

UNIVERSIDAD DE
MURCIA



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular- A
Universidad de Murcia

DISEÑO DE UNA TERAPIA COMBINADA PARA EVITAR LA RESISTENCIA DEL MELANOMA AL METOTREXATO

Máster en Biología Molecular y Biotecnología
Trabajo fin de Máster
Septiembre 2012

Tutor

Dr. D. José Neptuno Rodríguez López

Alumna

María del Mar Collado González



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

José Neptuno Rodríguez López, Catedrático de Universidad del Área de Bioquímica y Biología Molecular, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A de la Universidad de Murcia,

INFORMA:

Que la Tesis de Máster titulada **DISEÑO DE UNA TERAPIA COMBINADA PARA EVITAR LA RESISTENCIA DEL MELANOMA AL METOTREXATO**, ha sido realizada por **Dña. María del Mar Collado González**, bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A de la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 5 de Septiembre de 2012



Fdo.
Dr. José Neptuno Rodríguez López

Diseño de una terapia combinada para evitar la resistencia del melanoma al metotrexato

María del Mar Collado González

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A

El metotrexato (MTX) es el antifolato más utilizado en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, se han descrito varios mecanismos de resistencia desarrollados por las células tumorales. Uno de estos, se basa en la pérdida de los receptores específicos para folatos y sus análogos estructurales. En este trabajo diseñamos una estrategia alternativa para el tratamiento del melanoma que se basa en combinar el efecto antifolato del MTX con un derivado de la epicatequina galato (ECG), sintetizado previamente en nuestro laboratorio, la 3-*O*-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-(-)-epicatequina (TMECG). Este compuesto atraviesa las membranas celulares por difusión pasiva y actúa inhibiendo a la DHFR de forma irreversible. Estos resultados preliminares demuestran que la administración simultánea de estos dos antifolatos podría ser una buena estrategia en el tratamiento del melanoma.

El melanoma es una enfermedad en la cual los melanocitos, un tipo celular especializado en la síntesis de melaninas, sufren diversas alteraciones en el control de su ciclo celular conducentes a un estado proliferativo ilimitado.¹ En Europa la tasa de mortalidad debida a melanoma es la más alta tras Australia/Nueva Zelanda y Norte América.² De hecho, la Sociedad Americana del Cáncer estima que en los Estados Unidos más de 9000 personas perderán la vida, durante el año 2012, debido a esta enfermedad.³

Para el tratamiento del cáncer se han desarrollado terapias que actúan específicamente sobre enzimas clave para la viabilidad celular; es por ello que la dihidrofolato reductasa (DHFR) presenta un gran interés como enzima diana.⁴ Esta enzima cataliza las reacciones que permiten reducir el ácido fólico hasta tetrahidrofolato (THF), su forma activa, a partir del cual se van a obtener, mediante la acción de otras enzimas, diversos cofactores del THF que permiten llevar a cabo las diversas reacciones metabólicas. Entre ellas el transporte y donación de grupos funcionales de un solo carbono (metilo, metileno y formilo) esenciales para la síntesis de determinados aminoácidos, timidilato y purinas, y para reacciones de metilación de diversas moléculas bioquímicas. En

resumen, la DHFR es esencial, entre otras cosas, para la correcta síntesis, metilación y reparación de los ácidos nucleicos. Además, las células tumorales tienen una mayor tasa replicativa y por lo tanto los niveles de esta enzima, así como los requerimientos de cofactores de THF son mayores.

Los antifolatos son análogos estructurales del ácido fólico que actúan inhibiendo a la DHFR. El antifolato más utilizado para el tratamiento del cáncer es el metotrexato (MTX) que compite con el ácido fólico por el transporte, poliglutaminación y unión a la DHFR.⁴ La inhibición de esta enzima produce la depleción en los niveles de THF por lo que se inhibe la síntesis *de novo* de purinas y timidilato, así como la síntesis de diversos aminoácidos.⁵ Además, el MTX actúa inhibiendo otras enzimas como la timidilato sintasa (TS), implicada en la síntesis *de novo* de timidilato, la ribonucleótido glicina-amida transformilasa (GARTF) y la carboxamida aminoimidazol transformilasa (AICARTF) implicadas en la síntesis *de novo* de purinas. Por ello, se considera que la inhibición de la síntesis de ADN llevada a cabo por el MTX es multifactorial, ya que además de producir una disminución en los niveles de folatos reducidos necesarios inhibe enzimas dependientes de folato.⁶

