

**Dra. Jesica Beatriz Allende, Lic. Héctor Juliarena**

[jesica.allende@docentes.udemm.edu.ar](mailto:jesica.allende@docentes.udemm.edu.ar), [hector.juliarena@docentes.udemm.edu.ar](mailto:hector.juliarena@docentes.udemm.edu.ar)

Facultad de Administración y Economía

Universidad de la Marina Mercante

## MELANOMA

### De la biología molecular a la clínica, desafíos actuales y nuevas fronteras terapéuticas

#### Resumen

*Este artículo ofrece una revisión integral y actualizada del melanoma, uno de los tumores cutáneos más agresivos, integrando epidemiología, bases celulares y moleculares, progresión tumoral y estrategias de diagnóstico y terapias. Se analizan en profundidad las alteraciones genéticas clave, las vías de señalización involucradas y el rol*

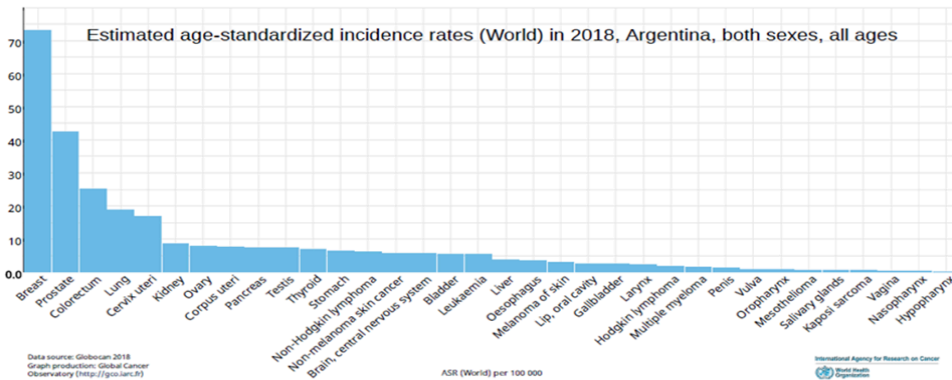
*crítico de la radiación ultravioleta en la carcinogénesis. Asimismo, se discuten los avances y limitaciones de la cirugía, la quimioterapia, la inmunoterapia y la terapia génica, con especial énfasis en los mecanismos de resistencia y en nuevas oportunidades de prevención y abordaje terapéutico.*

#### El cáncer y su panorama en Argentina

El cáncer engloba a un grupo de enfermedades que se caracterizan por un crecimiento celular desregulado e inclusive en ciertas ocasiones puede propagarse hacia otros tejidos, inducir la transformación de células sanas y extender así la enfermedad. Este hecho que se conoce como metástasis tiene asociada una baja tasa de supervivencia. Hay varias etapas en la progresión del cáncer (estadios I a IV) que se definen según sea el tamaño del tumor, la extensión del tumor primario y la capacidad de propagación hacia ganglios linfáticos u otros órganos. Los métodos convencionales de tratamiento del cáncer incluyen cirugía,

radiación y quimioterapia. Se sabe que ciertos factores como organismos infecciosos, dieta poco saludable, pesticidas, toxinas ambientales, tabaco, mutaciones genéticas hereditarias, afecciones inmunes y hormonas son responsables de esta enfermedad[1].

De acuerdo a las estimaciones realizadas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) en el año 2018 Argentina se encontraba entre los países con una incidencia de cáncer media-alta (rango 172,3 a 242,9 por cada 100.000 habitantes) ubicándose en el séptimo lugar de la región de las Américas y siendo el cancer de mama el de mayor incidencia (**fig. 1**).



**Figura 1. Tasa de incidencia ajustada por edad (ASR) para distintos tipos de cáncer en Argentina año 2018.** Para calcular la ASR se consideraron todas las edades y géneros. Adaptado de <http://gco.iarc.fr/today/home>.

En ese momento la población total era de 44.688.858 millones de personas, el número de casos nuevos 129.047, el número de muertes 68 778 y la prevalencia en 5 años 337.638[2].

Para nuestro país se calcula una incidencia de 229 casos nuevos por cada 100.000 varones y 215 casos por cada 100.000 mujeres según los datos de Registros de Cáncer de Base Poblacional para los próximos años[3]. La prevalencia a 5 años para todas las edades para todos los cánceres es de 337.638 casos[2].

### Melanoma: origen, evolución y diagnóstico

#### Origen

El melanoma es un tipo de cáncer de piel originado por la transformación maligna de los melanocitos. Estos se encuentran distribuidos uniformemente en toda la superficie de la piel y su proliferación y diferenciación es controlada estrictamente por los queratinocitos a través de la secreción de distintos factores solubles (fig. 2). La mutación de ciertos genes en los melanocitos les permitirá evadir ese control ejercido por los queratinocitos y proliferar y extenderse formando lunares (nuevos)[4] (tabla 1).

**Tabla 1. Alteraciones genéticas más frecuentes en melanoma[4].**

Gen	Frecuencia (%)*	Tipo
BRAF	50-70	Mutación (activación)
NRAS	15-30	Mutación (activación)
Akt3	43-60	Sobreexpresión
CDKN2A	40-80	Delección, mutación, metilación
PTEN	10-30	Mutación o delección
APAF-1	40	Metilación
p53	10	Delección o mutación
Ciclina D1	6-44	Amplificación

CDKN2B	36	Delección
$\beta$ -catenina	6	Mutación (activación)
Retinoblastoma	6	Mutación
Mitf	6-16	Amplificación

\*El rango de valores se debe a observaciones entre distintos laboratorios. \*\*Las mutaciones pueden ser inserciones, inversiones, transiciones en regiones CpG, mutaciones puntuales[5][6][7].

Los melanocitos son células especializadas en la producción de melanina, el principal pigmento responsable de la coloración de la piel, los ojos y el pelo. La melanina se encuentra en los tejidos de las mucosas del intestino delgado, el ano, la vulva, la boca y el tracto aéreo-digestivo superior. Los melanocitos también se encuentran en la úvea y en el oído interno[8].

La melanina protege a la piel de los efectos de la luz ultravioleta. Una limitada exposición a la luz UV es necesaria para el organismo, por ejemplo, para la generación de la forma bioactiva de la vitamina D. Sin embargo, la exposición excesiva resulta perjudicial por su efecto carcinogénico sobre los tejidos y las células.

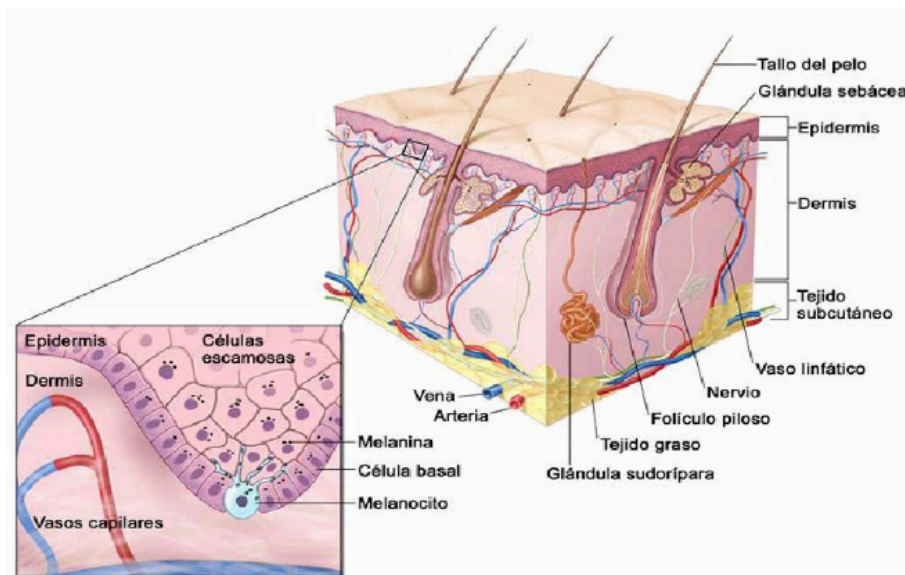


Figura 2. Descripción de la piel y sus capas[4].

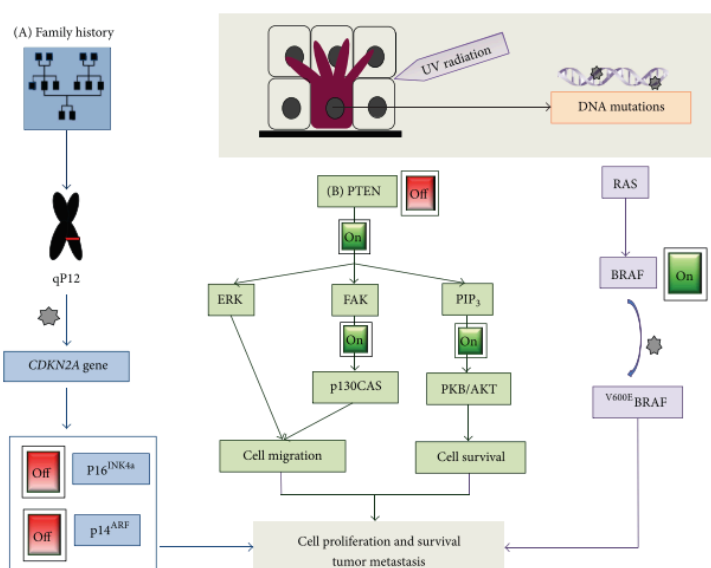
El espectro de radiación UV se divide en tres regiones: UVA (320–400 nm), UVB (280–320 nm), y UVC (200–280 nm). La radiación UVC es biológicamente irrelevante, ya que es casi completamente absorbida por la capa de ozono atmosférica. Tanto UVA como UVB llegan a la superficie de la tierra y

tienen efectos dañinos sobre el ADN y las proteínas tisulares. La radiación UVB es considerada más peligrosa que la UVA, ya que causa dos tipos importantes de lesiones en el ADN: dímeros de pirimidinas, más abundantes y de mayor capacidad carcinogénica que otras lesiones dando

origen a mutaciones C → T y CC → TT (C: Citosina, T: Timidina)[4], y los fotoproductos 6-4 (6-pirimidina 4-pirimidona).

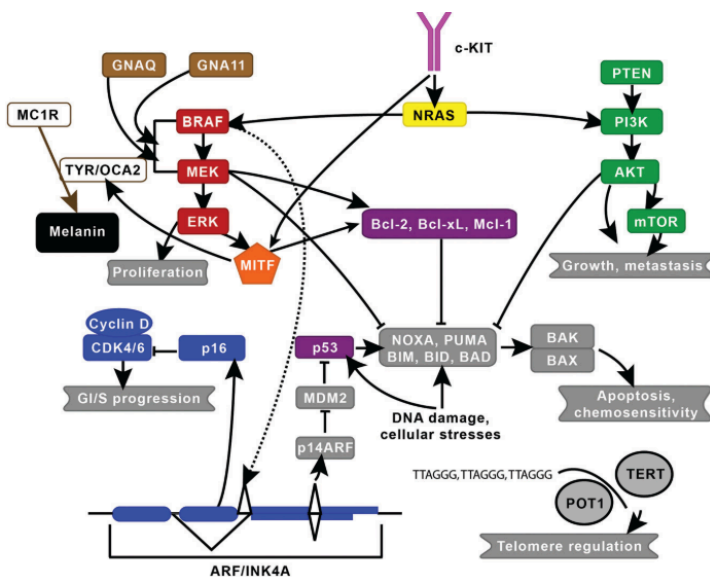
Durante el desarrollo embrionario en vertebrados se forma la cresta neural (CN) en los extremos dorsales del epitelio neural, dando lugar a células migratorias que colonizan un amplio rango de tejidos embrionarios que generan diferentes linajes celulares. Entre ellos, neuronas y células de la glía del sistema nervioso periférico (SNP); melanocitos; células endocrinas de las glándulas adrenales y tiroideas y células mesenquimales que forman cartílagos craneofaciales, huesos, dermis, tejido adiposo y células del músculo liso[9]. Los melanocitos diferenciados se caracterizan por su morfología dendrítica y por la acumulación y tráfico de melanina en los melanosomas. La biosíntesis de la melanina involucra varias enzimas, siendo las principales la tirosinasa o tirosina quinasa (Tyr) y las proteínas relacionadas a tirosinasa, Trp1 y Trp2, (o dopacromo tautomerasa, Dct). En relación al melanoma se encuentran los genes influyentes en la pigmentación y control del

ciclo celular. Estos incluyen regiones que rodean los genes del receptor de melanocortina 1 (MC1R) y tirosinasa (TYR). El MC1R es un receptor acoplado a proteína G ubicado en la membrana plasmática. Las mutaciones disruptivas de CM1R están asociadas con el pelo rojo, las pecas y la sensibilidad al sol debido a una falla en el procesamiento de la feomelanina roja/amarilla en eumelanina marrón/negra. La tirosinasa es la enzima limitante de la velocidad en la producción de melanina. La TYR está regulada transcripcionalmente por la unión de MITF (factor de transcripción asociado a microftalmia) a su promotor. La actividad oxidasa de la tirosinasa convierte la dopa en dopaquinona, un precursor de la melanina[10]. Las mutaciones en la tirosinasa provocan un trastorno poco común llamado albinismo oculocutáneo[11], que se asocia con la sensibilidad ultravioleta (UV), mientras que las variantes comunes asociadas con los ojos azules se han relacionado con la predisposición al melanoma según GWAS (genome-wide association studies)[12] (figs. 3 y 4).



