



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Garona, Juan

Actividad antitumoral del nuevo análogo de desmopresina [VtQu] dDAVP sobre carcinoma mamario



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Garona, J. (2015). Actividad antitumoral del nuevo análogo de desmopresina sobre carcinoma mamario. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2035>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Actividad antitumoral del nuevo análogo de desmopresina [V⁴Q⁵] dDAVP sobre células de carcinoma mamario

TESIS DOCTORAL

Juan Garona

juan_garona@hotmail.com

Resumen

La desmopresina (1-deamino-8-D-arginina vasopresina o dDAVP) es un análogo sintético de la hormona vasopresina con propiedades hemostáticas y antitumorales. Nuestro laboratorio ha conducido el diseño racional de nuevos análogos peptídicos derivatizados a partir de la estructura de dDAVP, en la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales con actividad biológica aumentada. Tras un screening inicial, el compuesto [V⁴Q⁵]dDAVP (1-desamino-4-valina-5-glutamina-8-D-arginina vasopresina) demostró una mayor potencia citostática y angiostática en modelos tumorales humanos y murinos. Tanto dDAVP, como su nuevo análogo [V⁴Q⁵]dDAVP, son agonistas selectivos del receptor de vasopresina tipo 2 (V2r) expresado en células del endotelio vascular y en distintas variantes tumorales, incluyendo cáncer mamario. El objetivo principal del presente trabajo se centró en investigar la actividad antitumoral del nuevo análogo de vasopresina [V⁴Q⁵]dDAVP, respecto del compuesto parental dDAVP, sobre modelos de cáncer mamario agresivos con relevancia clínica para explorar su potencial uso en el manejo de la enfermedad.

En primera instancia, una vez optimizado el esquema de administración usando a la droga parental dDAVP, se evaluó la actividad del nuevo análogo peptídico [V⁴Q⁵]dDAVP como agente antimetastásico. Dicho compuesto inhibió drásticamente la diseminación experimental pulmonar de células cancerosas, a una dosis tres veces menor que su péptido parental dDAVP. Adicionalmente, el tratamiento sostenido con [V⁴Q⁵]dDAVP en ratones inmunocompetentes portadores de tumores mamarios agresivos resultó en una inhibición completa de la progresión metastásica espontánea, sin desplegar signos evidentes de toxicidad.

Luego se estudió con particular interés la capacidad de [V⁴Q⁵]dDAVP de modular procesos biológicos claves en la progresión tumoral. La incubación de células tumorales con [V⁴Q⁵]dDAVP resultó en la reducción de la proliferación, la formación de colonias y la migración celular. Los efectos citostáticos in vitro desplegados por [V⁴Q⁵]dDAVP fueron mayores que dDAVP, y fueron asociados a vías de señalización activadas por V2r y a un arresto parcial del ciclo celular. También se exploró el efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la progresión y angiogénesis tumoral. El tratamiento sostenido vía intravenosa de [V⁴Q⁵]dDAVP redujo el crecimiento, invasividad y angiogénesis de xenotransplantes mamarios humanos triplenegativos en ratones inmunocomprometidos.

Siguiendo el racional que un compuesto citotóxico mejoraría su efecto antineoplásico combinado con un agente modulador del comportamiento biológico tumoral, se exploraron los beneficios terapéuticos tras combinar [V⁴Q⁵]dDAVP con quimioterapia estándar. Tanto in vitro como in vivo, la asociación del nuevo análogo peptídico con la droga citotóxica paclitaxel desplegó efectos antitumorales cooperativos, modulando el crecimiento y la agresividad de xenotransplantes de cáncer mamario altamente agresivo.

El presente trabajo muestra que el nuevo análogo [V⁴Q⁵]dDAVP mostró efectos antitumorales mejorados frente a su molécula parental dDAVP. Los ensayos muestran que un aumento de hidrofobicidad en el ciclo conformacional del péptido en las posiciones aminoacídicas 4 y 5, podrían tener un impacto en la afinidad ligando-receptor, así incrementando el efecto agonista sobre el V2r presente en células tumorales y endoteliales. En conjunto, los resultados reportados en este trabajo muestran la potencialidad de aplicación de dDAVP, y particularmente su análogo mejorado [V⁴Q⁵]dDAVP, como terapia adyuvante en el manejo del cáncer mamario agresivo y metastásico.

Tesis doctoral

“Actividad antitumoral del nuevo análogo de desmopresina [V⁴Q⁵]dDAVP
sobre células de carcinoma mamario”

Autor

Lic. Juan Garona

Director: Dr. Daniel F. Alonso

Co-Directora: Dr. Giselle V. Ripoll

Laboratorio de Oncología Molecular

Departamento de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes

Los resultados presentados en esta tesis dieron lugar o contribuyeron sustancialmente a la publicación de los siguientes artículos en revistas internacionales:

2015. “The novel desmopressin analogue [V⁴Q⁵]dDAVP inhibits angiogenesis, tumour growth and metastases in V2 receptor-expressing breast cancer models.” Garona J, Pifano M, Orlando UD, Pastrian MB, Iannucci NB, Ortega HH, Podesta EJ, Gomez DE, Ripoll GV, Alonso DF. International Journal of Oncology, Enviado.

2014. “Insight into the effect of the hemostatic agent desmopressin on lung colonization by mammary carcinoma cells in Balb/c mice”. Garona J, Pifano M, Gomez DE, Ripoll GV, Alonso DF. Anticancer Research. Vol. 34, Núm. 9, pp. 761-765.

