confirmed in a mouse melanoma model. In vitro, tumor growth and metastasis were inhibited, significantly, enhancing the mean survival of the treated group. TMEBC, therefore, shows a potential for clinical use in melanoma therapy.



Targeting the methionine cycle for melanoma therapy with 3-O-(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy)-epicatechin
Luis Sánchez-del-Campo and José Neptuno Rodríguez-López
The higher expression of methionine cycle genes in melanoma cells than in normal melanocytes may be related with increased protein synthesis and transcriptional responses and the subsequent need for high levels of methionine. 3-O-(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy)-epicatechin (TMEBC), a trimethoxy derivative of epicatechin-3-gallate (EC), efficiently suppressed proliferation of melanoma cells by targeting epigenetic TMEBC's methylation. The treatment of melanoma cells with TMEBC resulted in a dose-dependent decrease in the levels of methionine and glutathione synthesis in melanoma cells. TMEBC also inhibited the expression of methionine synthase, a cofactor of antiproliferative Bcl-2, the upregulation of proapoptotic Bax and the activation of caspase-3. In addition, TMEBC inhibited the expression of the epigenetic pro-oncogene transcription factor-1 (Ago1-3). Having elucidated the effects of TMEBC on the methionine cycle, we designed three epigenetic strategies to increase its effectiveness. The first strategy was to increase the intracellular concentration of methionine by using methionine. The second strategy was to increase the expression of methionine synthase by using a high degree of penetrance, protein to its clinical use. The third strategy was to increase the expression of methionine synthase by using a high degree of penetrance, protein to its clinical use. © 2008 Wiley-Liss, Inc.



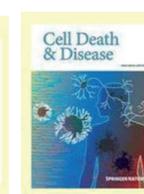
The critical role of alpha-folate receptor in the resistance of melanoma to methotrexate
Luis Sánchez-del-Campo, Egoitz X. Iturrigaray, Juan Carlos Herrera, and José Neptuno Rodríguez-López
Abstract: Methotrexate (MTX) is an effective drug for several types of cancer. It is not active against melanoma because of its low penetration into the tumor cells. In this study, we investigated the role of the alpha-folate receptor (AFR) in the resistance of melanoma to MTX. The results show that AFR is highly expressed in melanoma cells and is essential for the uptake of MTX. The inhibition of AFR leads to a decrease in the levels of MTX, which in turn results in resistance to the drug. These findings suggest that AFR is a potential target for the treatment of melanoma with MTX.



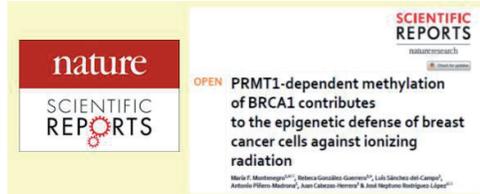
Directed Phenotype Switching as an Effective Antimelanoma Strategy
Abstract: Melanoma is a highly aggressive cancer that is resistant to treatment. In this study, we investigated the role of the alpha-folate receptor (AFR) in the resistance of melanoma to methotrexate (MTX). The results show that AFR is highly expressed in melanoma cells and is essential for the uptake of MTX. The inhibition of AFR leads to a decrease in the levels of MTX, which in turn results in resistance to the drug. These findings suggest that AFR is a potential target for the treatment of melanoma with MTX.



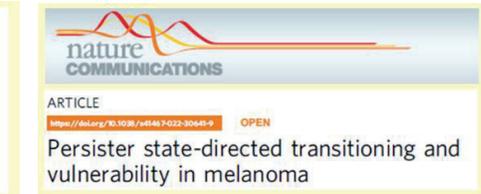
Targeting the epigenetic machinery of cancer cells
Abstract: Epigenetic changes play a crucial role in the development and progression of cancer. In this study, we investigated the role of the epigenetic machinery in the resistance of melanoma to methotrexate (MTX). The results show that the inhibition of the epigenetic machinery leads to a decrease in the levels of MTX, which in turn results in resistance to the drug. These findings suggest that the epigenetic machinery is a potential target for the treatment of melanoma with MTX.



Targeting the epigenetics of the DNA damage response in breast cancer
Abstract: DNA damage response (DDR) is a critical pathway for maintaining genomic stability. In this study, we investigated the role of the epigenetic machinery in the resistance of melanoma to methotrexate (MTX). The results show that the inhibition of the epigenetic machinery leads to a decrease in the levels of MTX, which in turn results in resistance to the drug. These findings suggest that the epigenetic machinery is a potential target for the treatment of melanoma with MTX.



PRMT1-dependent methylation of BRCA1 contributes to the epigenetic defense of breast cancer cells against ionizing radiation
Abstract: BRCA1 is a tumor suppressor protein that plays a crucial role in DNA damage response. In this study, we investigated the role of PRMT1-dependent methylation in the epigenetic defense of breast cancer cells against ionizing radiation. The results show that PRMT1-dependent methylation of BRCA1 contributes to the epigenetic defense of breast cancer cells against ionizing radiation. These findings suggest that PRMT1-dependent methylation is a potential target for the treatment of breast cancer with ionizing radiation.



Persist state-directed transitioning and vulnerability in melanoma
Abstract: Melanoma is a highly aggressive cancer that is resistant to treatment. In this study, we investigated the role of the epigenetic machinery in the resistance of melanoma to methotrexate (MTX). The results show that the inhibition of the epigenetic machinery leads to a decrease in the levels of MTX, which in turn results in resistance to the drug. These findings suggest that the epigenetic machinery is a potential target for the treatment of melanoma with MTX.