Desgraciadamente, las células tumorales han desarrollado diversos mecanismos de resistencia al MTX. Estos incluyen (1) la reducida captación del mismo, (2) la reducida actividad de la folilpoli- γ -glutamato sintasa (FPGS) que une residuos de glutámico, la poliglutaminación del MTX asegura la permanencia del mismo en el interior celular y mejora su afinidad por la DHFR y otras enzimas dependientes de folato (disminuyendo la K_m), (3) el aumento en la actividad de la γ -glutamil hidrolasa (GGH) que hidroliza el MTX glutaminado y, por tanto, promueve la forma de MTX libre que es más fácilmente exportado al exterior y (4) un aumento en la expresión o mutaciones en la enzima DHFR.^{4,6-8}

El MTX por su carácter hidrofílico no puede atravesar la membrana celular, por lo que para entrar en la célula, debe usar un sistema de transporte específico como el transportador de folatos reducidos (RFC) ubicuamente expresado, que lleva a cabo el intercambio bidireccional de aniones, el transportador de folatos acoplado a una bomba de protones (PCFT) o los receptores de folatos (FR).⁴

El FR- α es específico de células epiteliales, observándose la sobre-expresión del mismo en células tumorales de origen epitelial.^{4,8} Además, este receptor media la endocitosis en fase fluida del folato y diversos antifolatos como el MTX.⁹ Se ha postulado que tras la endocitosis se produce la fusión del endosoma con el melanosoma, de modo que cuando se produce la

separación del MTX del FR- α , el antifolato no es liberado al citosol por las interacciones que se establecen entre este y las melaninas. Los folatos no presentan tal afinidad y por tanto salen del melanosoma hacia el citosol mediante difusión pasiva. Todo esto indica que el reducido nivel de THF intracelular es debido a la competencia entre el folato y el MTX por el receptor, más que a un secuestro de los folatos en los melanosomas.⁸ Trabajos previos en nuestro laboratorio han identificado un mecanismo por el cual el MTX favorece la biogénesis y exportación de los melanosomas, consiguiendo por tanto la eliminación tanto del antimetabolito como de los receptores específicos.^{8,10} (Figura 1). La exportación de los receptores específicos FR- α contribuye a que disminuya el nivel de folatos en el interior celular. Este mecanismo de exportación de drogas en melanoma no es específico del MTX sino que ha sido postulado como método de resistencia del melanoma a otros agentes quimio-terapéuticos.¹¹

Las razones expuestas anteriormente hacen que el MTX sea especialmente ineficaz en el tratamiento del melanoma.^{12,13} Sin embargo, si tenemos en cuenta que el MTX produce la pérdida de FR- α y la depleción en los niveles de folatos intracelulares, una droga que atravesara la membrana por difusión y que inhibiera a la DHFR podría constituir un tratamiento eficaz contra el melanoma.

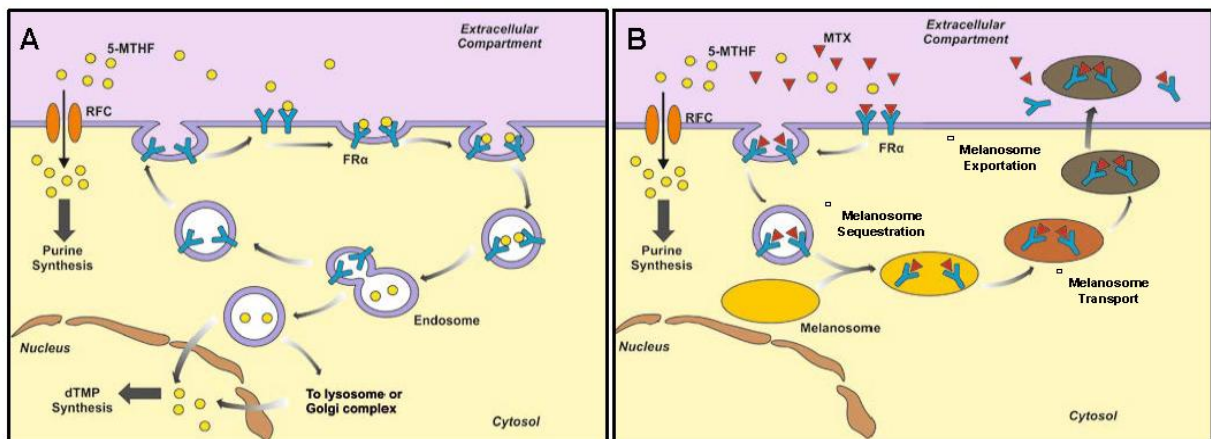


Figura 1. Papel que desempeña el FR α en el transporte de folatos (A) y su posible implicación en la resistencia del melanoma al MTX (B).