**Figura 3. Mutaciones más comunes encontradas en pacientes con melanoma.** El principal factor de riesgo es la radiación ultravioleta, mientras que los antecedentes familiares aumentan el riesgo al doble. Las mutaciones en el gen CDKN2A, a menudo afectan a los supresores tumorales p16INK4a (activa ciclo celular) o p14ARF (induce apoptosis). Por otro lado, en

la vía de señalización RAS/RAF, exclusivamente NRAS o BRAF están mutados en melanoma. Además, la presencia de mutaciones BRAF en nevos benignos sugiere que BRAF por sí solo no es suficiente para la progresión del tumor. Se ha encontrado que las mutaciones en las vías PTEN cooperan con RAS/RAF para reducir la senescencia mediada por RAS/RAF[13].



**Figura 4. Vías celulares involucradas en el desarrollo del melanoma.** Las dos principales vías de señalización son MAPK (vía de las MAP quinasas; rojo) y AKT/PI3K (verde). Los genes clave incluyen c-KIT (lila), CDK (azul), GNAQ/GNA11 (marrón), MIF (naranja), NRAS (amarillo) y p53/BCL (púrpura). También se muestran MC1R, que participa en la pigmentación de la piel, y TERT y POT1, que participan en la regulación de los telómeros. Las líneas muestran interacciones conocidas entre vías o moléculas[14].

Según la *American Cancer Society* (ACS) el cáncer de piel es el tercer tipo de enfermedad maligna más prevalente y a diferencia de otros tumores su incidencia continúa en aumento a una tasa del 3% anual[4]. Si bien el melanoma es menos común (5%) que otros tipos de cáncer de piel, es la principal causa de muerte por enfermedades de la piel (80%). Los principales factores de riesgo en melanoma son[15]:

- Genéticos: debido a mutaciones predisponentes. Alrededor del 10% de las personas con melanoma tienen un pariente con la enfermedad.
- Edad: su incidencia aumenta con la edad. Sin embargo, a diferencia de otros tumores, se presenta en todas las edades y es

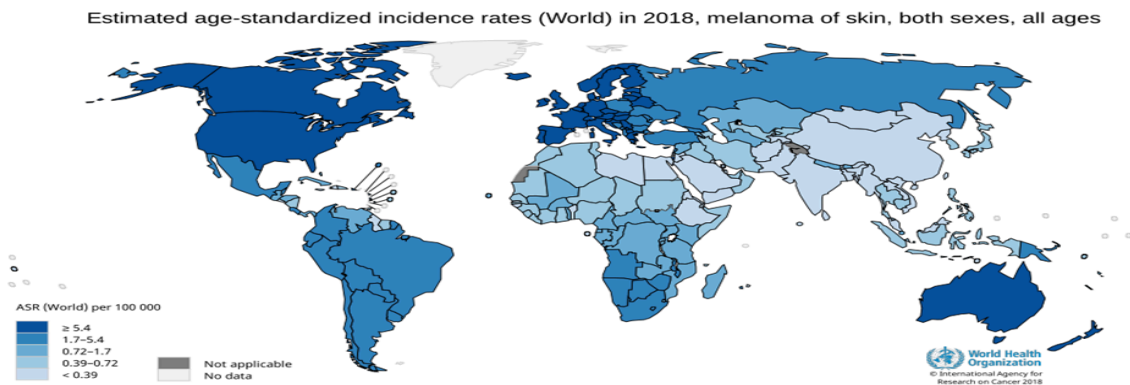
uno de los cánceres más frecuentes en adolescentes y jóvenes adultos. Además, se observa un creciente número de casos pediátricos.

- Medioambientales: relacionados fundamentalmente a la exposición a radiación ultravioleta (UV) y a su principal fuente, la luz solar. El daño generado por la radiación UV depende de la intensidad de la radiación, la cual está determinada por la ubicación geográfica, la hora y el tiempo de la exposición y el grado de protección (ropa o filtro solar). Las lámparas y cabinas bronceadoras son otra fuente de luz UV. En cuanto al cáncer de piel por melanoma, en el año 2018 Argentina se encontraba entre los países con una incidencia de cáncer media-alta (2,9 casos promedio por cada 100.000 habitantes), mientras que Australia,

Nueva Zelanda y Estados Unidos se ubicaron dentro de los países con mayor incidencia a nivel mundial (33,6; 33,3 y 12,7 casos promedio por cada 100 000 habitantes, respectivamente) (fig. 5).

- Color de piel: el riesgo de desarrollar melanoma es de alrededor de 1 en 50 para

las personas de tez blanca, 1 en 1.000 para las personas de raza negra, y 1 en 200 para las personas de origen indoamericano. Las personas de piel clara, pecosas, rubias y especialmente las personas pelirrojas tienen un mayor riesgo de desarrollar un melanoma.



**Figura 5. Casos de cáncer de piel atribuibles a melanomas por cada 100 000 habitantes para todas las edades y géneros en el año 2018.** Argentina ocupó el rango de incidencia media-alta (1,7 a 5,4 casos por cada 100.000 habitantes; con 2,9 casos promedio por cada 100.000 habitantes). Adaptado de <https://gco.iarc.fr/today/>.

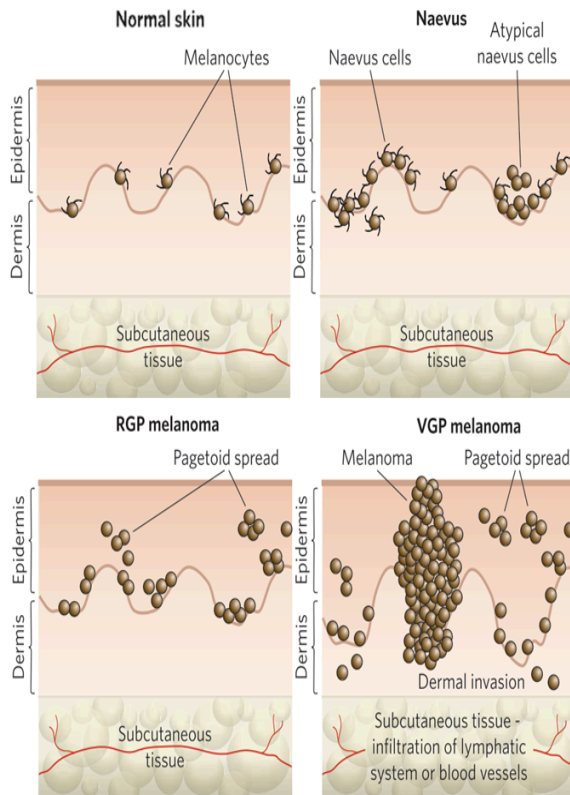
## Evolución

En 1984, Clark y colaboradores propusieron un modelo que describe los cambios histológicos que acompañan la progresión gradual de los melanocitos normales a melanoma. Este modelo comienza con una población clonal de melanocitos que han proliferado aberrantemente formando una lesión hiperplásica con crecimiento aberrante y citología atípica al azar que no progresa debido a que las células ingresan en un período de senescencia (lunar o nevo benigno). Cuando se supera la senescencia, debido a mutaciones, el lunar suele presentar un crecimiento displásico y puede eventualmente progresar hacia una etapa de

expansión superficial o fase de crecimiento radial (RGP, por sus siglas en inglés), que está confinada a la epidermis y tiene un bajo potencial invasivo. Finalmente estas células adquieren la habilidad de invadir la dermis (fase de crecimiento vertical, VGP) y de formar metástasis (fig. 6). De esta manera, cada una de las fases está caracterizada por un nuevo clon de células que posee ventajas de crecimiento en comparación con su entorno. El crecimiento vertical suele seguir al radial, aunque a veces ocurre desde el inicio, como en el caso del melanoma nodular, donde casi no existe crecimiento radial, por lo que entraña un peor pronóstico[15]. Los nevos se pueden desarrollar en forma congénita o ser

adquiridos durante la vida. Está aceptado que los nevos tienen su origen en una célula precursora mutada, y que las células tienden a proliferar, migrar y diferenciarse desde la

dermis hacia la epidermis[16]. Sin embargo, se han reportado casos de melanoma en ausencia de nevos[17].



**Figura 6. Progresión de la transformación de melanocitos.** Hay varias etapas en la lesión melanocítica, cada una de las cuales está marcada por un nuevo clon de células con ventajas de crecimiento sobre los tejidos aledaños. Primero, la piel normal (normal skin) presenta una distribución uniforme de los melanocitos dendríticos dentro de la capa basal de la epidermis. Luego, en las primeras etapas de la enfermedad, se forman los nevos melanocíticos benignos (naevus), con un mayor número de melanocitos dendríticos. Algunos nevos son displásicos con melanocitos morfológicamente atípicos. Finalmente, los nevos atípicos comienzan a crecer de forma radial (RGP). Esta etapa se considera como fase maligna primaria. Por último, el melanoma entra en una fase de crecimiento vertical (VGP). Esta etapa es la primera considerada con potencial maligno y conduce directamente al melanoma maligno metastásico, la etapa más mortal, por infiltración en los sistemas vascular y linfático[5].

El modelo estocástico propone que la mayoría de las células dentro de un tumor tienen el potencial de proliferar en forma extensa y dar lugar a nuevos tumores. En forma opuesta, el modelo de las células madres tumorales (CSC, por su sigla en inglés) propone para explicar la heterogeneidad de un tumor que sólo una subpoblación de células, llamadas células

madres tumorales o células iniciadoras de tumores, son capaces de proliferar en forma extensa y dar lugar a nuevos tumores. Es decir, propone un modelo jerárquico de heterogeneidad tumoral en donde las CSC, en forma análoga a las células madres normales, presentan capacidad de autorrenovación y de dar lugar a poblaciones de células tumorales menos proliferativas y más diferenciadas. De

hecho, las CSC serían la única población capaz de formar nuevos tumores luego de ser trasplantadas[18].

### **Diagnóstico**

La clasificación actualmente más utilizada para melanoma está basada en una combinación entre el patrón histológico adoptado por la WHO (*World Health Organization*) y el grado de avance de la enfermedad establecido por la AJCC (*The American Joint Committee on Cancer*). Esta clasificación define 4 subtipos de melanoma cutáneo. En el estadio 0, las células anormales se encuentran solamente en la epidermis. En el estadio I el cáncer se encuentra en la epidermis y/o en la parte superior de la dermis, pero no se ha diseminado a los ganglios linfáticos vecinos. El tumor tiene un grosor de menos de 1,5 mm. La sobrevida a 5 años es de 89-95%. En el estadio II el tumor tiene un grosor de 1,5 mm a 4 mm y se ha diseminado a la parte inferior de la dermis, pero no al tejido situado debajo de la piel ni a los ganglios linfáticos vecinos. La sobrevida a 5 años es de 45-77%. El estadio III se caracteriza por su diseminación a las capas más bajas de la piel, la presencia de tumores satélites cercanos al tumor original y la diseminación a los ganglios linfáticos. La sobrevida a 5 años es de 24-69%. En el estadio IV el tumor se ha diseminado a otros órganos o a ganglios linfáticos alejados del tumor original. La sobrevida a 5 años es de 5-20%[8].

### **Tratamientos actuales para el melanoma**

#### **Cirugía**

Actualmente, hay diferentes estrategias para combatir el melanoma, siendo la primera y más antigua, la cirugía[8]. En 2017, un análisis multivariado de 153.218 pacientes con melanoma en la *National Cancer Database* demostró que el retraso de

la cirugía después de la biopsia más allá de los 30 días impuso un mayor riesgo de mortalidad en comparación con el tratamiento dentro de los 30 días de la biopsia en el melanoma en estadio I[19]. Si bien aún están en debate los márgenes más apropiados para el melanoma, en general se acepta que los melanomas delgados de menos de 1 mm (estadio I) se pueden extirpar con márgenes de 1 cm[19].

#### **Quimioterapia**

En el caso de la quimioterapia, las técnicas más efectivas para atacar a las células tumorales consisten en dirigir las moléculas de fármacos directamente al ADN de las células malignas. La focalización nuclear no solo causa principalmente la muerte de las células tumorales, sino que también minimiza el daño a las células normales circundantes. El principal problema es evitar la translocación de agentes activos en vesículas endosómicas o lisosómicas. El mecanismo de administración de fármacos requiere de moléculas activas para escapar de las vesículas citoplasmáticas subcelulares y translocarse a los núcleos[16].

#### **Inmunoterapia**

La inmunoterapia es un tratamiento alternativo que activa el sistema inmune del paciente para inducir la estabilización o cronificación de la enfermedad. En contraste con los otros enfoques, la inmunoterapia apunta principalmente a prevenir la propagación metastásica de la enfermedad[1]. Aunque el sistema inmune es capaz de reconocer y eliminar las células cancerosas, el tumor interfiere con las respuestas inmunes[20]. Debido a la inestabilidad genética de las células cancerosas, generalmente expresan proteínas anormales conocidas como antígenos asociados a tumores (TAA), con expresión

nula o mínima en células normales. Tales TAA exponen nuevos epítopes potencialmente inmunogénicos que pueden ser reconocidos por el sistema inmune, quien procede a su ataque. Actualmente, se utilizan anticuerpos monoclonales inhibidores de puntos de control inmune dirigidos a PD-1 o PD-L1 (proteína de muerte celular programada 1 o su efector) y CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos) con resultados prometedores en el aumento de la supervivencia y enfermedad libre de progresión[8][21].