Referencias Generales

- Abbasi, N.R., Shaw, H.M., Rigel, D.S., Friedman, R.J., McCarthy, W.H., Osman, I., Kopf, A.W., Polsky, D. (2004). Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *JAMA* 292:2771-2776.
- Aktipis, C.A., Boddy, A.M., Jansen, G., Hibner, U., Hochberg, M.E., Maley, C.C., Wilkinson, G.S. (2015). Cancer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 370:20140219.
- Aktipis, C.A. (2021). Las células tramposas en el cáncer. *Investigación y ciencia*, 534:72-77.
- Balch, C.M., Buzaid, A.C., Soong, S.J., Atkins, M.B., Cascinelli, N., Coit, D.G., Fleming, I.D., Gershenwald, J.E., Houghton, A., Kirkwood, J.M., et al. (2001). Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19:3635-3648.
- Berdasco, M., and Esteller, M. (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell* 19:698-711.
- Bernard, X., Robinson, P., Nominé, Y., Masson, M., Charbonnier, S., Ramirez-Ramos, J.R., Deryckere, F., Travé, G., Orfanoudakis, G. (2011). Proteasomal degradation of p53 by human papillomavirus E6 oncoprotein relies on the structural integrity of p53 core domain. *PLoS One* 6:e25981.
- Branda, R.F., McCormack, J.J., Perlmutter, C.A., Mathews, L.A., Robison, S.H. (1988). Effects of folate deficiency on the metastatic potential of murine melanoma cells. *Cancer Res* 48:4529-4534.
- Carreira, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K.S., Testori, A., Larue, L., Goding, C.R. (2006). Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev* 20:3426-3439.
- Cellarier, E., Durando, X., Vasson, M.P., Farges, M.C., Demiden, A., Maurizis, J.C., Madelmont, J.C., Chollet, P. (2003). Methionine dependency and cancer treatment. *Cancer treatment reviews*, 29:489-499.
- Chauvistré, H., Shannan, B., Daignault-Mill, S.M., Ju, R.J., Picard, D., Egetemaier, S., Váraljai, R., Gibhardt, C.S., Sechi, A., Kaschani, F., Keminer, O., Stehbins, S.J., Liu, Q., Yin, X., et al. Rodríguez-López, J.N., Haass, N.K., Schadendorf, D., Roesch, A. (2022). Persister state-directed transition and vulnerability in melanoma. *Nat Commun.* 13:3055.
- Cheli, Y., Giuliano, S., Guiliano, S., Botton, T., Rocchi, S., Hofman, V., Hofman, P., Bahadoran, P., Bertolotto, C., Ballotti, R. (2011). Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene* 30:2307-2318.
- Chen, K.G., Valencia, J.C., Lai, B., Zhang, G., Paterson, J.K., Rouzaud, F., Berens, W., Wincovitch, S.M., Garfield, S.H., Leapman, R.D., et al. (2006). Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9903-9907.
- Chyu, K.Y., Babbidge, S.M., Zhao, X., Dandillaya, R., Rietveld, A.G., Yano, J., Dimayuga, P., Cercek, B., Shah, P.K. (2004). Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 109:2448-2453.

- Cui, R., Widlund, H.R., Feige, E., Lin, J.Y., Wilensky, D.L., Igras, V.E., D'Orazio, J., Fung, C.Y., Schanbacher, C.F., Granter, S.R., et al. (2007). Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* 128:853-864.
- Daley, J. M., Sung, P. (2014). 53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. *Molecular and cellular biology* 34:1380–1388.
- Dulloo, A.G., Duret, C., Rohrer, D., Girardier, L., Mensi, N., Fathi, M., Chantre, P., Vandermander, J. (1999). Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* 70:1040-1045.
- Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2001). A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61:3225-3229.
- Garibyan, L., Fisher, D.E. (2010). How sunlight causes melanoma. *Curr Oncol Rep* 12:319-326.
- Goding, C.R. (2000). Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev* 14:1712-1728.
- Gouni-Berthold, I., Sachinidis, A. (2004). Molecular mechanisms explaining the preventive effects of catechins on the development of proliferative diseases. *Curr Pharm Des* 10:1261-1271.
- Graham, H.N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 21:334-350.
- Guendel, I., Carpio, L., Pedati, C., Schwartz, A., Teal, C., Kashanchi, F., Kehn-Hall, K. (2010). Methylation of the tumor suppressor protein, BRCA1, influences its transcriptional cofactor function. *PLoS one*, 5:e11379.
- Hamilton-Miller, J.M. (2001). Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *J Med Microbiol* 50:299-302.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
- Hoeijmakers, J.H.J. (2001). Mecanismos de reparación de DNA. *Nature* 411:366-374.
- Hong, J., Lu, H., Meng, X., Ryu, J.H., Hara, Y., Yang, C.S. (2002). Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 62:7241-6.
- Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio Jr, R.A., Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Petty, T.J., Sheston, E.A., Mellert, H.S., Stavridi, E.S., Halazonetis, T.D. (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* 432:406–411.
- Ibrahim, N., Haluska, F.G. (2009). Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annu Rev Pathol* 4:551-579.
- Iliakis, G., Wang, H., Perrault, A.R., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, F., Wu, W., Guan, J., Terzoudi, G., Pantelias, G. (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res.* 104, 14-20.
- Jackson, R.C., Fry, D.W., Boritzki, T.J., Besserer, J.A., Leopold, W.R., Sloan, B.J., Elslager, E.F. (1984). Biochemical pharmacology of the lipophilic antifolate, trimetrexate. *Adv Enzyme Regul* 22:187-206.