2014. “Reciprocal interactions between tumor and endothelial cells: effects of selective vasopressin V2 receptor peptide agonists.” Garona J, Alonso DF. Cancer cell and microenvironment. Vol. 1, pp. 1-5.

2014. “Structure-activity relationship of 1-desamino-8-D-arginine vasopressin as an antiproliferative agent on human V2 receptor-expressing cancer cells.” Pastrian MB, Guzmán F, Garona J, Pifano M, Ripoll GV, Cascone O, Ciccia GN, Albericio F, Gómez DE, Alonso DF, Iannucci NB. Molecular Medicine Reports. Vol. 9, pp. 2568-2572.

2013. "Reduction of tumor angiogenesis induced by desmopressin in a breast cancer model." Ripoll GV, Garona J, Pifano M, Farina HG, Gomez DE, Alonso DF. Breast Cancer Research and Treatment. Vol. 142, pp. 9-18.

2011. "Antiproliferative effect of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin analogs on human breast cancer cells: impact of substitutions at the conformational peptide loop." Iannucci NB, Ripoll GV, Garona J, Cascone O, Ciccio G, Gomez DE, Alonso DF. Future Medicinal Chemistry, Vol. 3, Núm. 16, pp. 1987-1993.

2011. "Metastasis: recent discoveries and novel perioperative treatment strategies with particular interest in the hemostatic compound desmopressin." Alonso DF, Ripoll GV, Garona J, Iannucci NB, Gomez DE. Current Pharmaceutical Biotechnology. Vol. 12, Núm. 11, pp.1974-1980.

Los resultados presentados en esta tesis dieron lugar o contribuyeron sustancialmente a las siguientes presentaciones a congresos:

Congresos internacionales:

2013. “Structure-antiproliferative activity relationship study of an improved analog derived from Desmopressin ([V⁴Q⁵]dDAVP)”. Iannucci N, Pastrian MB, Guzman F, Ripoll GR, Garona J, Pifano M, Cascone O, Ciccio GN, Albericio F, Gomez D, Alonso DF. 23rd American Peptide Symposium. 22 al 27 de Junio, Hawaii, EE.UU.

2013. “Effect of [4-valine 5-glutamine] desmopressin, a novel vasopressin analog, on human breast cancer cell growth in two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cultures.” Garona J, Pifano M, Pastrian B, Iannucci N, Gomez DE, Alonso DF, Ripoll GV. 36th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. 10 al 14 de Diciembre, San Antonio, EE. UU.

2012. “The novel vasopressin analog [4-valine 5-glutamine] desmopressin inhibits tumor growth and angiogenesis in V2 receptor-expressing breast cancer xenografts.” Garona J, Segatori V, Iannucci N, Cascone O, Gomez DE, Alonso DF, Ripoll GV. AACR 103rd Annual Meeting. 31 de Marzo al 4 de Abril, Chicago, EE. UU.

2012. “Improved Antiproliferative Activity of Desmopressin Analogs Assessed by Ala-Scanning.” Pastrian MB, Guzman F, Ripoll GR, Garona J, Pifano M, Cascone O, Ciccia GN, Albericio F, Gomez D, Alonso DF, Iannucci N. 32nd European Peptide Symposium. 2 al 7 de Septiembre, Megaron, Grecia.

2011. “Enhanced hydrophobicity at the loop of desmopressin improves its antiproliferative activity”. Iannucci NB, Ripoll GV, Pastrian B, Garona J, Cascone O, Ciccia G, Gomez GE, Alonso DF. 22nd American Peptide Symposium. 25 al 30 de Junio, San Diego, EE.UU.

2010. “Antiproliferative and antimetastatic activity of a novel vasopressin V2 receptor peptide agonist in a breast cancer model”. Ripoll G, Garona J, Iannucci N, Orlando U, Cascone O, Podestá E, Gomez D, Alonso DF. AACR 101st Annual Meeting. 17 al 21 de Abril, Washington DC, EE. UU.

2010. “Novel perioperative treatment strategies: the case of desmopressin (dDAVP)”. Gomez GE, Ripol GV, Garona J, Iannucci NB, Alonso DF. 15th World Congress on Advances in Oncology. 06 al 09 de Octubre, Atenas, Grecia.

Congresos nacionales:

2014. “Actividad antitumoral del análogo sintético de desmopresina [V⁴Q⁵]dDAVP (1-deamino-4-valina-5-glutamina-8-D-arginina vasopresina) en combinación con paclitaxel sobre xenotrasplantes de cáncer mamario hormono-independiente en ratones atímicos”. Garona J; Pifano M; Pastrian B; Ianucci N; Gomez D; Alonso D; Ripoll G. 58^{va} Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 19 al 22 de Noviembre, Mar del Plata, Argentina.

2014. “Efecto antitumoral de desmopresina (dDAVP) y su análogo [V⁴Q⁵]dDAVP mediado por el receptor V2 (V2r) en líneas tumorales humanas con características neuroendócrinas (NE)”. Pifano M, Garona, Pastrian B, Ianucci N, Gomez D, Alonso D, Ripoll G. 58^{va} Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 19 al 22 de Noviembre, Mar del Plata, Argentina.

2013. “Efectos sobre la colonización metastásica pulmonar de distintos esquemas de administración del compuesto hemostático desmopresina (dDAVP) en un modelo preclínico de cáncer mamario”. Garona J, Pifano M, Pastrian B, Iannucci N, Gomez D, Alonso D, Ripoll G. 57^{ma} Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 20 al 23 de Noviembre, Mar del Plata, Argentina.