Hasta la fecha han sido ampliamente documentados los múltiples efectos que sobre la viabilidad celular presentan las catequinas del té.¹⁴⁻¹⁷ La analogía estructural existente entre estas y el MTX llevó a que se postulara que estas podrían actuar como antifolatos naturales.¹⁸ A día de hoy, las catequinas más estudiadas como posibles agentes anticancerígenos han sido la epigallocatequina galato (EGCG) y la epicatequina galato (ECG). Ambas catequinas inhibían eficazmente a la DHFR humana.¹⁸ Además, son las más abundantes en los extractos del té y son compuestos naturales que presentan baja toxicidad y bajo coste de obtención.¹⁹

Sin embargo, su posible uso terapéutico presenta una serie de inconvenientes, entre ellos, su baja biodisponibilidad, ya que las epicatequinas son inestables a pH neutro.²⁰ De hecho, a pH neutro la EGCG se oxida dando lugar a la formación de dímeros y a H₂O₂.^{20,21} Con el fin de evitar este inconveniente, nuestro grupo de investigación desarrolló un método para la síntesis de un derivado trimetoxilado de la ECG, el 3-*O*-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-(-)-epicatequina (TMECG)²¹, que presenta alta estabilidad en un alto rango de pH. TMECG es capaz de atravesar la membrana celular mediante difusión pasiva y, tras ser activado por la tirosinasa, produce un residuo quinona-metide que es un potente inhibidor irreversible de la DHFR. Su

actividad produce una disminución en los niveles de expresión de la enzima, así como de los RFC en células de melanoma.^{12,13}

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue comprobar la efectividad de un tratamiento simultáneo de MTX y TMECG sobre células de melanoma. Un objetivo principal de esta Tesis de Máster fue adquirir destreza en las técnicas necesarias para realizar este trabajo experimental. Para ello recibí formación en el manejo y tratamiento de células de melanoma en cultivo. Además, se realizaron ensayos de apoptosis mediante la detección de muerte celular aplicando la técnica de ELISA y mediante inmunofluorescencia (microscopía confocal) usando para ello un anticuerpo específico para fosfo-histona H2AX que es un marcador específico de daño de doble cadena en el ADN. Durante este periodo formativo también realicé electroforesis de proteínas y Western blots.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ha sido ampliamente documentada la resistencia que presenta el melanoma al MTX. De hecho, mientras que sobre otros tipos de tumores como el de mama o el de colon el MTX tiene un efecto citotóxico, en melanoma actúa como un citoestático,⁸ de modo que cuando desaparece el MTX del cuerpo, las células tumorales recuperan su

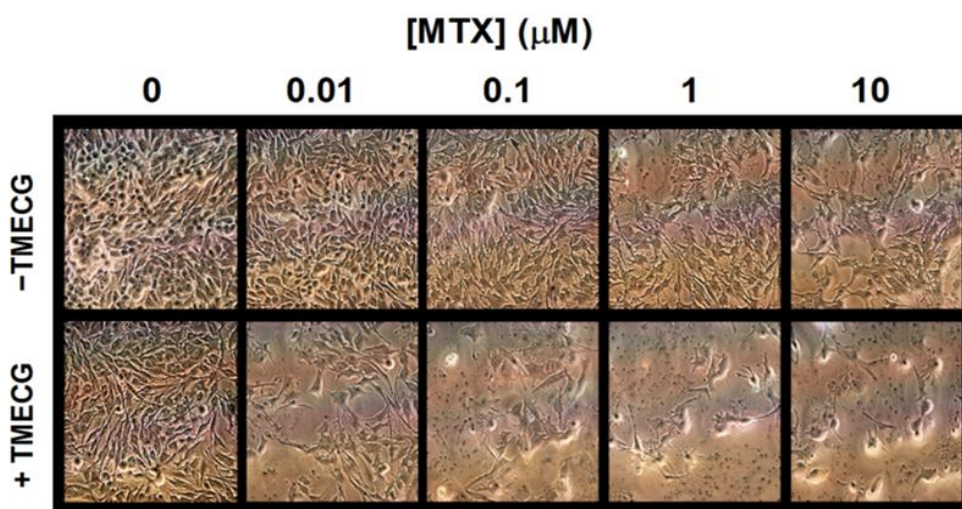


Figura 2. Efecto de la combinación TMECG/MTX. Imágenes de células de melanoma SK-MEL-28 tratadas con diferentes concentraciones de MTX, con y sin 10 μM de TMECG durante tres días.