### **Resistencia a los tratamientos**

Las células cancerosas desarrollan mecanismos de resistencia intracelular, como la sobreexpresión de las bombas de eflujo de drogas, el metabolismo y el secuestro en compartimentos ácidos y la desactivación de los fármacos[1].

### **El rol de los transportadores**

Los transportadores son parte integral de las proteínas de la membrana plasmática. Su principal función biológica es la absorción selectiva de sustancias, como aniones, cationes, vitaminas, azúcares, nucleósidos, aminoácidos, péptidos, y la exclusión de metabolitos celulares y xenobióticos. Estas proteínas de flujo de salida están sobreexpresadas en células tumorales, lo que conduce a la resistencia a los medicamentos en la quimioterapia. Se han identificado casi 2.000 genes que expresan transportadores o proteínas relacionadas con transportadores. Por ejemplo, los transportadores ABC representan la familia más grande de proteínas de transmembrana. Según la estructura del dominio y homología en la secuencia, estas proteínas se clasifican en siete clases (ABCA-ABCG). Los transportadores ABC funcionan de manera unidireccional y consumen ATP para translocar las sustancias. Los transportadores

de eflujo ABC más importantes son P-gp (glicoproteína P), MRP (proteína de resistencia a multidroga) y BCRP (proteína de resistencia del cáncer de mama), y se expresan en barreras fisiológicas como la barrera de absorción intestinal, la barrera placentaria, las barreras corneales y retinianas, y en el hígado y las células cancerosas. Estos transportadores influyen significativamente en la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de varias drogas y son en parte responsables de la resistencia a la quimioterapia[1].

### **Quimioterapia y la resistencia a las drogas**

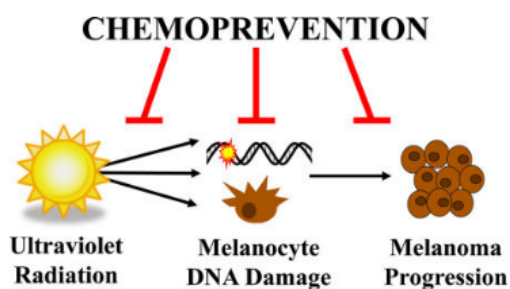
La quimioterapia es uno de los principales tratamientos en cáncer. A pesar de los avances en el descubrimiento de fármacos y los esquemas de tratamientos, los pacientes adquieren resistencia a múltiples drogas (MDR). En consecuencia, la respuesta a la quimioterapia permanece muy por debajo de las expectativas[22]. Si bien, inicialmente las células cancerosas responden a la quimioterapia, la recaída es común. Los mecanismos de resistencia incluyen modificaciones en el metabolismo y el transporte de las drogas, mutaciones genéticas varias y en particular ciertas mutaciones que conducen a la reparación del ADN e inhibición de la apoptosis. La heterogeneidad genética tumoral es otro aspecto de la resistencia a los medicamentos donde una pequeña subpoblación permanece inactiva y no responde a la quimioterapia, pero a medida que las células tumorales sensibles van muriendo, estas células emergen como un tipo virulento que se vuelve difícil de tratar. La resistencia a los medicamentos es un proceso que implica mecanismos farmacocinéticos y farmacodinámicos muy complejos[22].

## Prevención

### Protectores solares

La forma más fácil de prevenir los daños producidos por la exposición a los rayos UV es la aplicación tópica de protectores solares en las áreas expuestas al sol (**fig. 7**). Los protectores solares inorgánicos exhiben propiedades absorbentes, reflectantes y de dispersión de la luz para que la radiación UV no llegue ni penetre en la piel. Los dos agentes inorgánicos actualmente aprobados por la

FDA son dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) y óxido de zinc (ZnO). Se considera que estos agentes son valiosos debido a su amplia gama de capacidades de protección, que abarcan las longitudes de onda de UVB y UVA, como así también su fotoestabilidad. Otro grupo de agentes de protección solar son los filtros orgánicos, quienes generalmente impiden que los rayos UV lleguen a la piel al absorberlos a través de ciertas estructuras químicas y convertirlos en calor. Actualmente hay 15 ingredientes activos en protectores solares orgánicos aprobados por la FDA[8].



**Figura 7.** La exposición a la radiación ultravioleta es una de las principales causas de cáncer de piel, incluido el melanoma. Las estrategias y terapias preventivas actuales no son suficientes para reducir la incidencia o mortalidad asociada al melanoma, por lo tanto, es necesario explorar nuevas estrategias terapéuticas y quimiopreventivas para el tratamiento de esta enfermedad[8].

### Vitaminas

El papel de las vitaminas como agentes quimiopreventivos ha sido un área de creciente interés en la comunidad científica. La desregulación del metabolismo celular es un componente clave en la proliferación celular descontrolada característica del cáncer. La acción de las vitaminas sobre los mecanismos enzimáticos es un elemento clave para la homeostasis del metabolismo y la diferenciación celular en varios órganos. Se ha demostrado que las vitaminas A, C, D, E y K ejercen efectos quimioterapéuticos contra varios tipos de cánceres[23], pero solo un número limitado

de estudios han sugerido una posible utilidad de estas vitaminas en la prevención del melanoma.

### Terapia Génica

Más de 2 900 ensayos clínicos de terapia génica se han realizado y aprobado desde el año 1989 hasta el 2 018 (**fig. 8**). Se han introducido varios abordajes que incluyen terapia génica suicida, terapia génica inmunomoduladora, modulación genética, terapia génica proapoptótica y correctiva, terapia génica antiangiogénica y terapia con ARNpi (**fig. 9**).

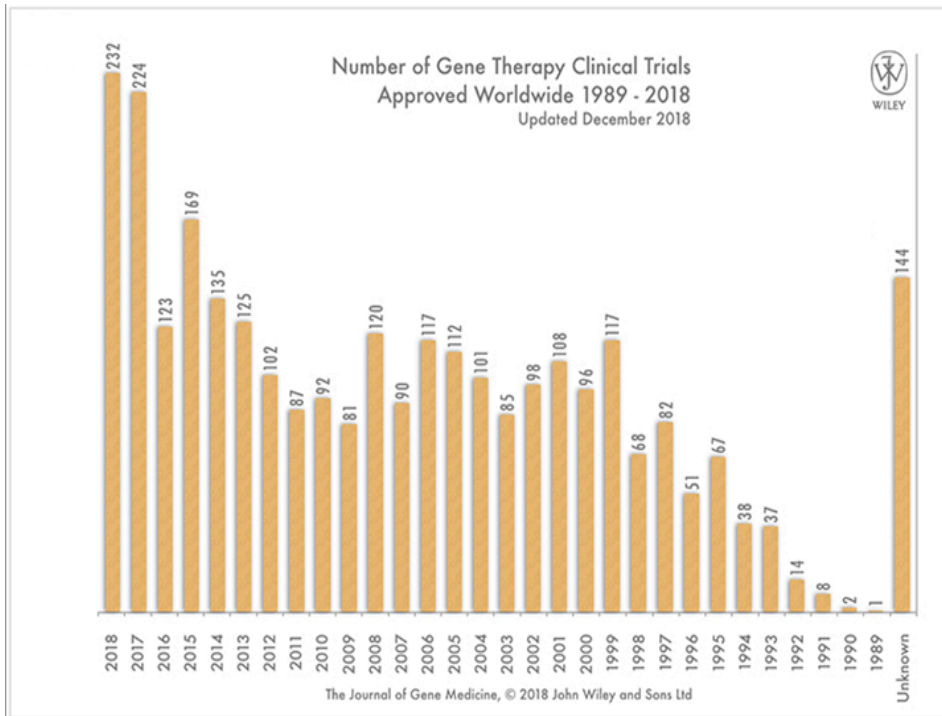


Figura 8. Número de protocolos clínicos de terapia génica aprobados en todo el mundo desde 1989 a 2018. Adaptado de <http://www.abedia.com/wiley/>.

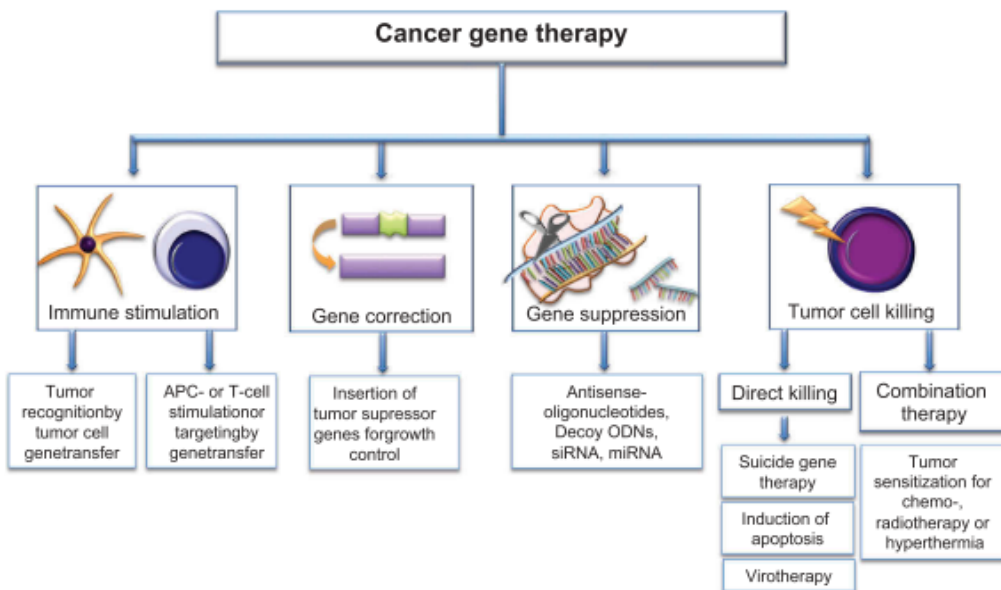


Figura 9. Esquema de las principales estrategias en terapia génica contra el cáncer. Las diferentes estrategias tienen como objetivo estimular la respuesta inmune contra el tumor, la muerte del tumor y reducir su crecimiento y resistencia[24].

En comparación con la quimioterapia convencional que puede causar una alta toxicidad sistémica debido a la falta de especificidad, la terapia génica funciona a

nivel molecular, en el que se insertan materiales genéticos o genes funcionales en las células de los pacientes para reparar o

reemplazar los genes defectuosos o atacar el tumor[1].

En cuanto al número de protocolos clínicos que utilizan terapia génica como estrategia, Estados Unidos es el principal productor a nivel mundial con un total de

1.793 ensayos llevados a cabo hasta el año 2019. La mayor parte (~ 67%) de los ensayos han sido dirigidos al cáncer. Sin embargo, pese a la gran cantidad de protocolos clínicos llevados a cabo, solo el 0,2% llegan a fase IV (fig. 10).

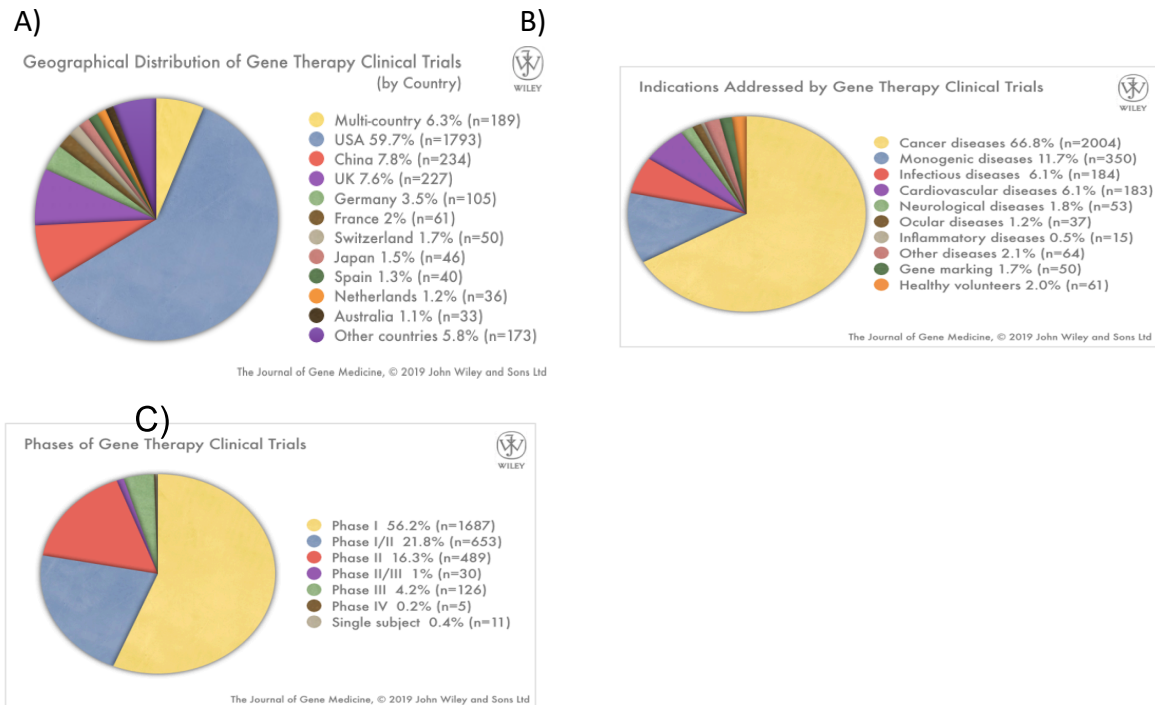


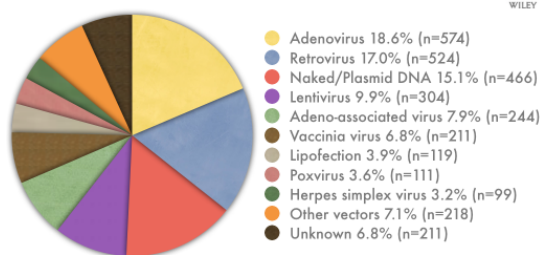
Figura 10. A) Distribución geográfica de ensayos clínicos de terapia génica por país. B) Ensayos clínicos de terapia génica en distintas patologías. C) Ensayos clínicos de terapia génica según su avance (fases de I a IV). Datos informados hasta el año 2019. Adaptado de <http://www.abedia.com/wiley/>.