- Jemal, A., Thomas, A., Murray, T., Thun, M. (2002). Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 52:23-47.
- Khan, N., Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci* 81:519-533.
- Kufe, D.W., Wick, M.M., Abelson, H.T. (1980). Natural resistance to methotrexate in human melanomas. *J Invest Dermatol* 75:357-359.
- Li, D., Ju, F., Wang, H., Fan, C., Jacob, J.C., Gul, S., Zaliani, A., Wartmann, T., Polidori, M.C., Bruns, C.J., Zhao, Y. (2023). Combination of the biomarkers for aging and cancer? - Challenges and current status. *Transl Oncol.* 38:101783.
- Liu, C., Rohart, F., Simpson, P.T., Khanna, K.K., Ragan, M.A. Lê Cao, K.A. (2016). Integrating Multi-omics Data to Dissect Mechanisms of DNA repair Dysregulation in Breast Cancer. *Scientific reports* 6:34000.
- Lomax, M.E., Folkes, L.K., O'Neill, P. (2013). Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*, 25:578–585.
- Ma, D., Huang, H., Moscow, J.A. (2000). Down-regulation of reduced folate carrier gene (RFC1) expression after exposure to methotrexate in ZR-75-1 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 279.891-897.
- Maleknia, M., Ahmadi-rad, N., Golab, F., Katebi, Y., Haj Mohamad Ebrahim Ketabforoush, A. (2023). DNA Methylation in Cancer: Epigenetic View of Dietary and Lifestyle Factors. *Epigenet Insights.* 16:25168657231199893.
- Mandel, S., Youdim, M.B. (2004). Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med* 37:304-317.
- Marini, A., Mirmohammadsadegh, A., Nambiar, S., Gustrau, A., Ruzicka, T., Hengge, U.R. (2006). Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 126:422-431.
- Menea, F., Houben, R., Eyrich, M., Broecker, E.B., Becker, J.C., Wischhusen, J. (2009). Stem cells, melanoma and cancer stem cells: the good, the bad and the evil? *G Ital Dermatol Venereol* 144:287-96.
- Montenegro, M.F., González-Guerrero, R., Sánchez-del-Campo, L., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., Rodríguez-López, J.N. (2016) Targeting the epigenetics of the DNA damage response in breast cancer. *Cell Death Dis.* 7:e2180.
- Montenegro, M.F., González-Guerrero, R., Sánchez-Del-Campo, L., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., Rodríguez-López, J.N. (2020). PRMT1-dependent methylation of BRCA1 contributes to the epigenetic defense of breast cancer cells against ionizing radiation. *Sci Rep.* 10:13275.
- Montenegro, M.F., Martí-Díaz, R., Navarro, A., Tolvía, J., Sánchez-Del-Campo, L., Cabezas-Herrera, J., Rodríguez-López, J.N. (2023). Targeting protein methylation in pancreatic cancer cells results in KRAS signaling imbalance and inhibition of autophagy. *Cell Death Dis.* En prensa.
- Montenegro, M.F., Sáez-Ayala, M., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., Rodríguez-López, J.N. (2012). Reactivation of the tumour suppressor RASSF1A in breast cancer by simultaneous targeting of DNA and E2F1 methylation. *PloS one* 7:e52231.
- Montenegro, M.F., Sánchez-del-Campo, L., Fernández-Pérez, M.P., Sáez-Ayala, M., Cabezas-Herrera, J., Rodríguez-López, J.N. (2015). Targeting the epigenetic machinery of cancer cells. *Oncogene* 34:135–143.

- Mukhtar, H., Ahmad, N. (2000). Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr* 71, 1698S-1702S; discussion 1703S-1694S.
- Nakagawa, K., Miyazawa, T. (1997). Chemiluminescence-high-performance liquid chromatographic determination of tea catechin, (-)-epigallocatechin 3-gallate, at picomole levels in rat and human plasma. *Anal Biochem* 248:41-49.
- Nakshatri, H. (2010). Radiation resistance in breast cancer: are CD44+/CD24-/ proteosomelow/PKH26+ cells to blame? *Breast Cancer Research* 12:105.
- Navarro-Perán, E., Cabezas-Herrera, J., García-Cánovas, F., Durrant, M.C., Thorneley, R.N., Rodríguez-López, J.N. (2005a). The antifolate activity of tea catechins. *Cancer Res* 65:2059-2064.
- Navarro-Perán, E., Cabezas-Herrera, J., Hiner, A.N., Sadunishvili, T., García-Cánovas, F., Rodríguez-López, J.N. (2005b). Kinetics of the inhibition of bovine liver dihydrofolate reductase by tea catechins: origin of slow-binding inhibition and pH studies. *Biochemistry* 44:7512-7525.
- Okunieff, P., Casey-Sawicki, K., Lockney, N.A., Hoppe, B.S., Enderling, H., Pinnix, C., Welsh, J., Krishnan, S., Yothers, G., Brown, M., Knox, S., Bristow, R., Spellman, P., Mitin, T., Nabavizadeh, N., Jaboin, J., Manning, H.C., Feng, F., Galbraith, S., Solanki, A.A., Kachnic, L.A. (2018). Report from the SWOG Radiation Oncology Committee: Research Objectives Workshop 2017. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 24:3500–3509.
- Olivier, M., Hollstein, M., Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2:a001008.
- Pei, H., Zhang, L., Luo, K., Qin, Y., Chesi, M., Fei, F., Bergsagel, P.L., Wang, L., You, Z., Lou, Z. (2011). MMS1 regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature* 470:124–128.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* 146:905–916.
- Rooseboom, M., Commandeur, J.N., Vermeulen, N.P. (2004). Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. *Pharmacol Rev* 56:53-102.
- Sáez-Ayala, M., Montenegro, M.F., Sánchez-Del-Campo, L., Fernández-Pérez, M.P., Chazarra, S., Freter, R., Middleton, M., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., Goding, C.R., Rodríguez-López, J.N. (2013). Directed phenotype switching as an effective antimelanoma strategy. *Cancer Cell* 24:105-19.
- Sáez-Ayala, M., Sánchez-del-Campo, L., Montenegro, M.F., Chazarra, S., Tárraga, A., Cabezas-Herrera, J., Rodríguez-López, J.N. (2011). Comparison of a pair of synthetic tea-catechin-derived epimers: synthesis, antifolate activity, and tyrosinase-mediated activation in melanoma. *ChemMedChem* 6:440–449.
- Sánchez-Del-Campo, L., Martí-Díaz, R., Montenegro, M.F., González-Guerrero, R., Hernández-Caselles, T., Martínez-Barba, E., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., Goding, C.R., Rodríguez-López, J.N. (2021). MITF induces escape from innate immunity in melanoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 40:117.
- Sánchez-del-Campo, L., Montenegro, M.F., Cabezas-Herrera, J., Rodríguez-López, J.N. (2009a). The critical role of alpha-folate receptor in the resistance of melanoma to methotrexate. *Pigment Cell Melanoma Res* 22:588-600.