poder proliferativo y presentan un mayor potencial metastático.^{8,22}

Teniendo en cuenta que uno de los mecanismos de resistencia desarrollados por las células de melanoma consiste en eliminar los receptores FR α ⁸ y que en trabajos previos de nuestro laboratorio se sintetizó un derivado de una catequina del té, el TMECG, que muestra propiedades citotóxicas y que penetra en la célula siguiendo un mecanismo de difusión pasiva,²¹ nos planteamos que estos dos compuestos podrían mostrar un efecto sinérgico en el tratamiento del melanoma.

Por ello comprobamos el efecto que sobre la viabilidad presenta la aplicación simultánea de los dos fármacos. Para ello diseñamos un ensayo en el que aplicamos a células de melanoma concentraciones crecientes de MTX en presencia y ausencia de una concentración fija de TMECG (10 μ M) e incubamos las células en condiciones óptimas de crecimiento. Realizamos un registro de los cambios morfológicos de los cultivos celulares a fin de encontrar indicios que indicaran la efectividad del tratamiento. Pasados tres días pudimos observar un marcado efecto sobre la viabilidad celular incluso en la combinación con la concentración más baja de MTX respecto al cultivo control (Figura 2). Poniendo de manifiesto la existencia de un potente efecto sinérgico sobre la proliferación celular.

Para comprobar si dicho efecto sinérgico era debido a una inhibición de la proliferación o a un aumento en los niveles de apoptosis celular, realizamos medidas de apoptosis en cultivos de células SK-MEL-28 sometidos durante varios días al tratamiento anteriormente expuesto. El resultado de dicho experimento registró un aumento en los niveles de apoptosis en todas las condiciones en las que se aplicaron los dos fármacos de forma conjunta respecto al control no tratado. Estos datos sugieren un potente efecto proapoptótico del tratamiento diseñado. A los tres días de tratamiento el efecto fue más notorio a una concentración de MTX igual o superior a 1 μ M (Figura 3A). El efecto proapoptótico de la combinación

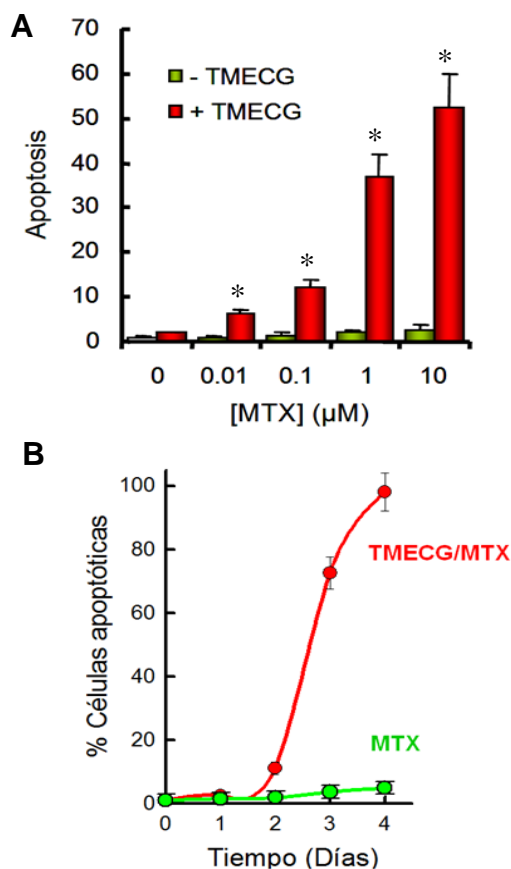


Figura 3. Apoptosis producida por la combinación TMECG/MTX. (A) Inducción de la apoptosis en células SK-MEL-28 a los 3 días del tratamiento con diferentes concentraciones de MTX, con y sin 10 μ M TMECG. (B) Evolución de la inducción de apoptosis con el tiempo en células SK-MEL-28 tratadas con MTX (1 μ M)/TMECG (10 μ M). Las diferencias en apoptosis, entre las células tratadas con la doble combinación MTX/TMECG y las células tratadas exclusivamente con MTX, fueron estadísticamente significativas en cada una de las concentraciones de MTX (* $P < 0.05$)

MTX (1 μ M) con TMECG (10 μ M) se puede observar desde el segundo día de aplicación. Aunque, pasados tres días es tan marcado que afecta al 75% de las células del cultivo (Figura 3B).