### Vectores y estrategias usados en la terapia génica para tratar el cáncer

Actualmente, más del 66% de los protocolos clínicos de terapia génica en todo el mundo están destinados al tratamiento de neoplasias sólidas o hematológicas, siendo los adenovirus los vectores más utilizados en los protocolos clínicos (fig. 11). Sin embargo, las limitaciones de los vectores virales, como por ejemplo, mutaciones que derivan en

inserciones no deseadas o la inmunogenicidad, han dado lugar al desarrollo de vectores no virales[25]. Gracias a las nuevas tecnologías, los vectores no virales son capaces de expresar genes de manera eficiente, mientras que exhiben baja toxicidad e inmunogenicidad. Además, son más seguros y económicos de producir, lo que los hace atractivos para su aplicación en la clínica.

Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials



The Journal of Gene Medicine, © 2019 John Wiley and Sons Ltd

**Figura 11. Vectores utilizados en ensayos clínicos de terapia génica.** Adaptado de <http://www.abedia.com/wiley/>.

Tanto para los vectores virales como no virales, el mayor desafío sigue siendo su aplicabilidad *in vivo*. Una transferencia génica exitosa depende de la estabilidad del vector, su protección contra la degradación y su capacidad para llegar específicamente al lugar de acción que le corresponde[24].

### Sistemas de vectores no virales

Los vectores plasmídicos representan una importante plataforma para la transferencia génica, ya que son seguros, estables durante el almacenamiento, fáciles de manipular y relativamente baratos de producir. Estos vectores son moléculas pequeñas circulares de ADN doble cadena capaces de replicarse en células bacterianas sin integrarse al genoma. Sin embargo, cuando están desnudos resultan vulnerables a la degradación y solo permiten la expresión génica transitoria episomal que generalmente resulta baja. Por lo tanto, se han llevado a cabo varias modificaciones para mejorar la estabilidad, la persistencia, la capacidad de dirigir al ADN plasmídico hasta su lugar de acción, la mejora de la transferencia génica y la optimización para

aumentar la expresión génica[24]. Por ejemplo, se demostró que al sustituir la terminación de poliA por un poliA sintético o del virus SV40 aumentó la vida media del ADN plasmídico superenrollado[26]. Además, la selección del promotor es de suma importancia para la expresión del transgén, como los promotores tejido específicos que permiten una expresión selectiva y eficiente[27]. El tamaño de estos vectores varía de 0,8 a 120 Kb y el tamaño del transgén tiene pocas restricciones[24].

### Sistemas de transferencias no virales

Un requisito clave para una terapia génica no viral eficiente es la transferencia efectiva de los vectores. Las estrategias de terapia génica incluyen principalmente métodos físicos (inyección a presión, electroporación, ultrasonido, magnetofección, transferencia balística de ADN) y químicos (lípidos catiónicos, polímeros catiónicos y la combinación de ambos) para introducir a los vectores en el lugar blanco (**fig. 12**). Estos métodos pueden aplicarse localmente o sistémicamente [24].

## CHEMICAL DELIVERY

## PHYSICAL DELIVERY

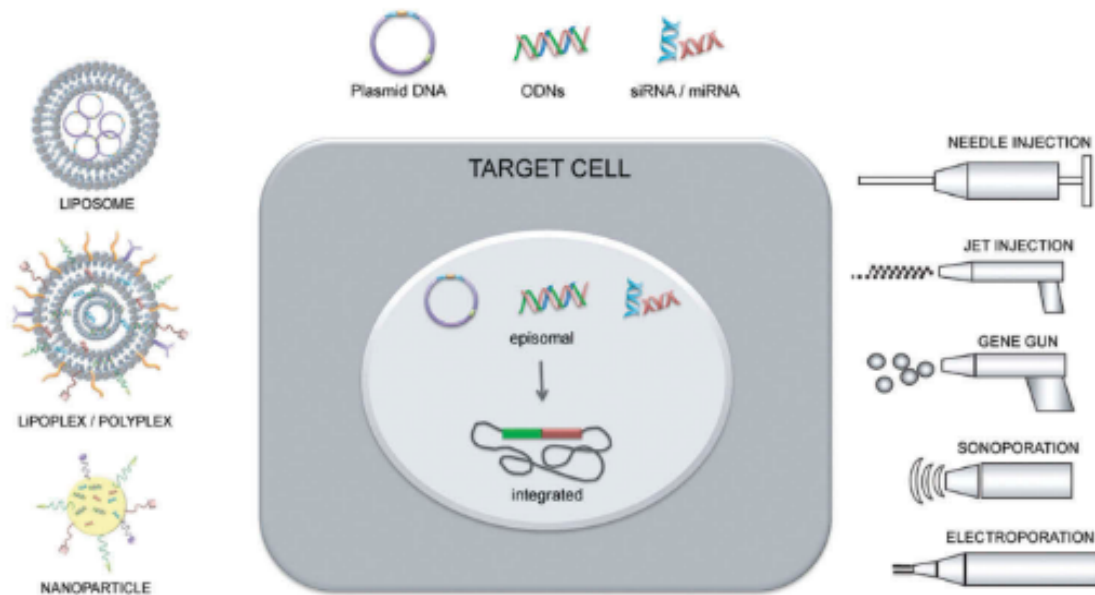


Figura 12. Sistemas físicos (electroporación, ultrasonido, inyección) y químicos (liposomas, poliplex, nanopartículas) de transferencia génica. Las tecnologías se utilizan para mejorar la transferencia de vectores no virales en los tumores. Algunas de estas tecnologías ya están bajo evaluación clínica[24].

### Lípidos catiónicos

Los vectores de lípidos catiónicos (liposomas) se encuentran entre los vectores no virales más utilizados y se han desarrollado cientos de lípidos para la transferencia de genes, incluidos los lípidos catiónicos sintéticos[28]. Todos los lípidos catiónicos se caracterizan por tres grupos estructurales: un extremo con carga positiva, un extremo hidrofóbico y un grupo que conecta ambos extremos. Se pueden realizar numerosas modificaciones a fin de aumentar la eficiencia de la transfección, la estabilidad y disminuir la toxicidad. Algunos de los lípidos más usados son DOSPA (2,3-dioleiloxi-N-[2 (esperminacarboxamido) etil] -N, N-dimetil-1-propanamino trifluoroacetato), DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propan), DMRIE (bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxietilamónio) y DC-colesterol (3b-N-

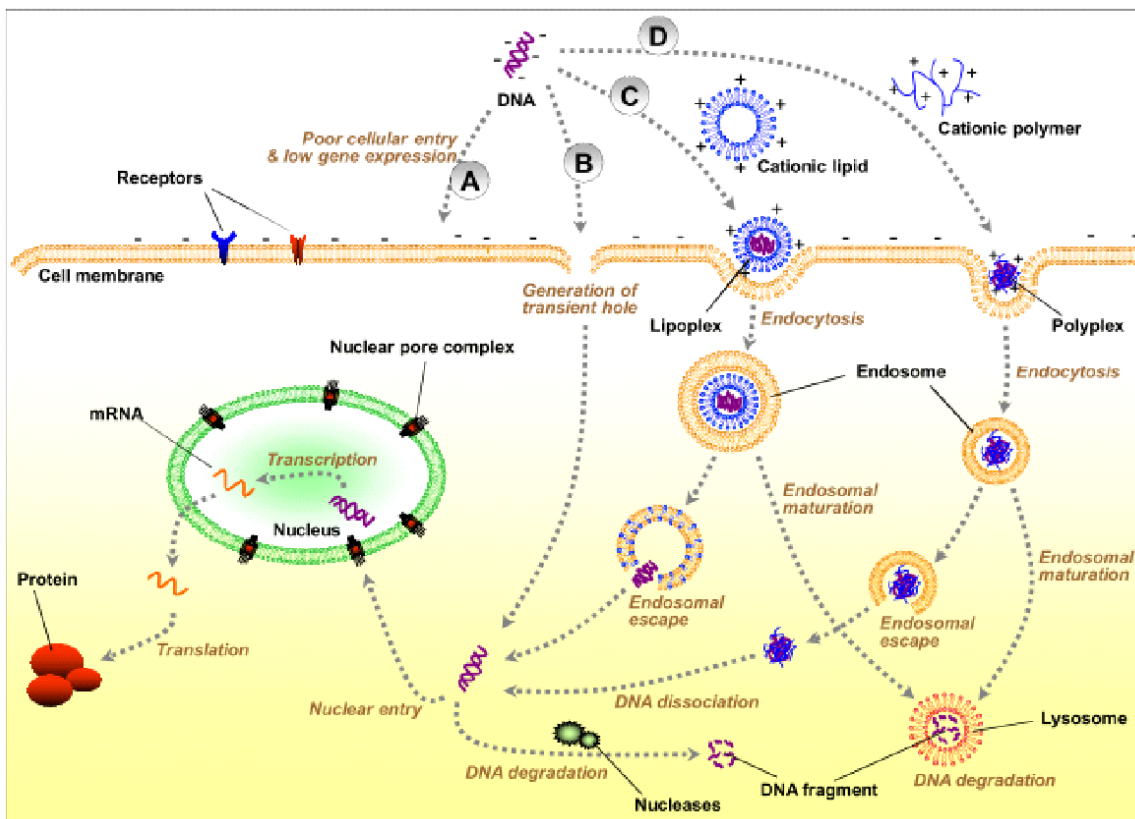
(dimetilaminoetil) carbamato-colesterol). Uno de los mayores problemas del uso de lípidos catiónicos para la transferencia génica se debe a su alta toxicidad debido a la carga positiva, baja especificidad y alta sensibilidad que presentan a los componentes del suero, lo que dificulta un uso sistémico eficiente en los ensayos clínicos. Por lo tanto, se han incluido en las formulaciones liposomales los denominados colípidos, como la 1,2-dioleil-fosfatidiletanolamina (DOPE) o el colesterol, para mejorar la actividad y la estabilidad de la transfección y disminuir la toxicidad, ya que son neutros[29].

Cuando el ADN se mezcla con los lípidos, se forman los complejos denominados *lipoplexes* que ingresan a las células por fusión de membrana o por endocitosis. Una vez en el endosoma, el ADN tiene que escapar para evitar la degradación lisosómica y a las nucleasas citoplasmáticas para ingresar al núcleo que es donde ocurre

la transcripción. El ADN atraviesa la envoltura nuclear a través del complejo del poro nuclear (NPC) o se une directamente a la cromatina durante la mitosis (**fig. 13**)[29].

La mitad de los nanofármacos aprobados por la FDA para tratamientos anticancerígenos en humanos se basan en

formulaciones liposomales de fármacos citostáticos como la daunorrubicina para el sarcoma de Kaposi asociado al virus de inmunodeficiencia humana (VIH), bortezomib para el mieloma múltiple, vincristina para la leucemia linfoblástica aguda e irinotecán para el cáncer pancreático metastásico[30].



**Figura 13.** Captación y tráfico intracelular de liposomas catiónicos complejados con ADN (*lipoplexes*). Los *lipoplexes* entran a la célula principalmente por endocitosis. El pH bajo de los endosomas provoca la fusión entre el liposoma y la membrana endosomal. El ADN es liberado al citosol, ya sea libre o asociado a los lípidos, y luego es transportado al núcleo para su transcripción. La fusión también puede ocurrir en la membrana plasmática, liberando directamente al ADN en el citosol[29].

### Terapia génica suicida

La terapia génica suicida se ha desarrollado particularmente para el tratamiento del cáncer y se ha trasladado a ensayos clínicos de fase I y II. Numerosas enzimas de origen bacteriano o viral fueron clonadas y expresadas en células tumorales (**fig. 14**). Estas enzimas pueden convertir prodrugs no tóxicas en metabolitos tóxicos,

matando a las células tumorales y a las células vecinas a través del efecto *bystander*. Los miembros más destacados de estos genes suicidas son la timidina quinasa del virus del herpes simple I (HSVtk), la citosina desaminasa (CD) de *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli*, el citocromo P450-2B1 y la nitrorreductasa. Los últimos desarrollos relacionados con estos genes

suicidas fueron destinados a su optimización mediante variantes mutadas o su fusión a otras enzimas suicidas. Estos desarrollos

permitieron una conversión más eficiente de las prodrogas o el uso alternado de prodrogas para el tratamiento del cáncer[24].