2012. “Key aminoacidic positions for desmopressin (dDAVP) antiproliferative effect assessed by Ala-scanning”. Pifano M, Garona J, Pastrian B, Iannucci N, Cascone O, Gomez D, Alonso D, Ripoll G. 58^{va} Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular. 29 de Octubre al 1 de Noviembre de 2012, Mendoza, Argentina.

2012. “El tratamiento de células de cáncer de mama humano MCF-7 con el péptido desmopresina induce cambios en la localización celular de cadherina epitelial y otros miembros del complejo adherente”. Besso M, Rosso M, Lapyckyj L, Garona J, Ripoll G, Vazquez-Levin M. 57^{ma} Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 14 al 17 de Noviembre, Mar del Plata, Argentina.

2011. “El péptido 1-deamino-4-valina-5-glutamina-8-D-arginina vasopresina (VQ) modula la proliferación y migración de células de cáncer mamario humano MDA-MB-231.” Garona J, Segatori V, Iannucci NB, Cascone O, Gomez DE, Alonso DF, Ripoll GV. 56^{ta} Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 17 de Noviembre, Mar del Plata, Argentina.

Índice

Abreviaturas	12
Resumen	14
Introducción.....	18
Cáncer	20
El microambiente tumoral	22
Diseminación metastásica	26
Angiogénesis en procesos fisiológicos y patológicos.....	42
Cáncer mamario.....	56
Alternativas terapéuticas en cáncer mamario	60
Análogos de vasopresina y sus receptores.....	69
El análogo sintético desmopresina.....	78
Análogos de vasopresina y cáncer	85
Efectos antitumorales del péptido dDAVP	86
Un nuevo análogo de vasopresina.....	95
Objetivos	102
Materiales y Métodos	108
Ensayos in vitro.....	113
Ensayos in vivo	126
Resultados	136
Capítulo I.....	138

Efectos sobre la colonización metastásica pulmonar de distintos esquemas de administración de análogos de vasopresina	140
Efecto citostático de dDAVP sobre células de carcinoma mamario F3II V2r-positivas.....	142
Cinética de administración de dDAVP y su efecto sobre la eficacia antimetastásica.....	145
Dosis-dependencia de dDAVP sobre la colonización metastásica experimental	148
Efecto del ácido tranexámico y la enoxaparina sobre la diseminación metastásica.....	149
Derivatización de un nuevo análogo peptídico a partir de dDAVP	151
Evaluación de la toxicidad aguda de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP en ratas Wistar	152
Efecto de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre la colonización pulmonar experimental	153
Efecto de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre la progresión metastásica espontánea.....	156
Capítulo II	162
Caracterización de los efectos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre la biología tumoral de cáncer mamario	164
Expresión de V2r en células tumorales y microvasculares	165
Efecto de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre la vía AMPc/PKA.....	168
Efecto citostático de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP mediado por V2r.....	170
Efecto de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre el crecimiento clonogénico de células tumorales	174
Efecto de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre la formación y crecimiento de colonias tumorales tridimensionales	176
Efecto de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre la distribución del ciclo celular	179
Efecto de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre la adhesión a sustrato de células tumorales	180
Efecto de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre la migración celular	183

Efecto de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre el citoesqueleto de actina.....	186
Efecto de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre la angiogénesis <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	188
Efecto de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre el crecimiento de xenotransplantes de cáncer mamario humano.....	192
Efecto de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre la agresividad y angiogénesis tumoral de xenotransplantes de cáncer mamario humano.....	195
Expresión de V2r en xenotransplantes de cáncer mamario.....	197
Capítulo III.....	204
Efectos antitumorales de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP en combinación con quimioterapia sobre xenotransplantes de cáncer mamario humano.....	206
Efecto antiproliferativo de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP combinado a paclitaxel.....	207
Modulación de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP en combinación con paclitaxel sobre la formación de colonias en 2D.....	209
Efecto de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP en combinación con paclitaxel sobre el crecimiento de colonias 3D.....	211
Efecto de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sumado a paclitaxel sobre la progresión de xenotransplantes de cáncer mamario humano.....	212
Modulación de la infiltración tumoral.....	215
Efecto sobre la supervivencia de ratones atímicos portadores de xenotransplantes de cáncer mamario.....	216
Discusión.....	220
Acciones directas de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre el crecimiento y la motilidad celular.....	222
Efectos de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre la angiogénesis y progresión tumoral.....	229
Impacto de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre la diseminación metastásica.....	236
Actividad antitumoral de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP en comparación a su análogo parental dDAVP.....	241
Potencial aplicación adyuvante de [V ⁴ Q ⁵]dDAVP en un contexto quirúrgico o en combinación con drogas citotóxicas.....	244

Conclusiones y perspectivas	252
Agradecimientos	260
Bibliografía.....	266

Abreviaturas

AA	Aminoácido
AC	Adenilato ciclasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AT	Ácido tranexámico
AVP	Arginina vasopresina
CAF	Fibroblasto asociado a cáncer
CMTN	Carcinoma mamario triple-negativo
DDAVP	Desmopresina o 1-deamino-8-D-arginina vasopresina
DMSO	Dimetil sulfóxido
EC	Célula endotelial
EMB	Extracto de membrana basal
EMR	Enfermedad mínima residual
EMT	Transición epitelio-mesenquimal
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
ER	Receptor de estrógeno
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FVW	Factor de von Willebrand
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
HER-2/neu	Receptor de factor de crecimiento epidermal humano
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HGFR	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos

HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1
i.d.	Intradérmico
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
IL-11	Interleuquina 11
LOX	Lisil oxidasa
MAPK	Proteína quinasas activadas por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
miR	Micro ARN
MMP	Metaloproteasas de matriz
MTT	Bromuro de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PGNO	Plasminógeno
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PR	Receptor de progesterona
s.c.	Subcutáneo
tPA	Activador del plasminógeno tisular
uPA	Activador del plasminógeno tipo-uroquinasa
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular
[V⁴Q⁵]dDAVP	1-desamino-4-valina-5-glutamina-8-D-arginina vasopresina

Introducción

Cáncer

La expresión “neoplasia” se refiere a un crecimiento descontrolado de células que conllevan a la formación de una masa de tejido anormal. De tal manera, el término “cáncer” hace referencia específicamente a una neoplasia maligna constituida por células agresivas, con capacidad de extenderse a otros sitios del organismo. En contraste, una neoplasia benigna se limita a su sitio de origen y, por lo general, la enfermedad no compromete la vida del paciente. Si bien no todos los tumores “evolucionan” hacia una variante maligna, las neoplasias malignas siempre atraviesan un período inicial de benignidad, de duración variable, antes de hacerse agresivas [1].

El cáncer es una patología compleja que involucra una serie de trastornos genéticos que conducen a la transformación de una célula normal y la alteración de su comportamiento. Su desarrollo se relaciona en primer lugar con la desregulación de la proliferación celular de las células tumorales, obviando los patrones de crecimiento establecidos en el ambiente circundante. En contraste con células normales, las cuales responden apropiadamente a las señales que controlan el crecimiento y la muerte celular por apoptosis, el cáncer es una patología que logra evadir tal control, permitiendo que una célula crezca y se reproduzca de manera descontrolada, invadiendo tejidos y órganos sanos, diseminándose eventualmente en el organismo.

El cáncer puede ser el resultado de la proliferación anormal de cualquiera de los distintos tipos celulares presentes en el organismo. Por

ende, existen más de 100 tipos distintos de cáncer, que varían notablemente en cuanto a su desarrollo y respuesta al tratamiento. Los cánceres se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir del cual se originan. Los que derivan de las células epiteliales se denominan “carcinomas” y los que derivan de tejido conectivo o músculo “sarcomas”. Otros tipos de cánceres son las diversas formas de leucemia derivadas de células hematopoyéticas y los cánceres derivados del sistema nervioso central [2].

En el año 2012 el cáncer fue responsable de 8.2 millones de muertes estimadas a nivel mundial. Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta, de acuerdo a las estimaciones realizadas por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC). En nuestro país, murieron por cáncer casi 62,000 hombres y mujeres ese año. En magnitud, el volumen más importante de casos estimados en Argentina corresponde al cáncer de mama con más de 18,700 casos nuevos por año (18% del total y 36% del total de casos en mujeres). En incidencia, el cáncer de mama es seguido por el de próstata (13% del total), el de colon y recto (10.5%) y pulmón (10%) [3].

La mayoría de los cánceres se desarrollan en personas adultas y ancianas debido a daños acumulativos en el genoma de las células del organismo más expuestas. La mayoría de las células neoplásicas conforman tumores “sólidos”, mientras que las neoplasias hematológicas tienden a mantener la característica de las células de origen, que viven en medios líquidos, como la sangre y la linfa. En este caso las leucemias y linfomas tienden siempre a un comportamiento maligno, ya que heredan la capacidad de diseminarse de las células linfoides de las cuales se originan. También merecen una mención especial los tumores del sistema nervioso

central como los “gliomas”, que pueden conducir a una enfermedad grave debido a su localización primaria sin que ocurra diseminación metastásica [1].

La tumorigénesis es un proceso complejo que implica múltiples pasos. Cada uno de estos pasos refleja alteraciones genéticas que conllevan a la transformación progresiva de células normales a células tumorales. Las células cancerosas presentan capacidad proliferativa sostenida, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa ilimitada, capacidad de inducir angiogénesis y de activar la invasión y metástasis. A estas características esenciales se agrega la inestabilidad genómica que presentan estas células, el microambiente que favorece la progresión maligna (entorno inflamatorio y presencia de células que cooperan con el fenotipo transformado), la capacidad de las células tumorales de reprogramar el metabolismo celular y de evadir la respuesta inmune del organismo [4]. Si bien estas características se encuentran presentes en la gran mayoría de tipos tumorales, no son aplicables a todos ellos.

El microambiente tumoral

Al igual que el órgano donde el cáncer se origina, el tejido tumoral posee un tejido de soporte o estroma, con el cual interactúa recíprocamente. Las células estromales asociadas a tumor desempeñan un rol fundamental en la patogénesis tumoral alterando la señalización celular, la proliferación y la angiogénesis [5].

Durante la progresión tumoral el estroma “dialoga” y coevoluciona con el epitelio mutado, mediante la producción de factores señalizadores. Se sabe que el microambiente estromal también sufre alteraciones genéticas, funcionales y estructurales, y es probable que, aunque la mutación iniciadora ocurra en el epitelio, las señales que promueven la progresión tumoral se produzcan en este estroma alterado [1].

La diseminación metastásica involucra una serie de pasos complejos, interdependientes y secuenciales, donde el no cumplimiento de alguno de ellos impide que una célula tumoral conquiste un órgano distante y se convierta en metastásica. Luego de la transformación inicial y el crecimiento de las células tumorales, el tumor debe ser capaz de incrementar la vascularización. Para ello, debe existir una sobreexpresión de factores proangiogénicos aportados tanto por el tumor como por las células del ambiente tumoral. Luego, las células tumorales deben ser capaces de desprenderse del tumor primario, invadir el estroma del huésped, intravasarse en los vasos linfáticos o sanguíneos, diseminarse a través del lecho vascular a los distintos órganos y proliferar en un órgano receptivo.