Es ampliamente conocido que la acción de los antifolatos produce la inhibición de la DHFR y la TS, de modo que se observa un aumento en los niveles de dUMP y una reducción en los niveles de GTP, ATP y TTP. Además, los antifolatos alteran la capacidad de la célula para reparar los sitios dañados en el ADN. Como resultado de

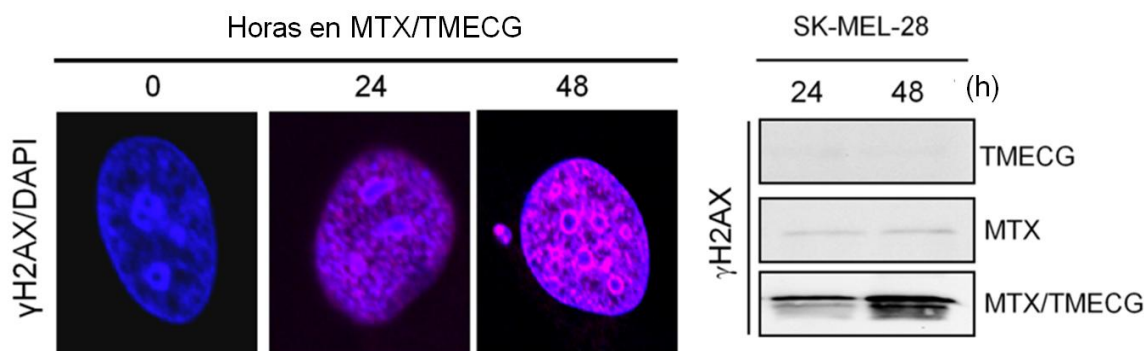


Figura 4. Fosforilación de la histona H2AX por efecto de la combinación MTX/TMECG en células de melanoma. Las células SK-mel-28 fueron tratadas con MTX/TMECG durante los tiempos indicados y posteriormente fueron analizadas por inmunofluorescencia usando anticuerpo contra γ -H2AX (rojo) y DAPI (azul) (imágenes de la izquierda) o por western blot (imagen de la derecha) Se usó la β -actina como control de carga de la proteína.

esta incapacidad se producen roturas de cadena simple y doble en el ADN.²³ Debido a que el TMECG produce la inhibición irreversible de la DHFR^{12, 13} nos planteamos la hipótesis de que un tratamiento con ambos compuestos debería producir un aumento en dichos procesos de rotura del ADN.

Para comprobar esta hipótesis analizamos mediante Western blot extractos de células de melanoma humano SK-MEL-28 sometidas al tratamiento doble durante diferentes períodos de tiempo. Para la realización de esta técnica utilizamos un anticuerpo contra la proteína histona H2AX fosforilada (γ -H2AX). La fosforilación de la histona H2AX en la Ser139 se produce de forma inmediata tras la producción de daño de doble hebra en el ADN de células humanas. Además, la γ -H2AX se sitúa alrededor de la rotura de doble cadena del ADN actuando como plataforma para la acumulación de muchos factores implicados en la respuesta al daño en el ADN.²⁴

Los análisis del Western blot (Figura 4, derecha) revelaron que la γ -H2AX sufría una fuerte activación al tratar las células de melanoma simultáneamente con los dos compuestos. La falta de activación, observada en tratamientos individuales, indicaba el efecto sinérgico de los dos compuestos. Este aumento en la fosforilación de γ -H2AX fue visible incluso

a las 24 horas de tratamiento. Adicionalmente, mediante estudios de inmunofluorescencia indirecta (microscopía confocal) usando el anticuerpo secundario marcados con un fluoróforo rojo y el agente intercalante DAPI comprobamos que la activación de γ -H2AX se distribuía en foci nucleares (Figura 4, izquierda).

CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que una terapia combinada de MTX y TMECG es efectiva en el tratamiento del melanoma, en concreto produce un aumento del daño en el ADN y una efectiva inducción de la apoptosis celular en la línea de melanoma humano SK-MEL-28.