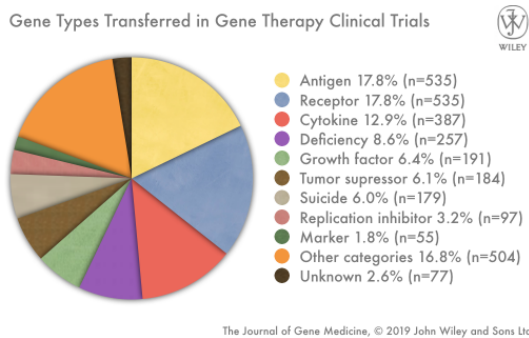


Figura 14. Genes utilizados en ensayos clínicos de terapia génica. Adaptado de <http://www.abedia.com/wiley/>.

### Oncología veterinaria

El cáncer es la principal causa de muerte en los animales de compañía. El 50% de los perros inmunocompetentes mayores a 10 años desarrollará cáncer y el 25% de ellos morirá debido a una neoplasia[31]. El

melanoma maligno es más común en el perro que en otras especies y en la mayoría de los casos surge en la cavidad oral (mucoso), piel (cutáneo), epitelio de la uña y almohadilla del pie (subungueal y acral) y con menor frecuencia, ocular (uveal) (fig. 15)[32].

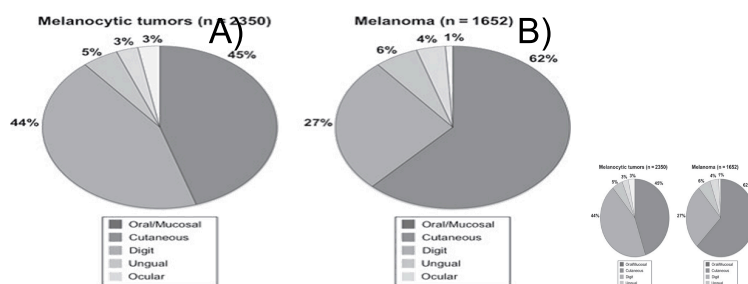


Figura 15. Distribución de tumores melanocíticos caninos según el sitio anatómico de formación. A) Porcentajes calculados a partir de 2350 tumores melanocíticos. Se incluyen los tumores benignos (30%; n = 698) y malignos (70%; n = 1652). B) Porcentajes obtenidos a partir de 1652 tumores malignos (melanomas)[33].

En Estados Unidos se han reportado hasta 100.000 casos por año. La edad media de los perros con neoplasias melanocíticas benignas y malignas en el momento del diagnóstico fue de 8,1 y 11,6 años, respectivamente[34]. En Italia, la incidencia promedio reportada fue de 0,7 casos cada 100.000 perros/año en machos y 0,6 casos cada 100.000 perros/año en hembras, para todas las edades, lo que representó el 0,7%

de todos los tipos de cáncer en machos y el 0,2% en hembras[35].

Las neoplasias melanocíticas cutáneas en perros generalmente tienen un pronóstico favorable, en contraste con la mayoría de los melanomas orales/mucosos y acrales (fig. 16)[36]. Se cree que los rayos UV no desempeñan un papel importante en el melanoma cutáneo canino debido a la capa protectora de pelo. Los pacientes caninos con

melanoma mucoso tienen una mediana de supervivencia que oscila entre 3 y 18 meses,

dependiendo del estadio en el momento del diagnóstico[37].

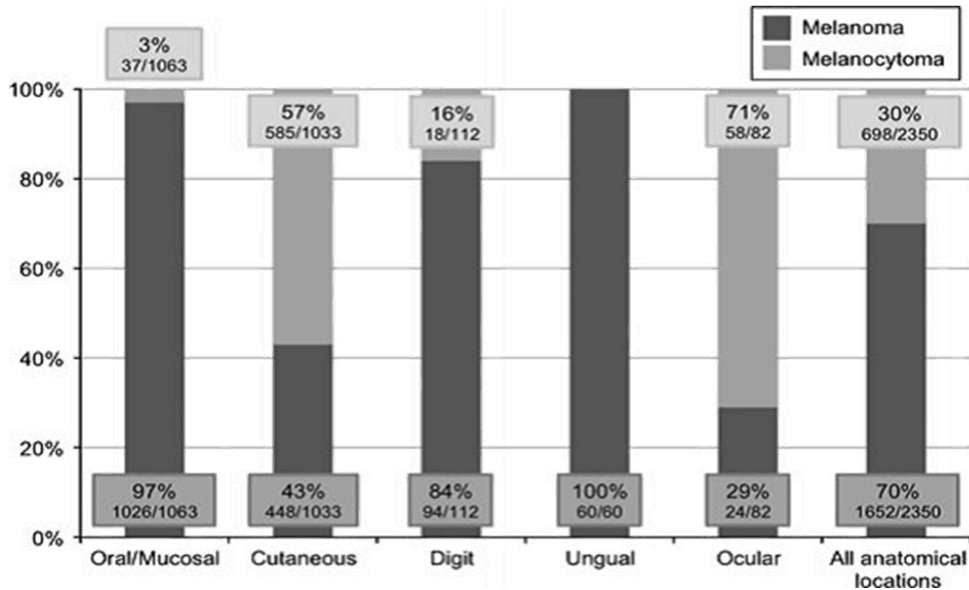


Figura 16. Distribución de 2350 tumores melanocíticos caninos por localización y correlación con la malignidad. Proporción de melanoma y melanocitoma benigno[33].

El melanoma mucoso canino es altamente agresivo con metástasis frecuentes, especialmente en los ganglios linfáticos y pulmones (**fig. 17**). Algunas razas de perros están sobrerrepresentadas en los estudios y pueden estar predispuestas a desarrollar la enfermedad, como por

ejemplo, Caniche, Pastor de Beauce, Rottweiler, Schnauzer, Terrier Escocés y Labrador. En general, las razas con pelo negro están más sobrerrepresentadas que las razas con pelo claro o blanco que están subrepresentadas en términos del desarrollo de tumores melanocíticos[38].

A)

B)

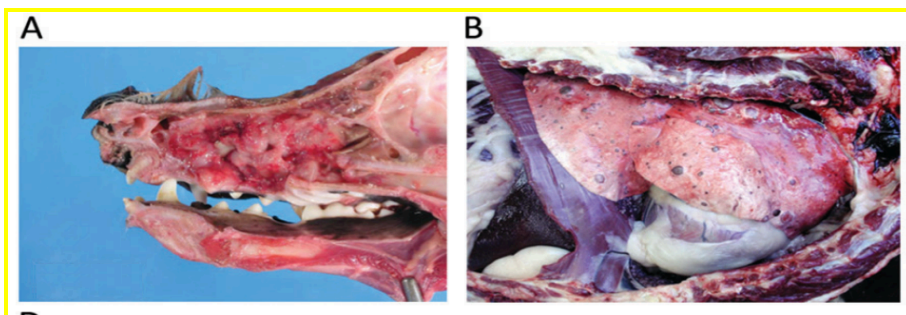


Figura 17. A) Melanoma canino desarrollado en la cavidad nasal y B) se extiende a las vísceras, particularmente al hígado[32].

### Ventajas del modelo canino en oncología comparada del melanoma

El perro doméstico es un modelo atractivo y útil en la medicina comparativa para la evaluación y el desarrollo de estrategias terapéuticas novedosas y relacionadas con la inmunología. A diferencia de los xenotransplantes tumorales murinos, los tumores caninos comparten con los tumores humanos una epidemiología, genética, biología, respuesta al tratamiento, factores de pronóstico y resultados clínicos similares (**fig. 18**). Se estima que la tasa de éxito general de traducir las terapias contra el cáncer de modelos preclínicos murinos a tratamientos con utilidad clínica en humanos es de alrededor del 5%[32].

El cáncer ocurre en perros de forma natural y espontánea y su progresión es similar a la de los humanos. Finalmente, los perros comparten el mismo entorno de vida y, por lo tanto, los factores cancerígenos y de riesgo. Similar a las personas, la incidencia de cáncer en perros aumenta con la edad, con una frecuencia del 50% en animales mayores de 10 años. Por lo tanto, el perro doméstico es un modelo recomendado para múltiples enfermedades humanas, incluidos los cánceres como leucemia, linfoma no Hodgkin, mama, melanoma, osteosarcoma, próstata, vejiga y los carcinomas de pulmón, cabeza y cuello[39].



**Figura 18.** El modelo canino es de gran importancia en la oncología comparativa y estudios inmunológicos. Los perros comparten con el humano el mismo entorno, similitudes genéticas y fisiológicas, y la tumorigénesis y progresión del cáncer es similar en ambas especies[39].

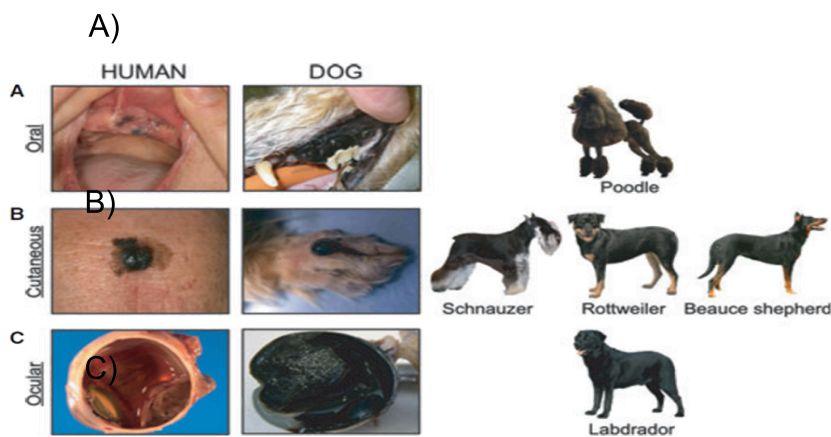
El genoma canino fue secuenciado en 2005, lo que condujo a estudios más avanzados en el campo de las ciencias veterinarias. El genoma canino comparte con el humano una gran similitud; de hecho, el ADN y las secuencias de proteínas de perro

son más similares a las de humano que entre humano y ratón[40]. Debido a esta similitud, las herramientas moleculares para el estudio de las enfermedades caninas están bastante avanzadas y además, una gran proporción de anticuerpos generados contra antígenos

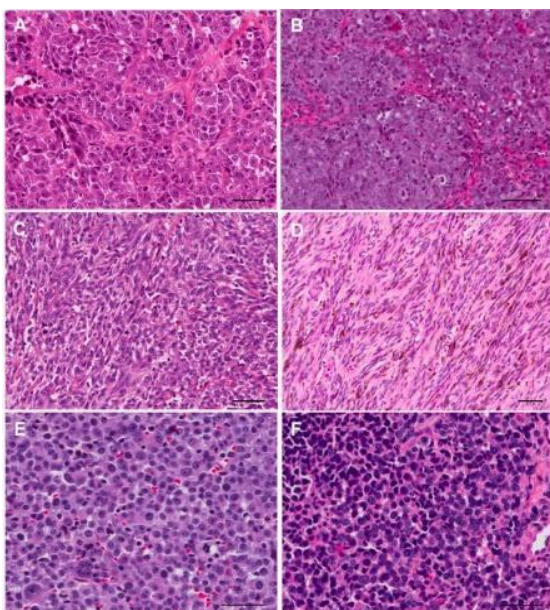
humanos funcionan contra las proteínas caninas[32].

El melanoma mucoso canino y humano comparte características histopatológicas sustanciales (figs. 19 y 20). Según un estudio de consenso realizado por el National Cancer Institute Comparative Melanoma Tumor Board[41], el melanoma mucoso canino y humano comparten una propensión a hacer metástasis en los

linfáticos regionales y en cerebro, como así también en otros órganos viscerales. Los tumores de ambas especies son generalmente resistentes a la quimioterapia y la radioterapia. En oncología veterinaria, el tratamiento para los perros con melanoma consiste principalmente en cirugía, con opciones de radioterapia hipofraccionada o definitiva y quimioterapia con carboplatino[37].



**Figura 19. Aspecto clínico de melanoma A) oral, B) cutáneo, C) ocular.** Comparación macroscópica entre melanomas humano y canino y las principales predisposiciones de razas caninas para cada tipo de patología (A: Caniche; B: Schnauzer, Rottweiler, Pastor Beauce; C: Labrador Retriever)[33].



**Figura 20. Similitudes entre las características histopatológicas de melanoma mucoso humano (A, C, E) y canino (B, D, F).** Las citomorfologías en ambas especies incluyen (A, B) melanocitos malignos epitelioides (poligonales), (C, D)

melanocitos malignos ahusados y (E, F) melanocitos malignos pequeños, azules y redondos (E, F). Fotografías de tejidos teñidos con hematoxilina y eosina. Barra = 50  $\mu\text{m}$ [37].

Similar al melanoma mucoso humano, el melanoma mucoso canino ocurre en zonas con un bajo riesgo de mutaciones inducidas por los rayos UV. Aunque no está definido por completo, el panorama genético-molecular del melanoma mucoso canino presenta grandes similitudes con los melanomas humanos mucoso y acral[37]; en contraste con el melanoma cutáneo humano que tiene a la radiación UV como factor de riesgo, con lo cual, el melanoma mucoso canino presenta mutaciones diferentes a las del melanoma cutáneo humano. La mutación BRAFV600E se encuentra en aproximadamente el 6% de los melanomas orales caninos, al igual que las mutaciones BRAF no canónicas[42]. También se han encontrado mutaciones NRAS en el mismo lugar que las del melanoma humano (el residuo correspondiente a Q61), y se han informado mutaciones de pérdida de función en PTEN[33]. Si bien los reordenamientos estructurales no se han investigado exhaustivamente en el melanoma mucoso canino, se han identificado alteraciones cromosómicas ortólogas en los perros. Por otra parte, tanto el melanoma mucoso canino como el humano frecuentemente exhiben la activación de la vía de señalización RAS/MAPK y/o PI3K/AKT/mTOR[37].