Durante la progresión tumoral y metástasis, se establece una comunicación activa entre las células tumorales y el estroma, mediado por señales autócrinas, parácrinas o endócrinas mediante contactos célula-célula o señales de tipo factores de crecimiento y citoquinas, entablando una comunicación análoga a la establecida entre una célula epitelial y su ambiente durante el desarrollo embrionario.

El microambiente tumoral o estroma que se encuentra en íntima relación con las células tumorales consiste en una matriz extracelular tridimensional y células estromales tales como fibroblastos, células

endoteliales que componen la vasculatura y células inflamatorias (linfocitos, macrófagos y mastocitos). Estas células especializadas enriquecen la matriz extracelular (MEC) secretando componentes proteicos y también aportan al medio factores de crecimiento. Las células del epitelio basal, mioepiteliales y los fibroblastos expresan mayormente componentes que aportan a la membrana basal (colágeno IV, laminina, entactina y proteoglicanos heparán-sulfato) de manera tejido-específica [6].

El rol de la MEC en la tumorigénesis incluye efectos sobre la polaridad y la angiogénesis. Las integrinas epiteliales confieren polaridad a las células al unirse a la membrana basal. El tipo de integrinas expresadas y el tipo de matriz a la cual se une cada integrina influencia en la proliferación y la migración de las células endoteliales y epiteliales. El colágeno de tipo IV interactúa con las integrinas $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_2\beta_1$ y esta interacción resulta mitogénica al endotelio durante la angiogénesis tumoral, sin embargo cuando la misma matriz es digerida por la acción de proteasas, la unión a las integrinas β_1 disminuye. Por el contrario, la integrina β_3 tiene mayor afinidad por el colágeno tipo IV desnaturalizado y esta unión disminuye la proliferación y la migración endotelial [7].

Las bases genéticas de la carcinogénesis involucran la adquisición de múltiples mutaciones genéticas en las células epiteliales. Esto redundando en un estroma activado, caracterizado por la proliferación de los fibroblastos, un incremento de colágeno III y V en la vecindad de las células tumorales, junto a la sobreexpresión de ciertas proteínas típicas de músculo liso tales como α -actina de músculo liso, vimentina, miosina, tenasina y desmina. La activación de un programa de diferenciación parcial propio del músculo liso llevó a que se nombre a estos fibroblastos como miofibroblastos, y su asociación con las células tumorales en el entorno del tumor produjo que se

los conozca también como fibroblastos peritumorales o fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) [8]. Este estroma especializado posee abundantes células inflamatorias que aportan junto con los CAFs a la secreción de factores de crecimiento y moléculas de la MEC para contribuir con el crecimiento de las células tumorales en forma parácrina. Las células inflamatorias secretan numerosas citoquinas, factores de crecimiento y quemoquinas y producen especies reactivas de oxígeno que estimulan la proliferación, previenen la apoptosis, inducen la morfogénesis o median el daño al ADN en las células epiteliales [9]. Por ejemplo, la pancreatitis crónica incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de páncreas y esto se ha asociado con el proceso inflamatorio crónico [10]. Distintas evidencias muestran que en los cánceres asociados a inflamación estaría involucrada la activación de la vía del factor nuclear de transcripción NF- κ B [11-13].

Las características alteradas del estroma acompañan o inclusive preceden la transformación maligna de las células normales. Diferentes estudios que involucran el cocultivo de fibroblastos transformados o normales con células normales y neoplásicas han demostrado que las células son capaces de responder a los fibroblastos modificando su comportamiento normal o incrementando su agresividad [14, 15].

Olumi *et al.* examinaron el efecto de los CAFs (obtenidos de un adenocarcinoma de próstata) sobre células epiteliales no tumorigénicas. La interacción con los fibroblastos indujo a las células normales a mostrar una morfología ductal característica de las neoplasias intraepiteliales [14]. El aislamiento y posterior cultivo de estas células en un huésped animal mostró que las células epiteliales fueron capaces de formar un tumor por sí mismos sin la interacción de los CAFs. Es decir, las señales oncogénicas

desplegadas por estos fibroblastos son estables y pueden estimular la transformación de una población no maligna en tumorigénica [8].

En todos estos procesos de transformación mediada por el estroma parece estar involucrado el factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1) secretado por los fibroblastos. La alta expresión de TGF- β 1 estaría involucrada en la inducción de cambios en la morfología y un incremento de la expresión de colágeno II, así como la supresión del sistema inmune [7].

Diseminación metastásica

A pesar de los continuos avances en las técnicas quirúrgicas y del desarrollo de terapias adyuvantes y de mantenimiento, la gran mayoría de las muertes por cáncer se relacionan con la diseminación metastásica. Aunque las bases genéticas de la tumorigénesis pueden variar ampliamente entre los diferentes tipos de cáncer, los pasos moleculares y celulares requeridos para la formación de metástasis son similares en las distintas variantes de tumores sólidos. En el proceso de invasión tumoral y metástasis participan distintos factores derivados del tumor y del organismo huésped, como factores angiogénicos, proteolíticos, migratorios y proliferativos, entre otros [16].