Este tipo de cáncer es uno de los más agresivos, siendo actualmente un cáncer desprovisto de tratamiento. De hecho, el único tratamiento efectivo frente al melanoma es la extirpación quirúrgica del tumor. Por lo que el desarrollo de nuevas estrategias efectivas contra el melanoma ofrece grandes expectativas para el futuro tratamiento de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales

Los compuestos MTX y bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. El TMECG fue sintetizado en nuestro laboratorio.

Cultivos celulares y ensayos de proliferación celular

Se utilizó la línea celular de melanoma humano SK-MEL-28 obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection). La cepa fue mantenida bajo las condiciones indicadas por la ATCC. El medio de cultivo fue EMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, antibióticos, glutamina, piruvato y aminoácidos no esenciales. El mantenimiento y la manipulación de dichas cepas se realizó en el Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. Se sembraron 900-1100 células de SK-MEL-28 por pocillo en una placa de 96 pocillos y se mantuvieron en condiciones óptimas de crecimiento hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial, momento en el cual se aplicó el tratamiento.

La proliferación celular se midió usando el ensayo de viabilidad del MTT. Este ensayo es un método colorimétrico sensible, cuantitativo y fiable para la determinación de la proliferación y viabilidad celular. El ensayo es capaz de medir el número de células presentes en el cultivo mediante la transformación de un compuesto coloreado debido a una reacción que únicamente tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. El MTT (amarillo) es captado por las células y reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazano (azul-morado), que queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. De esta forma se puede cuantificar la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que se produce un cambio de color amarillo a azul-morado. La capacidad de las células para reducir el MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazano después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa. La lectura de absorbancia se llevó a cabo en un lector de placas Multiscan MCC/340 (Titertek, Huntsville, AL).

Ensayos de apoptosis

Una de las principales características bioquímicas de la apoptosis es la fragmentación del ADN. Se sabe que esta fragmentación deriva de la activación de una endonucleasa nuclear dependiente de Ca^{+2} y Mg^{+2} . Esta enzima rompe de forma selectiva al ADN por sitios localizados entre zonas nucleosomales generando fragmentos de ADN mono- y oligo-nucleosomales, los cuales al ser separados en una electroforesis, en geles de agarosa, producen un patrón típico en escalera formado por fragmentos que son aproximadamente múltiplos de la subunidad de 180 pares de bases (pb). En general, los métodos que detectan y cuantifican la fragmentación del ADN, en poblaciones de células, se basan en la detección de fragmentos de ADN de bajo peso molecular (LMW) que se incrementan durante la apoptosis o de fragmentos de ADN de alto peso molecular (HMW) que se reducen en las células apoptóticas.

El método Cell Death Detection ELISAPLUS (Roche Diagnostic) es un kit que se basa en que las células en apoptosis sufren una amplia fragmentación del ADN, generándose una gran cantidad de fragmentos LMW que pueden separarse de los HMW mediante centrifugación. Posteriormente, estos fragmentos LMW pueden ser cuantificados mediante un inmunoensayo enzimático (tipo ELISA), utilizando anticuerpos monoclonales contra el complejo ADN-histona. De esta forma, podemos determinar de forma específica los mono- y oligo-nucleosomas en la fracción citosólica de los lisados celulares. Las muestras, se depositan en pocillos de microplacas con estreptavidina y se incuban con una mezcla de anti-histona-biotina y anti-ADN-peroxidasa. Durante el tiempo de incubación, los nucleosomas son capturados vía sus histonas por medio del anticuerpo anti-histona-biotina y fijados a la placa por medio de la estreptavidina. De forma simultánea, la anti-ADN-peroxidasa se une al ADN de los nucleosomas. Finalmente, se lavan los anticuerpos no unidos y la cantidad de peroxidasa retenida, en el inmunocomplejo, es determinada por medio de un espectrofotómetro gracias al sustrato

de la peroxidasa, el ácido 2-2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico) (ABTS) Para el cálculo del enriquecimiento citoplasmático en estos fragmentos (factor de enriquecimiento nucleosomal) se dividió la absorbancia obtenida de las células tratadas entre aquellas no tratadas y se corrigió con el número de células.