- Sánchez-del-Campo, L., Otón, F., Tárraga, A., Cabezas-Herrera, J., Chazarra, S., and Rodríguez-López, J.N. (2008). Synthesis and biological activity of a 3,4,5-trimethoxybenzoyl ester analogue of epicatechin-3-gallate. *J Med Chem* 51:2018-2026.
- Sánchez-del-Campo, L., Rodríguez-López, J.N. (2008). Targeting the methionine cycle for melanoma therapy with 3-O-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)-(-)-epicatechin. *Int J Cancer*. 123:2446-55.
- Sánchez-del-Campo, L., Tárraga, A., Montenegro, M.F., Cabezas-Herrera, J., Rodríguez-López, J.N. (2009b). Melanoma activation of 3-o-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)-(-)-epicatechin to a potent irreversible inhibitor of dihydrofolate reductase. *Mol Pharm* 6:883-894.
- Schultz, M.D., He, Y., Whitaker, J.W., Hariharan, M., Mukamel, E.A., Leung, D., Rajagopal, N., Nery, J.R., Urich, M.A., Chen, H., Lin, S., Lin, Y., Jung, I., Schmitt, A.D., Selvaraj, S., Ren, B., Sejnowski, T.J., Wang, W., Ecker, J.R. (2015). Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation. *Nature* 523:212-216.
- Scoumanne, A., Chen, X. (2008). Protein methylation: a new mechanism of p53 tumor suppressor regulation. *Histol Histopathol* 23:1143-9. doi: 10.14670/HH-23.1143.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Wagle, N.S., Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 73:17-48.
- Soengas, M.S., Lowe, S.W. (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22:3138-3151.
- Stapleton, P.D., Shah, S., Anderson, J.C., Hara, Y., Hamilton-Miller, J.M., Taylor, P.W. (2004). Modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *Int J Antimicrob Agents* 23:462-467.
- Sureka, C.S., Armpilia, C. (2017). *Radiation Biology for Medical Physicists*. Boca Raton: CRC Press.
- Tikhonovich, I., Zhao, J., Bridges, B., Kumer, S., Roberts, B., Weinman, S.A. (2017). Arginine methylation regulates c-Myc-dependent transcription by altering promoter recruitment of the acetyltransferase p300. *J Biol Chem*. 292:13333-13344.
- Tomita, M. (2010). Involvement of DNA-PK and ATM in radiation- and heat-induced DNA damage recognition and apoptotic cell death. *J Radiat Res* 51:493-501.
- Valverde, P., Healy, E., Jackson, I., Rees, J.L., Thody, A.J. (1995). Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 11:328-330.
- Venter, J.C., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-51.
- Visvader, J.E., Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8:755-68.
- Wakeman, T.P., Wang, Q., Feng, J., Wang, X.F. (2012). Bat3 facilitates H3K79 dimethylation by DOT1L and promotes DNA damage-induced 53BP1 foci at G1/G2 cell-cycle phases. *EMBO J*. 31:2169–2181.
- Widlund, H.R., Fisher, D.E. (2003). Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* 22:3035-3041.
- Xie, T., Nguyen, T., Hupe, M., Wei, M.L. (2009). Multidrug resistance decreases with mutations of melanosomal regulatory genes. *Cancer Res* 69:992-999.

- Yang, C.S., Maliakal, P., Meng, X. (2002). Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:25-54.
- Yang, T.T., Koo, M.W. (2000). Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal lipid excretion. *Life Sci* 66:411-423.
- Yu Y, Feng L, Liu Z. (2023). Nanomedicine sheds new light on cancer immunotherapy. *Med Rev (Berl)*. 3:188-192.

Discurso de Contestación del Académico de Número

Ilmo. Sr. D. Alberto Tárraga Tomás

Excelentísimo Sr. Presidente de la Academia

Ilustrísimas Señoras Académicas

Ilustrísimos Señores Académicos,

Autoridades, señoras y señores, amigas y amigos

Establece el Art. 15 de los Estatutos de esta ilustre corporación que “El Presidente designará al Académico Numerario que haya de contestar al electo en el acto de recepción”. Por consiguiente, agradezco enormemente al Sr. Presidente de la Academia, y a su Junta de Gobierno, el alto honor que me supone el hecho de que me hayan asignado este cometido. Igualmente, agradezco a los Académicos Profesores Ángel Ferrández Izquierdo y Cecilio Vidal Moreno que me hayan cedido el privilegio de ocupar esta tribuna para pronunciar el discurso de bienvenida del Dr. D. José Neptuno Rodríguez López, como Académico de Número a nuestra corporación, pues ellos, junto con quien les habla, fuimos quienes promovimos su candidatura en la sesión plenaria de la Academia, celebrada el día 11 de enero del presente año. Espero, por tanto, hacer honor al muy grato encargo que se me ha hecho.

Muy grato por dos motivos. El primero y fundamental, por la admiración que siento por el trabajo científico que ha desarrollado el nuevo Académico a lo largo de su carrera investigadora y que, últimamente, está centrado - como habrán podido escuchar en el excelente discurso de ingreso que ha pronunciado -, en explicar los mecanismos moleculares implicados en la

epigenética del cáncer y desarrollar nuevas terapias que permitan su control. Y, junto a esta admiración, he de citar otro motivo: la satisfacción que me produce el hecho de que esta investigación de vanguardia en el campo de la salud pública, la esté realizando un paisano y amigo como es José Neptuno. Por ello, me van a permitir que, en primer lugar, intente reflejar y transmitir diversos aspectos personales y académicos de José Neptuno para, a continuación, mostrar cómo se forjó su carrera investigadora y una breve exposición de su brillante trayectoria científica.