Además, el estudio en perros permite una evaluación más temprana de los efectos sobre la progresión de la enfermedad y la supervivencia general, ya que la vida de los perros es mucho más corta que la de los humanos y en general, los cánceres caninos progresan más rápidamente. Por otra parte, los nuevos fármacos se prueban comúnmente en beagles de laboratorio para detectar toxicidad, por lo que la seguridad inicial y, a veces la farmacodinámica y la

farmacocinética, ya se conocen para los perros[32].

### **Tratamientos para el melanoma canino**

Los perros domésticos reciben terapia que van desde la cirugía, radiación y quimioterapia hasta terapia molecular dirigida e inmunoterapia. El tratamiento convencional para el melanoma oral en perros implica la resección quirúrgica y/o la radiación del tumor primario para controlar la enfermedad local. En cuanto a la metástasis, la mayoría son resistentes a la quimioterapia lo que deriva en tratamientos mucho menos exitosos. Frente a la necesidad de una mejora en el tratamiento para esta enfermedad, se han desarrollado una gran variedad de enfoques inmunoterapéuticos [32].

Una vacuna contra el melanoma producida comercialmente (ONCEPT, Sanofi) está disponible y ha demostrado eficacia en el melanoma canino en comparación con los controles históricos[43], pero existe controversia en cuanto al nivel de efecto cuando no ha habido un ensayo aleatorio[44] y algunos estudios no han podido mostrar un efecto sobre el resultado clínico[45]. Otros enfoques inmunomoduladores con citoquinas y vacuna de ADN contra el proteoglicano condroitín-4-sulfato se han aplicado experimentalmente en pequeños grupos de perros y han mostrado cierto potencial[46][47][48]. También están disponibles comercialmente para su uso clínico los fármacos inhibidores de la tirosina quinasa, que como ya se mencionó, hay una serie de genes receptores de tirosina quinasa que están mutados en melanomas caninos[49].

## **Inmunoterapia**

El sistema inmune innato y adquirido en los perros es similar al de los humanos. Sin embargo, pese a que los principales subconjuntos de células inmunes identificados en perro y sus marcadores de superficie presentan similitudes con los del humano, no se conoce su total funcionamiento debido a la falta de reactivos específicos para su caracterización[50]. La proteína de muerte programada-1 (PD-1) es una molécula de control de las células T. En los últimos años, el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a esta molécula ha logrado un éxito notable en el tratamiento del cáncer, incluido el melanoma en humanos[51][52]. Hasta ahora, hay estudios limitados acerca de la inhibición de PD-1 en melanoma canino pero que indican que el modelado tiene potencial[53][54]. Se sabe que los genes caninos PD-1 y PD-L1 están altamente conservados y se demostró la expresión de PD-L1 en diversos tipos de células tumorales caninas. Además, se demostró que PD-1 está sobreexpresado en linfocitos infiltrantes de tumores obtenidos de melanoma oral canino[37][39][55].

## **Terapia Celular**

Otro avance en la inmunoterapia contra el cáncer implica la ingeniería *ex vivo* y el direccionamiento de las células T a antígenos tumorales específicos (células T con receptor de antígeno quimérico, CAR-T, por sus siglas en inglés). Generar células T específicas de tumor implica la expansión *ex vivo* de grandes cantidades de células T autólogas, seguido por la transfección de las células con receptores de células T específicos del tumor o con anticuerpos específicos de antígeno tumoral y por último, la reintroducción de las células T autólogas modificadas en el paciente[37]. Hay protocolos clínicos veterinarios en fase II

dirigidos a gp100 asociada a melanoma mucoso canino que utilizan vacunas de células alogénicas que expresan gp100 humano con resultados alentadores[56][57]; sin embargo, este tipo de terapia celular es costosa, requiere técnicas sofisticadas que solo están disponibles en un número limitado de laboratorios y, por lo tanto, no se aplica de rutina a perros con melanoma[37].

## **Terapia con citoquinas**

Las citoquinas son un grupo de proteínas de señalización producidas por las células del huésped en respuesta a patógenos como virus, bacterias y células tumorales. Las citoquinas y el sistema inmune innato son partes inherentes de la respuesta del huésped que han sido utilizadas en estudios para provocar efectos antitumorales en melanomas caninos. Entre las terapias antitumorales con citoquinas, los resultados más prometedores se han observado con la interleuquina 2 (IL-2)[47][58][59]. Otro grupo de citoquinas corresponde a los IFN tipo I, que comprenden IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  y son conocidos por sus efectos antivirales, inmunomoduladores y antiproliferativos[60]. Se cree que el IFN $\beta$  es un factor importante en el crecimiento del melanoma, ya que se han encontrado delecciones homocigóticas en los genes del IFN tipo I en melanomas, y en comparación con el IFN $\alpha$ , el IFN $\beta$  tiene mayores efectos antiproliferativos y antiinvasores en las células de melanoma[61].

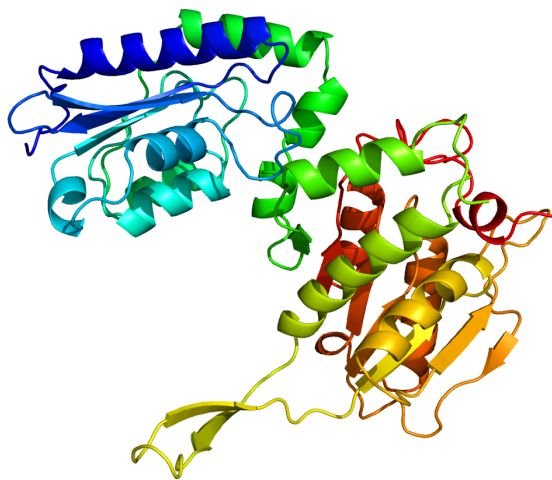
## **Terapia adyuvante**

La terapia adyuvante es un tratamiento adicional en el contexto de una cirugía para prevenir la recurrencia de una enfermedad. En el caso del cáncer, hay varios protocolos clínicos llevados a cabo con terapia génica suicida y como ya se mencionó, uno de los miembros más

destacados de estos genes es la citosina desaminasa (CD), que puede estar fusionada a la uracilo fosforribosiltransferasa (UPRT) (**fig. 21**), y en conjunto catalizar la conversión de la prodroga no tóxica 5-fluorocitosina (5-FC) en la quimiodro

Uracilo  
fosforribosiltransferasa

(5-FU), que es altamente tóxica. La enzima CD cataliza el paso de 5-FC a 5-FU, que interfiere con la replicación del ADN, mientras que UPRT conduce a la síntesis de 5-FUTP que inhibe el procesamiento del ARN (**fig. 22**)[62].



Citosina  
deaminasa

**Figura 21. Estructura de las enzimas citosina deaminasa y uracilo fosforribosiltransferasa fusionadas de *Saccharomyces cerevisiae*.** Se muestra la estructura de las proteínas de fusión predicha por el programa Phyre2. Para el modelado en 3D se utilizó la secuencia de aminoácidos ID: P18562.2 del organismo *Saccharomyces cerevisiae* taxid:4932.

Los medicamentos denominados antimetabolitos tienen como blanco inhibir los procesos biosintéticos esenciales o incorporarse a macromoléculas, como el ADN y el ARN, e inhibir su función normal. La fluoropirimidina 5-fluorouracilo (5-FU) hace ambas cosas. Las fluoropirimidinas se desarrollaron en la década de 1950 después

de descubrir que los hepatomas de rata usaban al uracilo, una de las cuatro bases que se encuentran en el ARN, más rápidamente que los tejidos normales, lo que sugirió que el metabolismo del uracilo podría ser un potencial blanco de la quimioterapia antimetabólica [63].

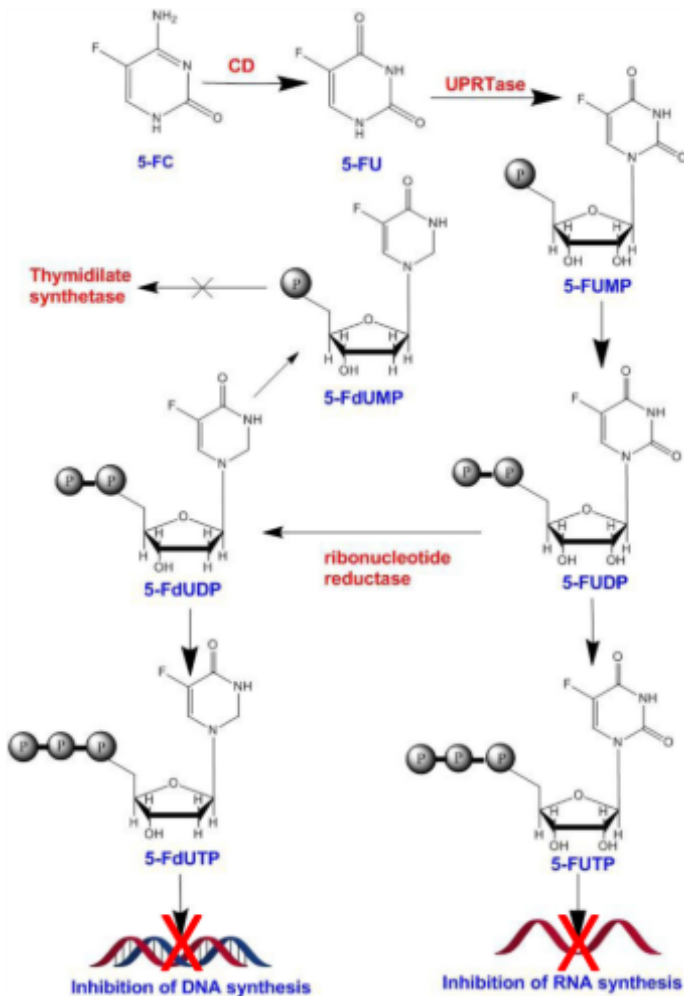


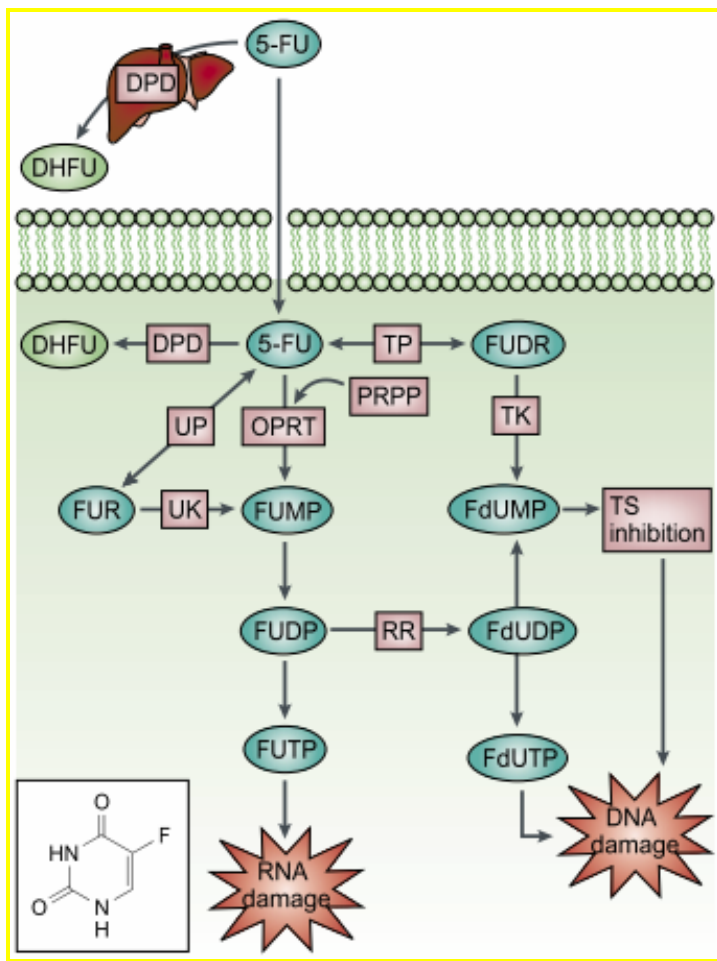
Figura 22. Conversión de 5-FC en 5-FU y sus metabolitos citotóxicos por acción de las enzimas citosina desaminasa (CD) y uracilo fosforribosiltransferasa (UPRTase). El producto 5-FU se convierte en 5-FUMP y finalmente en 5-FUTP, que bloquea la síntesis de ARN. Otros subproductos como 5-FdUMP y 5-FdUTP bloquean la síntesis del ADN al incorporarse por error en las cadenas de ADN durante su replicación[64].

El 5-FU es ampliamente utilizado en el tratamiento de diversos tumores, incluidos los cánceres colorrectales, de mama y los del tracto aerodigestivo. Aunque el 5-FU en combinación con otros agentes quimioterapéuticos mejora las tasas de respuesta y la supervivencia en los cánceres de mama, cabeza y cuello, en el cáncer colorrectal es donde ha tenido el mayor éxito. La quimioterapia basada en 5-FU mejora la supervivencia libre de enfermedad en los pacientes resecados con cáncer colorrectal en estadio III[65].