Cascada metastásica

Para formar un tumor secundario, las células tumorales deben ser capaces de completar exitosamente una serie de pasos que lo conducirán a colonizar y crecer en un sitio distante. En cada uno de estos pasos las

células tumorales interactúan con componentes estromales. Este proceso complejo y selectivo se denomina “cascada” metastásica (Figura 1).

A medida que el tumor primario crece, necesita inducir la formación de vasos que lo provean de nutrientes y oxígeno. Este proceso es conocido como angiogénesis (desarrollado en profundidad más adelante), también le otorga al tumor una ruta de escape a través de la cual las células que abandonan el tumor primario pueden acceder a la circulación. Por otra parte, las células cancerosas pueden entrar en el lecho circulatorio a través del sistema linfático [17].

Las células deben ser capaces de disminuir la adhesión intercelular y de esta forma poder alterar la arquitectura tisular y avanzar hacia la progresión maligna. Las moléculas de adhesión E-cadherina e integrinas se constituyen como mediadores importantes en el fenotipo maligno. Las células con capacidad metastásica deben ser resistentes a las señales extracelulares de muerte celular programada (apoptosis), así como también deben presentar la capacidad de perturbar la membrana basal y la matriz extracelular, donde las metaloproteasas de matriz (MMP) juegan un rol preponderante [18].

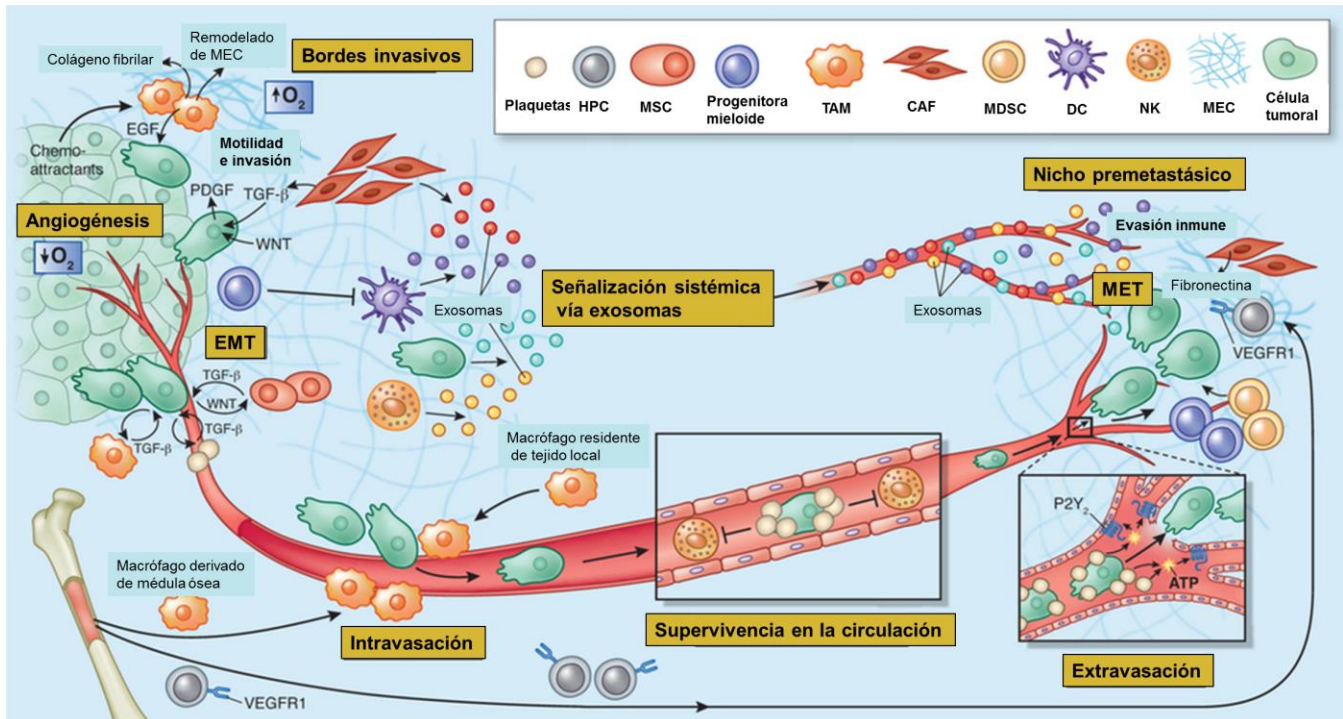


Figura 1. Etapas de la cascada metastásica y la participación del microambiente tumoral. En respuesta a un ambiente hipóxico, la **angiogénesis** es inducida por la secreción de distintos factores proangiogénicos por las células tumorales. Los macrófagos, plaquetas y células *stem* mesenquimales (MSCs) contribuyen a la **transición epitelio-mesenquimal** (EMT), permitiéndole a las células tumorales adquirir un fenotipo invasivo. Un mediador clave en este evento es TGF- β , el cual es secretado por células estromales y participa en un *loop* de señalización parácrina sobre las células tumorales. Los macrófagos asociados a tumor (TAMs), fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) y las células progenitoras derivadas de linaje mieloide suelen asociarse en los bordes del tumor durante la **invasión** favoreciendo la remodelación de la matriz extracelular (MEC), y la inmunosupresión al interferir la diferenciación de células dendríticas (DC). Durante la **intravasación** de las células tumorales a la circulación se ha reportado que los macrófagos se localizan en áreas perivasculares dentro del tumor donde asisten a las células malignas para atravesar las paredes vasculares. En la **circulación**, plaquetas y distintos componentes de la coagulación se asocian a las células tumorales evitando el reconocimiento de células del sistema inmune. Las plaquetas escoltan a las células tumorales al sitio de **extravasación**, donde se unen a regiones de retracción vascular favoreciendo la salida del sistema circulatorio. En sitios secundarios como el pulmón, los fibroblastos aumentan los niveles de fibronectina, la cual sirve como anclaje para células progenitoras hematopoyéticas (HPCs) y células tumorales. Distintas células con actividad inmunosupresora, incluyendo las células supresoras derivadas de linaje mieloide (MDSCs), también condicionan el **nicho premetastásico** haciéndolo más permisivo para la colonización tumoral. El tumor primario y el secundario pueden comunicarse entre sí por medio de **exosomas** liberados por células tumorales y estromales. Su contenido dirige el tropismo de la diseminación tumoral, modula la evasión inmunológica y favorece la **transición mesenquimal-epitelio** (MET) (Adaptado de Quail & Joyce, 2013).