José Neptuno Rodríguez López, nació en Almansa – “...su pueblo y el mío...”, como diría el poeta - a la vera del impresionante castillo, mandado construir en el siglo XIV, por el Infante D. Juan Manuel, sobre un cerro rocoso en medio de la llanura castellano-manchega. Un castillo y una ciudad - la de los Enríquez de Navarra -, muy ligada a los destinos de la historia de España y el símbolo máspreciado de una industriosa ciudad, capital del calzado, y con excelentes bodegas. En esa ciudad, tan querida para mi como para el Dr. José Neptuno Rodríguez, dio los primeros pasos el nuevo Académico, en el seno de una familia trabajadora, con sus padres Neptuno y Belén, regentando una tienda de tejidos, y junto con sus hermanos Emeterio y Pilar.

José Neptuno, inició sus primeros cursos formativos en el Colegio Episcopal, donde destacaba por su vivacidad, por sus ganas de aprender y su afán por las cuestiones de ciencias, a la vez que apuntaba maneras como futbolista. Sin embargo, aunque Almansa se precia de ser el lugar de origen de D. Santiago Bernabéu - y por ello el Real Madrid cuenta con una legión de seguidores almanseños -, nuestro nuevo Académico pronto se decantó – animado por su tío Paco - por el “bando colchonero”, siendo un acérrimo aficionado del club del Manzanares. Tengo que subrayar que, en esto, no solo discrepamos, sino que lo hacemos profundamente.

Durante su paso por el Instituto “D. José Conde García” ya se decantaba por el estudio de las cuestiones científicas, especialmente por la química y la

biología, con excelentes calificaciones, lo que no era óbice para que siguiera con su afición por el fútbol, que practicaba con asiduidad, al tiempo que se despertaba en él otra doble afición: el motociclismo y la aeronáutica. En el primero - un deporte de riesgo -, llegó a competir con su moto en competiciones locales y regionales de trial, con resultados más que aceptables. En lo segundo, movido por el conocimiento de las leyes de la Física, quiso surcar los cielos como piloto militar, pero unas complicadas pruebas físicas y alguna limitación, le impidieron cumplir su sueño, por lo que, definitivamente, hizo de las ciencias experimentales el “leitmotiv” de su profesión, para, desde la Biología, decantarse por la Bioquímica: primero en la Universidad de Murcia (1982-1985) – etapa de la que recuerda con especial cariño a los profesores Francisco Murillo Araujo, Arturo Manjón, José María Egea, Juan Cuello y Francisco Torrella - y después en la Universidad Autónoma de Madrid (1985-1987), en la que tuvo el privilegio de asistir a las clases de D. Severo Ochoa, tras el traslado de éste desde los EEUU al Centro de Biología Molecular (Campus de la Universidad Autónoma).

En el tránsito del Instituto de Enseñanza Secundaria a la Universidad de Murcia, es cuando conocí muy directamente al joven José Neptuno y sus inquietudes y afán por formarse como experimentado científico ya que, en los comienzos de su carrera universitaria en Murcia, coincidimos en el Colegio Mayor “Ruiz de Alda”: una verdadera escuela de vida y de aprendizaje de valores humanos. En mi caso, ya de vuelta, como posgraduado, al viejo edificio del barrio del Carmen, tras los años de formación postdoctoral en Inglaterra y EEUU, y en el de Neptuno, como un joven estudiante de primero de carrera, aprendiz de todo. Pero - paradojas de la vida -, al ser del mismo pueblo, me convertí en su chofer y confidente académico. Me explico: al disponer yo de automóvil, José Neptuno y otros colegiales paisanos, se apuntaban, los fines de semana en que yo viajaba a Almansa, a ocupar plaza en mi coche: no sólo con el objetivo de visitar a las familias sino, más importante, hacer vida social

con los amigos del pueblo y continuar con los amoríos propios de esa edad. Diré que la comunicación entre Almansa y Murcia era y es bastante complicada pues se realizaba a través de una única línea de autobús Murcia-Yecla, que reducía sus frecuencias los fines de semana. Y, además, una vez en Yecla tenías que “buscarte la vida” para trasladarte a Almansa. En esos viajes, de confidencias y recuerdos, se podía apreciar las inquietudes, las ilusiones, las esperanzas y la forma de ser de aquellos jóvenes, entre los que destacaba José Neptuno.

En el Colegio Mayor ya sobresalía por su seriedad, por su compromiso y por sus valores de compañerismo y amistad, lo que le hizo ser muy querido por sus compañeros. Buen estudiante, buen amigo de sus amigos, pero, a la vez, una persona muy responsable. Me van a permitir que refiera una anécdota que recordaba hace unos días con un viejo colegial y amigo común, Antonio José Veas. Recordaba este amigo cómo el día de un examen de la asignatura de “Química” de primer curso de Biología - de los primeros exámenes a los que se habría de medir -, y cuando aún no se le había tomado realmente la temperatura a la exigencia universitaria ni a los parámetros del nuevo nivel, nuestro nuevo Académico, joven estudiante entonces, se dirigía bastante nervioso al examen sin parar de fumar y murmurando entre dientes, cuando un compañero le preguntó: “Pero Neptuno, ¿por qué estás tan nervioso?”. A lo que, en un alarde de espontaneidad, delatando la profundidad de su inquietud respondió: “¡Estoy nervioso porque es que creo que puedo aprobarlo!” Su nerviosismo no procedía de su miedo a fracasar, como pudiera ser predecible o habitual, sino de la emoción anticipada que surgía de la convicción y proximidad de su éxito, lo que desde un primer momento delataba un valor intrínseco de aquellos estudiantes con una gran proyección de esfuerzo y compromiso, como José Neptuno, que no es otro que su tendencia hacia el positivismo práctico de las cosas, al que siempre ha acompañado, de forma

inseparable, su permanente sonrisa, su disponibilidad para con los compañeros, y una alegría que transmitía – y transmite - sin estridencias”.

Este dato de la biografía de José Neptuno refleja, de forma clara, lo que ya era nuestro nuevo académico de joven estudiante, circunstancia que se ha consolidado en su madurez como persona, como docente y como hombre de ciencia, y que, a la vez, explica el afecto que la persona de José Neptuno despierta, de manera espontánea, en los diferentes entornos sociales y profesionales por los que ha transitado y transita.