Estudio de la morfología celular

La microscopía óptica de contraste de fases fue utilizada de forma rutinaria para la observación de los cultivos celulares. Se realizó en un microscopio invertido Nikon modelo TMS que permite la visualización de las muestras en diferentes recipientes con espesores y características ópticas variables (frascos de cultivo y placas multipocillos) sin necesidad de realizar una preparación previa. De esta forma, se pueden observar los cultivos celulares vivos sin que sufran modificaciones ni se afecten las condiciones de cultivo. Para estudiar la morfología celular de los cultivos sometidos a distintos tratamientos, se realizaron fotografías utilizando un microscopio invertido Nikon modelo ECLIPSE TE200-U equipado con cámara fotográfica Nikon modelo DS Camera Head DS-5M. También se utilizó la microscopía de contraste de fases para el conteo de las células dentro de la cámara de Neubauer para el ensayo con azul tripán utilizando un microscopio convencional Nikon modelo LABOPHOT-2.

Microscopia confocal

Nuestros estudios de microscopia confocal fueron realizados en la Sección de Microscopía de la Universidad de Murcia que dispone de un microscopio láser confocal Leica TCS 4D (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) equipado con objetivos de alta resolución (10×, 20×, 40×, 63×, 100×) y software adecuado para el control de la exploración y la adquisición de series. Se sembró en un cubreobjetos, previamente esterilizado y depositado en una placa Petri de 3.5 cm², con una densidad celular igual a 2500 células por cm² y se incubaron hasta crecimiento exponencial. Entonces se trataron las células y se incubaron durante 72 horas. Se fijaron las células con acetona fría durante 5 minutos. El bloqueo se

realizó con BSA 1% en PBS. El anticuerpo primario contra fosfohistona H2AX (Ser139) (Millipore; clon JBW301) diluido 1:500 en BSA 1% en PBS. A continuación, se incubó a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Alexa Fluor Dye anti-mouse 633 (Invitrogen) diluido 1:200 en BSA 1% en PBS durante 1 hora. Pasado ese tiempo, se lavó 3 veces con PBS. Finalmente se montó en un portaobjetos usando el medio de montaje Prolong Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen).

Electroforesis y Western blot

Se sembraron 1200 células por pocillo y se dejaron crecer hasta fase de crecimiento exponencial. Entonces se aplicó el tratamiento. Las muestras fueron recogidas en tampón de carga desnaturante y hervidas durante 5 minutos en SDS-PAGE. Las muestras fueron sometidas a electroforesis a 180 V y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Esta fue bloqueada con BSA (al 3% en TBS-Tween20) para las muestras chequeadas con anticuerpo contra fosfo-histona H2AX (Ser139) (Millipore; clon JBW301) ó con leche desnatada en polvo (al 5% en TBS-Tween20) para la membrana chequeada con anticuerpo contra β -actina (Sigma-Aldrich; clon AC-15). Tras el bloqueo se incubó la membrana con los citados anticuerpos primarios diluidos en el correspondiente medio. El anticuerpo secundario fue en ambos casos anti-mouse IgG (Fab specific) combinado con peroxidasa (Sigma-Aldrich). Para el revelado de actividad H2AX se usó el sistema Immun-starTM westernTM kit (BioRad) y la actividad β -actina se usó el sistema ECL Plus (GE Healthcare)

Estadística

Los resultados recogidos en esta Memoria se expresan como la media \pm la desviación estándar (SD) de una serie de medidas comprendidas entre 2 y 10 repeticiones, dependiendo del experimento concreto. La diferencia estadística entre distintos grupos se evaluó con la técnica paramétrica de la t de Student, considerándose significativas si $P < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron con los programas SigmaPlot 10.0 y Microsoft Excel. Los resultados de western blot e inmunofluorescencia

indirecta fueron realizados al menos tres veces y las figuras representan un resultado