Distintos pasos fundamentales de la metástasis involucran a la motilidad de las células cancerosas. La migración celular involucra cambios dinámicos en el citoesqueleto, en las interacciones célula-matriz, proteólisis localizada, contracciones de actina-miosina y el desensamblaje de contactos focales. Todos estos cambios están modulados por una serie de nodos fundamentales que incluyen integrinas en las adhesiones focales, proteasas de membrana, proteasas secretadas y la maquinaria contráctil de acto-miosina.

Las células tumorales que tienen la capacidad de intravasarse y entrar en circulación, también deben ser resistentes a la anoikis (muerte celular por pérdida de adhesión al sustrato). En este paso, las células tumorales interactúan con células normales del paciente, por ejemplo con las plaquetas.

Las células necesitan sobrevivir en la circulación hasta adherirse finalmente a las paredes del lecho vascular y extravasarse para invadir los tejidos del órgano blanco. Las células tumorales que eventualmente dan lugar a focos tumorales secundarios deben sobrevivir a una serie de interacciones potencialmente letales con los mecanismos homeostáticos del huésped, la turbulencia de la circulación y los mecanismos de defensa del sistema inmunitario [19].

Una vez en el nuevo sitio, las células dan forma a micrometástasis pre-angiogénicas, de tal forma que su crecimiento sostenido induce la formación de nuevos vasos, continuando así con el desarrollo de la enfermedad. La mayoría de las células una vez extravasadas, no tienen la capacidad de colonizar efectivamente el nuevo sitio. Estas células o micrometástasis pueden mantenerse en un estado quiescente (fenómeno

conocido como *dormancy*) por varios años antes de convertirse en una metástasis detectable o incluso muchas de ellas nunca progresan. Durante esta instancia, las células deben contar con la capacidad de iniciar un nuevo tumor, ya que sólo unas pocas células colonizan el sitio metastásico distante y a partir de ellas se debe formar la masa tumoral. En este sentido, existen evidencias de que en algunos tipos tumorales se encuentran células tipo *stem* con capacidad de auto renovación [20]. Aunque está en discusión la abundancia relativa de este tipo de células en tumores sólidos primarios, la capacidad de autorenovación es indispensable para la implantación del nuevo foco.

Las interacciones de las células tumorales con su estroma en las distintas etapas de la colonización metastásica son claves. La presencia de células mesenquimales (fibroblastos) y células del sistema inmune (leucocitos, linfocitos, macrófagos, etc.), asociadas a un escenario de inflamación crónica juegan un rol preponderante en la progresión tumoral, tanto en el foco primario del tumor como en el tejido colonizado. De hecho, previo a la anidación de las células malignas en el tejido diana, el tumor primario puede orquestar a distancia la creación de un nicho premetastásico por medio de la secreción de distintas citoquinas y factores de crecimiento que movilizan hacia el órgano blanco distintas células derivadas de médula ósea, incluyendo progenitores vasculares. Este condicionamiento resulta ampliamente favorable para que las células tumorales concreten la formación de un tumor secundario [21].

Capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales

Clásicamente, el proceso de invasión puede ser dividido en tres pasos secuenciales: (1) la adhesión de las células tumorales a la membrana basal u otras estructuras de la matriz extracelular, (2) la disgregación de la membrana basal por digestión proteolítica y (3) la migración de las células invasivas a través la membrana basal modificada. Las similitudes biológicas observadas en los procesos de invasión tumoral y angiogénesis subrayan la función cooperativa de las células tumorales y las células endoteliales durante el proceso de progresión tumoral.

Las proteasas extracelulares están encargadas de la degradación, remodelación y liberación de factores reguladores de la angiogénesis a partir de la MEC durante la progresión de la migración celular y la invasión. Existen tres grandes grupos de proteasas compuestos por MMPs, cisteíno proteasas y serino proteasas, tales como los activadores de plasminógeno tipo tisular o uroquinasa (tPA y uPA). Estas últimas se encargan de activar diversas metaloproteasas latentes y degradar algunas proteínas de matriz tales como fibronectina, laminina y colágeno tipo IV [22].