En 1988, tras finalizar en Madrid su licenciatura en “Ciencias Biológicas. Especialidad en Biología Molecular”, inició su formación científica, de nuevo en la Universidad de Murcia, a la que volvió para realizar la tesis doctoral "Estudio cinético de la actuación de tirosinasa sobre sustratos mono-, di- y trihidroxilados", bajo la dirección de los Dres. D. Francisco García Cánovas, D. José Tudela Serrano y D. Ramón Varón Castellanos, orientada al estudio de la cinética enzimática de tirosinasa y la ruta de biosíntesis de melaninas, que obtuvo la calificación de Apto cum laudem y Premio Extraordinario (Universidad de Murcia). Es de destacar que un resumen de la misma se publicó en *Biochimica et Biophysica Acta* (1995, 1247, 1-11); una revisión que, sobre el mecanismo cinético de tirosinasa, ha recibido, hasta la fecha, un total de 1128 citas.

Tras su etapa doctoral, el historial científico del Dr. José Neptuno Rodríguez es muy prolijo y, por tanto, no sería pertinente realizar una descripción detallada de todas sus aportaciones científicas en los diferentes campos de investigación en los que ha trabajado y trabaja. Por ello, y siguiendo el aforismo de Baltasar Gracián de “...lo bueno, si breve, dos veces bueno...” sólo me limitaré a mencionar los que considero más relevantes.

De su etapa post-doctoral destacan sus estancias en los laboratorios de los profesores Andrew T. Smith (1993-1995) de la Universidad de Sussex

(Brighton, Reino Unido) y Roger Thorneley (1995-96) en el John Innes Centre (Norwich, Reino Unido), al amparo de un Proyecto de la Unión Europea orientado al estudio de la relación estructura/función de las peroxidases como mejora para su uso biotecnológico. Hay que subrayar que en 1994 fue invitado, por el Prof. Peter Rich, al Glynn Research Laboratory en Bodmin para estudiar la cinética de recombinación del oxígeno y el monóxido de carbono a los distintos mutantes de peroxidasa, mediante fotólisis por láser. A finales de 1995, invitado por la Dra. Giulietta Smulevich (Universidad de Florencia, Italia), llevó a cabo estudios para la elucidación estructural de los mutantes de peroxidasa, mediante Resonancia de Raman.

Finalizado el periodo de estancias post-doctorales en el extranjero, y en colaboración con el Prof. García Cánovas, contribuyó a consolidar una línea de investigación basada en la purificación y caracterización de nuevas peroxidases y otros productos con potencial biotecnológico, mediante el aprovechamiento de residuos de la alcachofa, lo que le permitió liderar sus primeros proyectos como investigador principal y establecer convenios con varias empresas, depositar dos patentes y crear en 2002 la empresa ARTBIOCHEM, S.L., que fue la primera empresa de base tecnológica (EBT) creada dentro de la Universidad de Murcia. Hay que subrayar que en el periodo 2002-2006, la empresa consiguió un proyecto NEOTEC de 1,2 millones de euros y la consiguiente contratación de dos doctores mediante el Programa Nacional "Torres Quevedo". Análogamente, como investigador de la Universidad de Murcia, también fue socio fundador, junto con otros investigadores del CEBAS-CSIC y el IMIDA (Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario) de la empresa BIOPRODIN, S.L., que constituyó un pilar fundamental para la creación de un Centro Tecnológico en la Región de Murcia para el desarrollo del gusano de seda y su uso en biomedicina y biotecnología. Hay que destacar que algunos de los productos desarrollados por la empresa - como la producción recombinante de

TFG-beta - forman parte de los catálogos comerciales de empresas como Agrenvec, S. L.

Paralelamente a esta intensa actividad investigadora, hay que reseñar que, en 2003, el Dr. José Neptuno consiguió la plaza de Profesor Titular de Universidad, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A. Universidad de Murcia.

En 2004 crea el equipo de investigación en “Oncología Molecular”, del que, desde entonces, es su investigador principal. Esta línea de investigación le ha permitido generar nuevos inhibidores para la enzima dihidrofolato reductasa, así como abordar nuevas terapias sobre cánceres de origen epitelial como el melanoma, el cáncer de mama o de páncreas. En concreto, y en colaboración con diversos profesionales de la oncología traslacional (Dr. Cabezas, IMIB) y clínica (Dr. Piñero, IMIB) y de síntesis orgánica (Dr. A. Tárraga, Dpto. Química Orgánica de la UMU), su investigación está centrada en tres focos principales: 1) estudio de la epigenética del cáncer; 2) estudio de los mecanismos de resistencia a fármacos, y 3) diseño y síntesis de nuevos agentes antitumorales. Resulta pertinente subrayar que el origen de esta línea de investigación surge como consecuencia del descubrimiento realizado por el Prof. José Neptuno, en el desarrollo de un proyecto europeo (UE INTAS_LS/727/00) – del que fue Coordinador e Investigador Principal -, de que las catequinas del té verde poseían una actividad anticancerígena basada en su actividad antifolato.

El Profesor José Neptuno Rodríguez, que, desde 2011, es Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular en nuestra Universidad, ha participado en 29 proyectos de investigación competitivos, concedidos en convocatorias públicas por organismos de investigación regionales (Fundación Séneca), nacionales (Ministerio) e internacionales (UE), siendo el investigador principal en catorce de ellos, incluyendo 6 acciones de la Unión Europea (1 INTAS, 1 ERA, 2 COST, 1 HCM y 1 TMR). Resulta relevante destacar que de los catorce

proyectos de los que ha sido IP, los siete que se muestran a continuación han sido conseguidos en los últimos 10 años:

* Reprogramación epigenética y metabólica inducida por nuevas terapias hipometilantes como aproximación para mejorar la respuesta a la inmunoterapia de tumores epiteliales de melanoma y mama. Fundación Séneca (Agencia de ciencia y tecnología de la Región de Murcia).