El mecanismo de citotoxicidad del 5-FU está relacionado con la incorporación incorrecta de fluoronucleótidos al ARN y ADN y a la inhibición de la enzima timidilato sintasa (TS). El 5-FU es un análogo del uracilo con un átomo de flúor en la posición C-5 en lugar de hidrógeno (**fig. 23**), lo que le permite usar los mismos transportadores que el uracilo para entrar rápidamente en la célula. Intracelularmente, el 5-FU se convierte en varios metabolitos activos: monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) y trifosfato de fluorouridina (FUTP) (**fig. 23**). Estos

metabolitos interrumpen la síntesis de ARN y la acción de la TS. El metabolito FUTP se incorpora al ARN, interrumpe su procesamiento y sus funciones normales. De esta forma, no solo se inhibe el procesamiento del pre-ARNr en ARNr maduro, sino que además, se interrumpen las modificaciones postranscripcionales de los ARNt y la actividad de los complejos de ARNsn-proteína, inhibiendo así el empalme del pre-ARNm. La poliadenilación del ARNm también resulta inhibida a concentraciones relativamente bajas de 5-FU. Además, los ARNr, ARNt y ARNsn contienen pseudouridina modificada como base y se ha demostrado que el 5-FU inhibe la conversión

postranscripcional de uridina a pseudouridina en estas especies de ARN[66]. Estos estudios *in vitro* indican que la incorporación del 5-FU puede alterar muchos aspectos del procesamiento del ARN, lo que deriva en fuertes efectos negativos sobre el metabolismo y la viabilidad celular[67][68][69]. En las terapias sistémicas, la enzima limitante de la velocidad en el catabolismo del 5-FU es la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), que convierte el 5-FU en dihidrofluorouracilo (DHFU). Más del 80% del 5-FU administrado es catabolizado principalmente en el hígado, donde la DPD está expresada en abundancia[66].

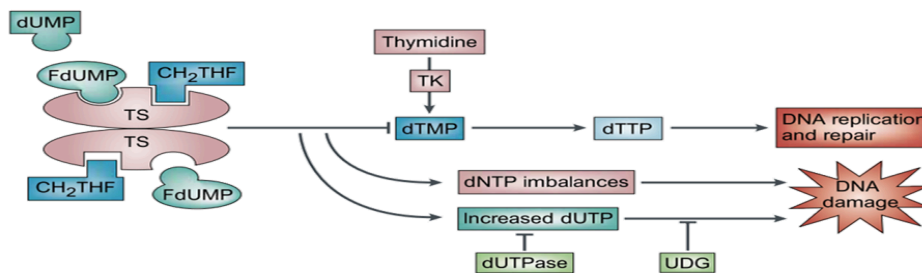


**Figura 23. Metabolismo del 5-fluorouracilo.** El 5-fluorouracilo (5-FU) se convierte en tres metabolitos activos principales: monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) y trifosfato de fluorouridina (FUTP). El mecanismo principal de la activación de 5-FU es su conversión a monofosfato de fluorouridina (FUMP), ya sea directamente por la orotato fosforribosiltransferasa (OPRT) con fosforribosil pirofosfato (PRPP) como cofactor, o

indirectamente a través de fluorouridina (FUR) por la acción secuencial de la uridina fosforilasa (UP) y uridina quinasa (UK). Luego, el FUMP se fosforila en fluorouridina difosfato (FUDP), que puede fosforilarse aún más en el metabolito activo fluorouridina trifosfato (FUTP) o convertirse en fluorodesoxiuridina difosfato (FdUDP) mediante la acción de la ribonucleótido reductasa (RR). A su vez, FdUDP puede fosforilarse o desfosforilarse para generar los metabolitos activos FdUTP y FdUMP, respectivamente. Una vía de activación alternativa implica la conversión catalizada por timidina fosforilasa de 5-FU a fluorodesoxiuridina (FUDR), que luego es fosforilada por la timidina quinasa (TK) a FdUMP. La conversión mediada por la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) de 5-FU a dihidrofluorouracilo (DHFU) es el paso limitante de la velocidad del catabolismo de 5-FU en células normales y tumorales. La DPD hepática degrada hasta el 80% del 5-FU administrado[66].

Por otro lado, el 5-FU también inhibe a la enzima TS, que cataliza la metilación del monofosfato de desoxiuridina (dUMP) a monofosfato de desoxitimidina (dTMP), con 5,10-metilenetetrahidrofolato reducido (CH<sub>2</sub>THF) como donante del grupo metilo (**fig. 24**). Esta reacción proporciona la única fuente *de novo* de timidilato, que es necesaria para la replicación y reparación del ADN. La enzima TS de 36 kDa funciona como un dímero, cuyas subunidades contienen un sitio de unión a nucleótidos y un sitio de unión a CH<sub>2</sub>THF. El metabolito FdUMP se une al sitio de unión a nucleótidos de la TS, formando un complejo ternario estable con la enzima y el CH<sub>2</sub>THF, bloqueando así la unión del sustrato normal, dUMP, e inhibiendo la síntesis de dTMP[66]. Finalmente, la inhibición de la TS conduce al agotamiento de dTMP, que a su vez deriva en el agotamiento de trifosfato de desoxitimidina (dTTP), quien induce perturbaciones en los niveles de los otros desoxinucleótidos (dATP, dGTP y dCTP) a través de varios mecanismos de retroalimentación, interrumpiendo la síntesis y reparación del ADN, lo que da como resultado un daño letal en el ADN (**fig. 24**)[66]. Además, la inhibición de TS resulta en la acumulación de trifosfato de desoxiuridina (dUTP)[70]. Tanto el dUTP como FdUTP pueden ser incorporados al ADN, pero en presencia de una alta relación

(F)dUTP/dTTP la enzima de reparación por escisión de nucleótidos, uracilo ADN glicosilasa (UDG), no puede reparar todos los errores, resultando en una incorporación adicional de nucleótidos falsos. Estos ciclos no exitosos de escisión y reparación conducen a la rotura de las cadenas de ADN y a la muerte celular[66]. Estudios preclínicos han demostrado que la expresión de la TS es un determinante clave de la sensibilidad al 5-FU. En líneas celulares resistentes a 5-FU y fluorodesoxiuridina (FUDR) se han observado la amplificación génica de la TS y la sobreexpresión de su ARNm y la proteína[71], mientras que se ha encontrado una mayor respuesta a la terapia con 5-FU en pacientes con baja expresión de TS tumoral[72][73]. Otros estudios han demostrado que el tratamiento con 5-FU induce de manera aguda la expresión de TS, tanto en líneas celulares como en tumores[74][75]. Esta inducción correspondería a la inhibición de un mecanismo de retroalimentación negativa en el que la proteína TS libre de ligando se une a su ARNm e inhibe la traducción del ARNm de la misma TS. Entonces, cuando TS une de forma estable a FdUMP, ya no puede unirse a su ARNm y suprimir su propia traducción, lo que resulta en una mayor expresión de sus ARNm. Esto constituye un potencial mecanismo de resistencia[75].



**Figura 24. Mecanismo de inhibición de la timidilato sintasa por acción del 5-fluorouracilo.** La timidilato sintasa (TS) cataliza la conversión de monofosfato de desoxiuridina (dUMP) en monofosfato de desoxitimidina (dTMP) con 5,10-metilenetetrahidrofolato reducido (CH<sub>2</sub>THF) como donante del grupo metilo. El metabolito activo monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP) se une al sitio de unión a nucleótidos de la TS y forma un complejo ternario estable con TS y CH<sub>2</sub>THF, bloqueando el acceso de dUMP al sitio de unión de nucleótidos e inhibiendo la síntesis de dTMP. Esto da como resultado el desequilibrio de los niveles de desoxinucleótidos (dNTP) y aumento del nivel de trifosfato de desoxiuridina (dUTP), que causan daño en el ADN. La extensión del daño en el ADN depende del grado de expresión de la desoxiuridina pirofosfatasa (dUTPasa) y de la uracilo ADN glicosilasa (UDG), que reducen los niveles de dUTP y reparan el daño en el ADN, respectivamente. El dTMP puede recuperarse por acción de la timidina quinasa (TK) a partir de timidina[66].

## Referencias bibliográficas

- [1] Mitra, A. K., Agrahari, V., Mandal, A., Cholkar, K., Natarajan, C., Shah, S., Joseph, M., Trinh, H. M., Vaishya, R., Yang, X., Hao, Y., Khurana, V., & Pal, D. (2017). Novel delivery approaches for cancer therapeutics. *Physiology & Behavior*, 176, 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.067>
- [2] World Health Organization. (2019). *Cancer today: Argentina 2018*. The Global Cancer Observatory. <http://gco.iarc.fr>
- [3] Musikant, M. M. (2019). *Líneas prioritarias de investigación*. Argentina.gob.ar. <https://www.argentina.gob.ar>
- [4] Picco, M. E., Fernández, N. B. & Bergami, P. L. (2010). Melanoma: Diagnóstico, evolución y tratamiento bajo una perspectiva molecular. *Ciencia e Investigación*, 60 (2), 35–50. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/14256>
- [5] Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., & Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, 445 (22), 851–857. <https://doi.org/10.1038/nature05661>
- [6] Bennett, D. C. (2008a). How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell & Melanoma Research*, 21(1), 27–38. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2007.00424.x>
- [7] Bennett, D. C. (2008b). Ultraviolet wavebands and melanoma initiation. *Pigment Cell & Melanoma Research*,

- 21(5), 520–524.  
<https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2008.00500.x>
- [8] Knackstedt, T., Knackstedt, R. W., Couto, R., & Gastman, B. (2018). Malignant melanoma: Diagnostic and management update. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 142(2), 202–216.  
<https://doi.org/10.1097/prs.00000000000004571>
- [9] Raible, D. W. (2006). Development of the neural crest: achieving specificity in regulatory pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(6), 698–703.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.09.003>
- [10] Scherer, D., & Kumar, R. (2010). Genetics of pigmentation in skin cancer — A review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 705(2), 141–153.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.06.002>
- [11] Shigeki, S. (1992). Mutations of the tyrosinase gene in oculocutaneous albinism. *Pigment Cell Research*, 5(2), 279–283.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1992.tb00550.x>
- [12] Law, M. H., Bishop, D. T., Lee, J. E., Brossard, M., Martin, N. G., & MacGregor, S. (2015). Genome-wide meta-analysis identifies five new susceptibility loci for cutaneous malignant melanoma. *Nature Genetics*, 47(9), 987–995.  
<https://doi.org/10.1038/ng.3373>
- [13] Viola, J. R., Rafael, D. F., Wagner, E., Besch, R., & Ogris, M. (2013). Gene therapy for advanced melanoma: Selective targeting and therapeutic nucleic acids. *Journal of Drug Delivery*, 2013, 1–15.  
<https://doi.org/10.1155/2013/897348>
- [14] Vidwans, S. J., Flaherty, K. T., Fisher, D. E., Tenenbaum, J. M., & Travers, M. D. (2011). A melanoma molecular disease model. *PLoS ONE*, 6(3), Artículo e18258.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018257>
- [15] Miller, A. J., & Mihm, M. C. (2006). Mechanisms of disease: Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 355(1), 51–65.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMra052166>
- [16] Zalaudek, I., Leinweber, B., Hofmann-Wellenhof, R., Scope, A., Marghoob, A.A., Ferrara, G., Pellacani, G., Argenziano, G., & Soyer, H.P. (2008). The epidermal and dermal origin of melanocytic tumors: theoretical considerations based on epidemiologic, clinical, and histopathologic findings. *The American Journal of dermatopathology*, 30 4, 403-6  
<https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e3181734e9a>
- [17] Weatherhead, S. C., Haniffa, M., & Lawrence, L. C. (2007). Melanomas arising from naevi and de novo melanomas—does origin matter? *British Journal of Dermatology*, 156(1), 72–76.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2006.07570.x>
- [18] Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105–111.  
<https://doi.org/10.1038/35102167>

- [19] Conic, R. Z., Cabrera, C. I., Khorana, A. A., & Gastman, B. C. (2018). Determination of the impact of melanoma surgical timing on survival using the National Cancer Database. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 78(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2017.08.039>
- [20] Greenberg, P. D., & Blattman, J. N. (2004). Cancer immunotherapy: A treatment for the masses. *Science*, 305(5681), 200–205. <https://doi.org/10.1126/science.1100369>
- [21] Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Rutkowski, P., Lao, C. D., Cowey, C. L., Schadendorf, D., Wagstaff, J., Dummer, R., Ferrucci, P. F., Smylie, M., Hogg, D., Hill, A., Márquez-Rodas, I., Haanen, J., Guidoboni, M., Maio, M., Schöffski, P., ... Ascierto, P. A. (2019). Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 381(16), 1535–1546. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1910836>
- [22] Zahreddine, H., & Borden, K. L. B. (2013). Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 4(28), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00028>
- [23] Russo, I., Caroppo, F., & Alaibac, M. (2015). Vitamins and melanoma. *Cancers*, 7(3), 1371–1387. <https://doi.org/10.3390/cancers7030841>
- [24] Pahle, J., & Walther, W. (2016). Vectors and strategies for nonviral cancer gene therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 16(4), 443–461. <https://doi.org/10.1517/14712598.2016.1134480>
- [25] Walther, W., & Stein, U. (2000). Viral vectors for gene transfer: A review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs*, 60(2), 249–271. <https://doi.org/10.2165/00003495-200060020-00002>
- [26] Gillet, J., Macadangdang, B., Fathke, R. L., Gottesman, M. M., & Kimchi-Sarfaty, C. (2009). The development of gene therapy: From monogenic recessive disorders to complex diseases such as cancer. *Methods in Molecular Biology*, 542(2), 5–54. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-561-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-561-9_1)
- [27] Argyros, O., Wong, S., & Harbottle, R. P. (2011). Non-viral episomal modification of cells using S/MAR elements. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11(9), 1177–1191. <https://doi.org/10.1517/14712598.2011.582035>
- [28] Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., & Zarghami, N. (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 102–110. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- [29] Wang, W., Li, W., Ma, N., & Steinhoff, G. (2013). Non-viral gene delivery methods. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 14(1), 46–60. <https://doi.org/10.2174/1389201011314010008>
- [30] Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J., & Corrie, S. R. (2016).