típico obtenido.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ibrahim, N.; Halusca, F.G. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annu Rev Pathol* **2009**, *4*, 551-79.
2. Forsea, A.M.; del Marmol, V.; de Vries, E.; Bailey, E.E.; Geller, A.C. Melanoma incidence and mortality in Europe: new estimates, persistent disparities. *Br J Dermatol* **2012**, doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.11125.x.
3. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2011. Atlanta: American Cancer Society; **2011**.
4. Assaraf, Y.G. Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev* **2007**, *26*, 153-81.
5. Spurlock, C.F., 3rd; Tossberg, J.T.; Fuchs, H.A.; Olsen, N.J.; Aune, T.M. Methotrexate increases expression of cell cycle checkpoint genes via JNK activation. *Arthritis Rheum* **2012**, *64*, 1780-9.
6. Longo-Sorbello, G.S.; Bertino, J.R. Current understanding of methotrexate pharmacology and efficacy in acute leukemias. Use of newer antifolates in clinical trials. *Haematologica* **2001**, *86*, 121-7.
7. Bertino, J.R.; Goker, E.; Gorlick, R.; Li, W.W.; Banerjee, D. Resistance mechanisms to methotrexate in tumours. *Stem Cells* **1996**, *14*, 5-9.
8. Sanchez-del-Campo, L.; Montenegro, M.F.; Rodriguez-Lopez, J.N. The critical role of alpha-folate receptor in the resistance of melanoma to methotrexate. *Pigment Cell Melanoma Res* **2009**, *22*, 588-600.
9. Kelermen, L.E. The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? *Int J Cancer* **2006**, *119*, 243-50.
10. Saez-Ayala, M.; Fernandez-Perez, M.P.; Montenegro M.F.; Sanchez-del-Campo, L.; Chazarra, S.; Cabezas-Herrera, J.; Rodriguez-Lopez, J.N. Melanoma coordinates general and cell-specific mechanisms to promote methotrexate resistance. *Exp Cell Res* **2012**, *318*, 1146-59.
11. 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.; Hearing, V.J.; Gottesman, M.M. Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**, *103*, 9903-7.
12. Sanchez-del-Campo, L.; Rodriguez-Lopez, J.N. Targeting the methionine cycle for melanoma therapy with 3-O-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)-(-)-epicatechin. *Int J Cancer* **2008**, *123*, 2446-55.
13. Sanchez-del-Campo, L.; Tarraga, A.; Montenegro, M.F.; Cabezas-Herrera, J.; Rodriguez-Lopez, J.N. Melanoma activation of 3-O-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)-(-)-epicatechin to a potent irreversible inhibitor of dihydrofolate reductase. *Mol Pharm* **2009**, *6*, 883-94.
14. Das, A.; Banik, N.L.; Ray, S.K. Flavonoids activated caspases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells but not in human normal astrocytes. *Cancer* **2010**, *116*, 164-76.
15. Han, D.W.; Lee, M.H.; Kim, H.H.; Hyon, S.H.; Park, J.C. Epigallocatechin-3-gallate regulates cell growth, cell cycle and phosphorylated nuclear factor-kappaB in human dermal fibroblasts. *Acta Pharmacol Sin* **2011**, *32*, 637-46.
16. Saeki, K.; Hayakawa, S.; Isemura, M.; Miyase, T. Importance of a pyrogallol-type structure in catechin compounds for apoptosis-inducing activity. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 391-4.
17. Spencer, J.P.; Schroeter, H.; Kuhnle, G.; Srai, S.K.; Tyrrell, R.M.; Hahn, U.; Rice-Evans, C. Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell

- death involving caspase-3 activation. *Biochem J* **2001**, 354, 493-500.
18. Navarro-Peran, E.; Cabezas-Herrera, J.; Garcia-Canovas, F.; Durrant, M.C.; Thorneley, R.N.; Rodriguez-Lopez, J.N. The antifolate activity of tea catechins. *Cancer Res* **2005**, 65, 2059-64
 19. Braicu, C.; Pilecki, V.; Balacescu, O.; Irimie, A.; Neagoe, I.B. The relationships between biological activities and structure of flavan-3-ols. *Int J Mol Sci* **2011**, 12, 9342-53.
 20. Hong, J.; Lu, H.; Meng, X.; Ryu, J.H.; Hara, Y.; Yang, C.S. Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res* **2002**, 62, 7241-6.
 21. Sanchez-del-Campo, L.; Oton, F.; Tarraga, A.; Cabezas-Herrera, J.; Chazarra, S.; Rodriguez-Lopez, J.N. Synthesis and biological activity of a 3,4,5-trimethoxybenzoyl ester analogue of epicatechin-3-gallate. *J Med Chem* **2008**, 51, 2018-26.
 22. Branda, R.F.; McCormack, J.J.; Perlmutter, C.A.; Mathews, L.A.; Robison, S.H. Effects of folate deficiency on the metastatic potential of murine melanoma cells. *Cancer Res* **1988**, 48, 4529-34.
 23. Kinsella, A.R.; Smith, D.; Pickard, M. Resistance to chemotherapeutic antimetabolites: a function of salvage pathway involvement and cellular response to DNA damage. *Br J Cancer* **1997**, 75, 935-45.
 24. Ivashkevich, A.; Redon, C. E.; Nakamura, A. J.; Martin, R. F.; Martin, O. A. Use of the gamma-H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Lett* **2012**, doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.025