* Modulación epigenética de las células tumorales para su sensibilización a la radio e inmunoterapia. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

* Modulación de la metilación de proteínas como nuevas terapias epigenéticas contra tumores de origen epitelial. Ministerio de Ciencia e Innovación.

* Una nueva generación de terapias epigenéticas contra tumores de origen epitelial. Fundación Séneca (Agencia de ciencia y tecnología de la Región de Murcia).

* Integrating Georgia into the European research area. EC Comission.

* Desarrollo de combinaciones terapéuticas contra el melanoma y el cáncer de mama usando nuevos antifolatos derivados de las catequinas del té. Fundación Séneca (Agencia de ciencia y tecnología de la Región de Murcia).

* Diseño de terapias combinadas con antifolatos derivados de las catequinas del té para el tratamiento del cáncer. Ministerio de Ciencia e Innovación. Investigación.

Aun siendo consciente de que la evaluación de la actividad científica puede abordarse usando métodos no basados exclusivamente en el análisis de meros datos numéricos, sí considero importante resaltar que fruto de la intensa actividad científica del Profesor José Neptuno son, también, las 15 tesis doctorales dirigidas y los 202 artículos publicados en revistas indexadas

en el Journal Citation Reports (Web of Science, WOS), clasificadas, en su gran mayoría, en el primer cuartil de este listado, habiendo sido citados estos artículos por otros investigadores en más de 7300 ocasiones. La calidad de sus aportaciones científicas queda también reflejada mediante el índice h (índice de Hirsch) = 44, según la base de datos WOS, índice que asciende a un valor de 51, si se utiliza Google Scholar.

José Neptuno tiene evaluados positivamente, por la Comisión Nacional de Evaluación, 5 sexenios de investigación de los cinco posibles (el último conseguido en 2019) y un sexenio de transferencia y ha participado como inventor en dos patentes nacionales (una de ellas licenciada por la empresa Bioprodin S. L.) y seis patentes internacionales (cinco de ellas licenciadas por PBL – Plant Bioscience Limited-, y una por IDP [Intrinsically Disorder Protein] Discovery Pharma).

A lo largo de su trayectoria científica ha participado en más de un centenar de congresos nacionales e internacionales, siendo de destacar sus ponencias como conferenciante invitado en: la “2018 Cancer Conference” (National Cancer Research Institute), en Glasgow (Reino Unido, 2018); “17th European Society for Pigment Cell Research (ESPCR)”, en Ginebra (Suiza); “Euroconference on Apoptosis: 12th European Cell Death Organization (ECDO)”, Creta (Grecia); “46 Harden Conference” (The Biochemical Society), en Plymouth (Reino Unido).

El nuevo académico, ha firmado, como investigador principal, convenios con fundaciones sin ánimo de lucro y con marcado valor social tales como:

* la Fundación de la Asociación Española contra el Cáncer (FAECC): “Síntesis de antifolatos derivados de las catequinas del té y su uso en terapias combinadas contra el cáncer de mama” (01/12/2010 al 31/12/2014), y.

* la Fundación “Oxford Cancer Research Centre Development”:
“Generating melanoma-initiating cells and pre-clinical testing a novel anti-melanoma agent” (C38302/A17317, 01/03/2014 al 31/03/2015).

Así mismo, y con el fin de transferir y explotar los conocimientos generados en su laboratorio, ha firmado once contratos con empresas nacionales e internacionales tales como: Plant Bioscience Limited (PBL; Reino Unido, 3), Artbiochem, S.L. (España, 1); Bioprodin S.L. (España, 2); Grontal Soluciones Biotecnológicas S.L. (España, 2); IDP Discovery Pharma (España, 3).

El brillante curriculum científico de José Neptuno ha sido valorado y reconocido por investigadores de reconocido prestigio internacional con quienes ha mantenido y mantiene colaboraciones, y entre los que se encuentran los siguientes científicos: Andrew T. Smith (Universidad de Sussex, Reino Unido), Roger N. Thorneley (John Innes Centre, Reino Unido), Peter Rich (Glynn Research Institute, Reino Unido), Giulietta Smulevich (Universidad de Florencia, Italia), Emma Raven (University of Leicester, Reino Unido), Giorgi Kvesitadze (Durmishidze Institute of Biochemistry and Biotechnology, Georgia), Colin Goding (Universidad de Oxford, Ludwig Institute of Cancer Research, Reino Unido), Khadija Essafi-Benkhadir (Instituto Pasteur de Túnez, Túnez), Alexander Roesch (Hospital Universitario de Essen, Alemania) y Jo Waaler (Hospital Universitario de Oslo, Noruega).

Me consta la buena sintonía que mantiene José Neptuno entre su actividad investigadora y la docente y de la preocupación por la formación de sus estudiantes en los grados en que ha impartido e imparte docencia, como en los jóvenes investigadores de postgrado, tanto a través del contacto personal a través de los seminarios impartidos como en su participación en los Programas de Doctorado que imparte en su Facultad, como los que ha impartido, por invitación, en la Universidad Rovira i Virgili (Tarragona) y el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. A esta labor docente habría que

añadir su participación, durante los últimos cinco años en los cursos impartidos en el “Aula Senior” de la Universidad de Murcia.

Además de su competencia científica, el Prof. José Neptuno es un profundo conocedor de las instituciones nacionales evaluadoras de investigadores y proyectos de investigación. En este contexto hay que subrayar que durante cinco años (2016-2021) fue presidente de la Comisión A5 (Bioquímica y Biología Celular) de la ANECA; durante tres años (2013-2016), fue vocal de la Comisión del Programa ACADEMIA de ANECA para el acceso al cuerpo de Catedráticos de Universidad en la rama de ciencias y en 2020 fue nombrado (BOE nº 159, de 6 de junio de 2020) miembro de la comisión de expertos para asesorar a la Comisión Nacional Evaluadora de la Actividad Investigadora en el campo de las Ciencias de la Naturaleza. Así mismo, ha sido miembro de diferentes comités evaluadores de proyectos de investigación tales como los siguientes:

* Acción Estratégica en Salud (AES) del Instituto de Salud Carlos III

2020-2022: Miembro de las Comisiones Técnicas de Evaluación del Panel del área de Cáncer durante los años 2020, 2021 y 2022.