- Nanoparticle-based medicines: A review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharmaceutical Research*, 33(10), 2373–2387. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5>
- [31] Davis, B. W., & Ostrander, E. A. (2014). Domestic dogs and cancer research: A breed-based genomics approach. *ILAR Journal*, 55(1), 59–68. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu017>
- [32] Van Der Weyden, L., Patton, E. E., Wood, G. A., Lorigan, P. C., Loughane, S., Scott, E. N., Pritchard, C. J., Marais, R. M., & Adams, D. J. (2016). Cross-species models of human melanoma. *The Journal of Pathology*, 238(2), 152–165. <https://doi.org/10.1002/path.4632>
- [33] Gillard, M., Cadieu, E., De Brito, C., Abadie, J., Hédan, B., Derrien, T., Hitte, C., Galibert, F., & André, C. (2013). Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 27(1), 90–102. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12170>
- [34] Bolon, B., Calderwood, M. B., & Hall, B. J. (1990). Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. *Veterinary Pathology*, 27(2), 96–102. <https://doi.org/10.1177/030098589002700204>
- [35] Merlo, D. F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino, U., Capurro, C., Risselada, A., & Ciminale, V. (2008). Cancer incidence in pet dogs: Findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(4), 976–984. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.01333.x>
- [36] Goldschmidt, M. H., & Hendrick, M. J. (2002). *Tumors of the skin and soft tissues*. Iowa State Press. <https://doi.org/10.1002/9780470376928.ch2>
- [37] Hernandez, B., Adissu, H. A., Wei, B. R., Michael, H. T., Merlino, G., & Simpson, R. M. (2018). Naturally occurring canine melanoma as a predictive comparative oncology model for human mucosal and other triple wild-type melanomas. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 394. <https://doi.org/10.3390/ijms19020394>
- [38] Iussich, S., Maniscalco, L., Di Sciandolo, G., Iotti, B., Morello, E., Martano, M., Gattino, F., Buracco, P., & De Maria, R. (2016). PDGFRs expression in dogs affected by malignant oral melanomas: Correlation with prognosis. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(2), 462–469. <https://doi.org/10.1111/vco.12190>
- [39] Bujak, J. K., Pingwara, R., Nelson, M. H., & Majchrzak, K. (2018). Adoptive cell transfer: New perspective treatment in veterinary oncology. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 60(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0414-4>
- [40] Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J. L., Kulbokas, E. J., Zody, M. C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R. K., Ostrander, E. A., Ponting, C. P., Galibert, F., Smith, D. R., DeJong, P. J., ... Lander, E. S. (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 438(7069), 803–819.

- <https://doi.org/10.1038/nature04338>
- [41] Simpson, R. M., Bastian, B. C., Michael, H. T., Webster, J. D., Prasad, M. L., Conway, C. M., Prieto, V. G., Gary, J. M., Goldschmidt, M. H., Salas, E. N., & Merlino, G. (2013). Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 27(1), 37–47. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12185>
- [42] Mochizuki, H., Kennedy, K., Shapiro, S. G., & Breen, M. (2015). BRAF mutations in canine cancers. *PLoS ONE*, 10(6), Artículo e0130024. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129534>
- [43] Grosenbaugh, D. A., Leard, A. T., Bergman, P. J., Klein, M. K., Meleo, K., Susaneck, S., Hess, P. R., Baron, H. W., Baez, J. L., Post, G. S., Appel, S. L., & Wolfe, B. A. (2011). Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *American Journal of Veterinary Research*, 72(12), 1631–1638. <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.12.1631>
- [44] Vail, D. M. (2013). Levels of evidence in canine oncology trials – a case in point. *Veterinary and Comparative Oncology*, 11(3), 167–168. <https://doi.org/10.1111/vco.12053>
- [45] Otnod, J. M., Smedley, R. C., Walshaw, R., Hauptman, J. G., Kiupel, M., & Lawrence, J. (2013). A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 11(3), 219–229. <https://doi.org/10.1111/vco.12057>
- [46] Riccardo, F., Tarone, L., Iussich, S., Giacobino, D., Arigoni, M., De Maria, R., Ferrone, S., Buracco, P., Cavallo, F., & Papparella, S. (2014). CSPG4-specific immunity and survival prolongation in dogs with oral malignant melanoma immunized with human CSPG4 DNA. *Clinical Cancer Research*, 20(14), 3753–3762. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3042>
- [47] Finocchiaro, L. M. E., & Glikin, G. C. (2017). Recent clinical trials of cancer immunogene therapy in companion animals. *World Journal of Experimental Medicine*, 7(2), 42–49. <http://dx.doi.org/10.5493/wjem.v7.i2.42>
- [48] Finocchiaro, L. M. E., Agnetti, L., Fondello, C., & Glikin, G. C. (2019). Combination of cytokine-enhanced vaccine and chemo-gene therapy as surgery adjuvant treatments for spontaneous canine melanoma. *Gene Therapy*, 26(10–11), 418–431. <https://doi.org/10.1038/s41434-019-0066-7>
- [49] London, C. A. (2009). Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. *Topics in Companion Animal Medicine*, 24(3), 106–112. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2009.02.002>
- [50] Park, J. S., Withers, S. S., Modiano, J. F., Kent, M. S., Chen, M., Luna, J. I., Culp, W. T. N., Sparger, E. E., Rebhun, R. B., Monjazebe, A. M., Murphy, W. J., & Canter, R. J. (2016). Canine cancer immunotherapy studies: Linking mouse and human. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 4, Artículo

97.

<https://doi.org/10.1186/s40425-016-0200-7>

- [51] Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F. S., Hwu, W. J., Kefford, R., Wolchok, J. D., Hersey, P., Joseph, R. W., Weber, J. S., Dronca, R., Gangadhar, T. C., Patnaik, A., Zarour, H., Joshua, A. M., Gergich, K., Elassaiss-Schaap, J., Algazi, A., Schneck, N., ... Kang, S. P. (2013). Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 369(2), 134–144. <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1305133>
- [52] Snyder, A., Makarov, V., Merghoub, T., Azami, J., Zaretsky, J. M., Desrichard, A., Walsh, L. A., Postow, M. A., Wong, P., Ho, T. S., Hollmann, T. J., Bruggeman, C., Kannan, K., Li, Y., Elipenahli, C., Liu, C., Harbison, C. T., Wang, L., Ribas, A., ... Chan, T. A. (2015). Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 373(20), 1984. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1406498>
- [53] Maekawa, N., Konnai, S., Okagawa, T., Nishimori, A., Ikebuchi, R., Izumi, Y., Takagi, S., Kagawa, Y., Nakajima, C., Suzuki, Y., Kohara, J., & Murata, S. (2016). Immunohistochemical analysis of PD-L1 expression in canine malignant cancers and PD-1 expression on lymphocytes in canine oral melanoma. *PLoS ONE*, 11(6), Artículo e0157176. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157176>
- [54] Maekawa, N., Konnai, S., Ikebuchi, R., Okagawa, T., Adachi, M., Takagi, S., Kagawa, Y., Nakajima, C., Suzuki, Y., & Murata, S. (2014). Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN- $\gamma$  production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade. *PLoS ONE*, 9(6), Artículo e98415. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098415>
- [55] Regan, D., Guth, A., Coy, J., & Dow, S. (2015). Cancer immunotherapy in veterinary medicine: Current options and new developments. *The Veterinary Journal*, 207(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.008>
- [56] Alexander, A. N., Huelsmeyer, M. K., Mitzey, A., Aubert, M. L., Liggitt, H. D., MacEwen, E. G., & Vail, D. M. (2006). Development of an allogeneic whole-cell tumor vaccine expressing xenogeneic gp100 and its implementation in a phase II clinical trial in canine patients with malignant melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55(4), 433–442. <https://doi.org/10.1007/s00262-005-0025-6>
- [57] Gyorffy, S., Rodriguez-Lecompte, J. C., Woods, J. P., Caswell, J. L., Kruth, S., Gariépy, J., & Jothy, S. (2005). Bone marrow-derived dendritic cell vaccination of dogs with naturally occurring melanoma by using human gp100 antigen. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(1), 56–63. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2005.tb02659.x>
- [58] Finocchiaro, L. M. E., Fiszman, G. L., Karara, A. L., & Glikin, G. C. (2008). Suicide gene and cytokines combined nonviral gene therapy for spontaneous canine melanoma. *Cancer Gene*

- Therapy*, 15(3), 165–172.  
<https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7701096>
- [59] Atherton, M. J., Morris, J. S., Mcdermott, M. R., & Lichty, B. D. (2016). Cancer immunology and canine malignant melanoma: A comparative review. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 169(1), 15–26.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.11.003>
- [60] Klotz, D., Baumgärtner, W., & Gerhauser, I. (2017). Type I interferons in the pathogenesis and treatment of canine diseases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 191(9), 80–93.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.08.006>
- [61] Han, S. M., Han, S. H., Koh, I. Z., Choi, J. S., Sang, B. C., & Kang, K. S. (2015). Pro-apoptotic and growth-inhibitory effect of IFN- $\beta$ -overexpressing canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells against melanoma cells. *Anticancer Research*, 35(9), 4749–4756.  
<https://ar.iiarjournals.org/content/35/9/4749>
- [62] Chung-Faye, G. A., Chen, M. J., Dixon, P. H., Lohrer, H., Searle, P. F., Young, L. S., Kerr, D. J., & Anderson, R. (2001). In vivo gene therapy for colon cancer using adenovirus-mediated transfer of the fusion gene cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase. *Gene Therapy*, 8(20), 1547–1554.  
<https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301557>
- [63] Houghton, J. A., Morton, C. L., Adkins, D. A., & Rahman, A. (1993). Locus of the interaction among 5-fluorouracil, leucovorin, and interferon- $\alpha$ 2a in colon carcinoma cells. *Cancer Research*, 53(18), 4243–4250.
- [64] Karjoo, Z., Chen, X., & Hatefi, A. (2016). Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 99(Pt A), 113–128.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.009>
- [65] International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. (1992). Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. *The Lancet*, 345(8955), 939–944.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)90696-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)90696-7)
- [66] Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330–338.  
<https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- [67] Kufe, D. W., & Major, P. P. (1981). 5-Fluorouracil incorporation into human breast carcinoma RNA correlates with cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 256(19), 9802–9805.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)68695-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)68695-3)
- [68] Ghoshal, K., & Jacob, S. T. (1994). Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma treated with 5-fluorouracil. *Cancer Research*, 54(3), 632–636.  
<http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/54/3/632/2456299/cr0540030632.pdf>
- [69] Samuelsson, T. (1991). Interactions of transfer RNA pseudouridine synthases

with RNAs substituted with fluorouracil. *Nucleic Acids Research*, 19(22), 6139–6144. <https://doi.org/10.1093/nar/19.22.6139>

- [70] Aherne, G. W., Hardcastle, A., Raynatd, F., & Jackman, A. L. (1996). Immunoreactive dUMP and TTP pools as an index of thymidylate synthase inhibition: Effect of Tomudex (ZD1694) and a nonpolyglutamated quinazoline antifolate (CB30900) in L1210 mouse leukaemia cells. *Biochemical Pharmacology*, 51(10), 1293–1301. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(96\)00035-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(96)00035-4)
- [71] Drake, J. C., Allegra, C. J., & Chu, E. (1995). Thymidylate synthase gene amplification in human colon cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil. *Biochemical Pharmacology*, 49(10), 1419–1426. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00067-a](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00067-a)
- [72] Danenberg, P. V., Danenberg, K. D., Lenz, H. J., Bertino, J. R., Leichman, L., & Leichman, C. G. (1998). Levels of thymidylate synthase gene expression in colon cancer: An analysis of RNA in disseminated response and survival. *Clinical Cancer Research*, 4(5), 1243–1250.
- [73] Johnston, P. G., Danenberg, P. V., Leichman, L., Leichman, C. G., Danenberg, K. D., & Allegra, C. J. (1995). Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Research*, 55(7), 1407–1413.
- [74] Johnston, P. G., Drake, J. C., Trepel, J., & Allegra, C. J. (1992). Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal antibody TS 106 in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant human cancer cell lines. *Cancer Research*, 52(16), 4306–4312.
- [75] Swain, S. M., Lippman, M. E., Egan, E. F., Drake, J. C., Steinberg, S. M., & Allegra, C. J. (1989). Fluorouracil and high-dose leucovorin in previously treated patients with metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 7(7), 890–899. <https://doi.org/10.1200/JCO.1989.7.7.890>