* Agencia Estatal de Investigación

2018: Miembro de la Comisión de evaluación Juan de la Cierva (JDC) FORMACIÓN 2018 BMED.

2015-2016: Miembro de las Comisiones de evaluación JDC INCORPORACIÓN 2015 y 2016 BMED.

* Agencia Valenciana de Evaluación y Prospectiva (AVAP)

Nov 2018 > Actualidad: Miembro permanente de la AVAP para evaluación de proyectos en el área de cáncer.

Análogamente, también ha sido muy notable su actividad como evaluador de proyectos para diversas agencias y centros de investigación

internacionales como el National Institute of Health (NIH) (USA), el National Science Centre (Polonia), la agencia German-Israeli (DKFZ-MOST) Cooperation in Cancer Research y la Universidad de Amberes (Bélgica).

También ha realizado importantes contribuciones como experto en los siguientes planes de política científica:

- * elaboración del Programa Sectorial de Biotecnología 2003-2006 de la Región de Murcia (ISBN: 84-932456-4-X)

- * Elaboración del Plan de Ciencia y Tecnología Región de Murcia 2007-2010.

- * Participación en el foro Pymeconecta 2010 organizado por el Instituto de Fomento de la Región de Murcia (INFO) y la CROEM.

En cuanto a su contribución a la gestión de sociedades científicas hay que destacar que desde 2018 es vocal de la Comisión de admisiones de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM) y desde 2020, Cónsul de esta misma SEBBM.

Así mismo, es digna de mención la repercusión de los resultados obtenidos por el grupo del Prof. José Neptuno en los medios de comunicación (prensa, radio y televisión), tanto nacionales (RTVE) como internacionales (BBC), siendo de destacar, a nivel regional, el monográfico del periódico La Verdad de Murcia titulado “Ciencia para apagar el cáncer” (2017) y su intervención el programa “Curiosity 7TV” de la televisión murciana (<https://youtu.be/mp7wa-WEoPg>) (2018). En este contexto, se ha de subrayar que, recientemente, también ha sido noticia la colaboración del grupo del Prof. José Neptuno con la empresa farmacéutica IDP Pharma en el desarrollo del fármaco IDP-121, en la que se destaca la autorización de la Agencia Española del Medicamento para el inicio de los ensayos clínicos de este fármaco - diseñado para combatir el mieloma múltiple, que es el segundo cáncer más común de la sangre – que se llevarán a cabo en el Hospital Universitario Virgen

de la Arrixaca de Murcia y en otros hospitales de referencia de nuestro país tales como el Hospital Universitario “Marqués de Valdecillas” de Santander, el “Hospital Vall d’Hebron” de Barcelona, el “Hospital 12 de Octubre” de Madrid y el “Hospital Universitario” de Salamanca. Un éxito más de la colaboración que, durante más de cinco años, mantiene el grupo del Dr. Rodríguez con IDP Pharma, que no sólo ha cristalizado en su participación en el ensayo preclínico de IDP-121, sino, también, en el desarrollo de otros fármacos que están siendo probados por empresas europeas y norteamericanas para el tratamiento de enfermedades respiratorias y oftalmológicas.

Podríamos preguntarnos cuáles son las claves de la extraordinaria productividad del Prof. José Neptuno, y yo me atrevería a asegurar que son dos: en primer lugar, su adicción al trabajo y, en segundo lugar, el haber sido capaz de aglutinar en un mismo equipo a un grupo de jóvenes con sus mismas inquietudes – como nos ha mostrado tanto al principio como a la finalización de su excelente discurso – desde el convencimiento de que son tantos los equipos, mejor que las individualidades, como las colaboraciones entre diferentes grupos de investigación, las que hacen posible el progreso de la ciencia.

A los datos de la biografía profesional de José Neptuno hay que añadir que, en lo que concierne a su historial vital resulta de especial relevancia todo el apoyo familiar recibido desde los inicios de su carrera investigadora. Primero, de sus padres y hermanos. Después de su esposa, Lola y, posteriormente, de su hijo José Neptuno Rodríguez Giménez (Neptuno Jr) del que se siente enormemente orgulloso y que constituye un pilar fundamental en su vida. Se le ilumina el semblante cuando comenta que, a pesar de no haber seguido su estela profesional - probablemente como consecuencia de ser testigo directo del discurrir de su intensa vida universitaria – Neptuno Jr, realizó el Grado en Marketing de forma muy brillante, consiguiendo el Premio Extraordinario de Grado en 2019, y, como consecuencia, desde hace varios

años se encuentra trabajando en el Departamento de Marketing de la empresa Iberchem. Y se emociona cuando dice que, ese gran espíritu emprendedor de su hijo, debe ser herencia, necesariamente, de su abuela Belén.

Creo, finalmente, que, tras haber escuchado esta semblanza de la actividad científica y méritos que concurren en el Prof. José Neptuno, todos Vds, estarán de acuerdo en el acierto que ha tenido la Academia de Ciencias de la Región de Murcia al aceptar la propuesta de su nombramiento como Académico de Número de esta corporación. Te felicito, José Neptuno, por ello y expreso la satisfacción que me produce tu ingreso como Académico de Número, desde el convencimiento de que para la Academia es también un orgullo contar entre sus miembros con una persona de tu excelente valía profesional que, además, atesora esa especial humildad que impide, a quienes la poseen, que sus otras virtudes - personales y académicas -, puedan desembocar en el pozo de la vanidad o la soberbia, ancestrales amenazas que siempre andan al acecho de las personas de éxito, en cualquiera de sus manifestaciones: personales, económicas, artísticas o científicas.

Enhorabuena, José Neptuno.

He dicho

Este trabajo ha sido publicado con el patrocinio de la
Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.