La adhesión de las células tumorales a la membrana basal involucra el anclaje específico a glicoproteínas de matriz, tales como fibronectina, laminina y colágenos, las cuales se unen a una variedad de receptores de la superficie de las células tumorales como la integrina $\beta 1$ entre otras moléculas de anclaje. Sin embargo, a medida que el tumor pierde diferenciación y aumenta su agresividad, la dependencia al anclaje no resulta esencial para la célula tumoral, ya que las integrinas continúan mediando en las señales de supervivencia aún en ausencia de su ligando [23]. El proceso por el cual las células tumorales adquieren de manera transitoria

o permanente este tipo de características más agresivas e invasivas, acompañado por una clara desdiferenciación celular, menor dependencia del anclaje y pérdida de marcadores epiteliales, se conoce como transición epitelio-mesenquimal. Ha sido reportado que esta transición hacia un fenotipo más migratorio y metastásico, puede ser revertido una vez que la célula alcanza el órgano diana y las señales del microambiente tumoral metastásico son las indicadas. En este contexto la célula encara una reprogramación donde readquiere un fenotipo más diferenciado mediante una transición mesenquimal-epitelial, la cual le permite proliferar y consolidar el foco secundario metastásico en el tejido colonizado [24].

La adquisición de habilidades migratorias por parte de las células malignas, requieren una importante reorganización del citoesqueleto y la iniciación de la migración basada en el citoesqueleto de actina. De manera simplificada, la motilidad de dichas células se basan en la polimerización de monómeros de actina y su transformación en filamentos polarizados. Estos filamentos son llamados actina-F y están en un constante estado de flujo con nuevos monómeros agregados a su extremo positivo y una despolimerización en su extremo negativo. Las principales proteínas que regulan su dinámica son las proteínas FH y los miembros de la familia Ena/VASP (aumenta la tasa de monómeros agregados al extremo positivo de los filamentos), las proteínas relacionadas a la actina Arp1 y 2 (regula la ramificación de los filamentos de actina) y la cofilina (aumenta el número de extremos positivos para permitir la polimerización a partir del corte de filamentos pre-existentes). La habilidad migratoria, a su vez, requiere la generación de fuerza para vencer factores que antagonizan el movimiento (adhesiones célula-células y célula-MEC, arrastre, etc.). La actina-F se asocia con filamentos de miosina II compuestos de cadenas pesadas y

cadenas livianas regulatorias que usan energía a partir del ATP, y así permitir la contracción actina-miosina. La regulación de la contractilidad del aparato de actina-miosina se basa en una intrincada red de quinasas que fosforilan las cadenas livianas de la miosina II (MLC) [25].

Las células que retienen parcialmente la polaridad aún tienen una cola que posee fibras de retracción y un frente con fibras de *stress* que es capaz de formar adhesiones focales y adherirse a los componentes de la MEC. Se dice que estas células poseen un movimiento “fibroblastoide”. Por el contrario, las células que pierden toda la polaridad se denominan “ameboides”. Estas células pueden migrar hacia el estímulo mucho más rápido que las más polarizadas, ya que se unen pobremente a la MEC [26].

En condiciones *in vitro*, el contacto entre la célula en movimiento y la MEC pueden ser de dos tipos, los complejos focales y las adhesiones/contactos focales [27]. Ambas uniones involucran interacciones mediadas por integrinas que se unen a fibronectina, laminina, vitronectina y colágeno, pero difieren en estabilidad. Los complejos focales son estructuras transitorias que no soportan una tensión significativa y que se ensamblan y desensamblan rápidamente en el frente de las células, pero que luego pueden convertirse en adhesiones focales más persistentes hacia la región media de la célula. Por otro lado, los contactos focales, resisten tensión y son estructuras más estables y las células con estos movimientos poseen una velocidad de migración más lenta.

La microscopía intravital permite la observación de los procesos migratorios e invasivos de una célula metastásica en tiempo real. Wycoff *et al.* observaron células de adenocarcinoma mamario en ratas descubriendo que las células con mayor capacidad metastásica se encontraban más

polarizadas hacia los vasos sanguíneos que aquellas que no tenían la misma capacidad de formar metástasis [28]. Esta polarización de las células metastásicas se asoció con un incremento en la expresión del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR). Este receptor permite que la célula tumoral migre hacia el estímulo del factor de crecimiento epidermal (EGF) liberado por los macrófagos presentes en el microambiente tumoral [29]. El movimiento de las células metastásicas *in vivo* durante la migración quimiotáctica y la intravasación mostró ser ameboide. Las células no metastásicas, por su parte, no fueron capaces de intravasarse en los vasos sanguíneos, ya que se destruían en el paso por las uniones intercelulares de las células endoteliales.

Para penetrar, las células invasoras deben romper segmentos locales en la estructura organizada de la membrana basal, un proceso regulado y preciso que involucra a enzimas proteolíticas. Una vez que las células tumorales ingresan al estroma, fácilmente pueden ganar acceso a los capilares sanguíneos neoformados o vasos linfáticos.

Diseminación de células tumorales vía hemática y linfática

Una vez que las células migratorias han abandonado el tumor primario, pueden intravasarse en los vasos sanguíneos o linfáticos. Cada ruta de diseminación puede conducir a la circulación venosa, ya sea a través del drenaje linfático, mayormente a través del ducto linfático izquierdo (ducto torácico) o del ducto linfático derecho, con el subsecuente vuelco a la vena subclavia. A lo largo del camino, el fluido linfático es filtrado por los ganglios linfáticos. Este tipo de mecanismo de diseminación se muestra claro en los melanomas y carcinomas que tienden a desarrollar metástasis

en los nódulos linfáticos más frecuentemente que los sarcomas; sin embargo aún no queda claro si esta diferencia se debe a distintos mecanismos de intravasación o de crecimiento [30].

El camino tomado por la célula tumoral que migra hacia un nuevo sitio donde establecerse puede estar supeditado en gran parte por las restricciones físicas de la vasculatura, aunque también podrían existir mecanismos de atracción a cierto tipo de vasos. Los vasos linfáticos carecen de las uniones interendoteliales típicamente vistas en los vasos sanguíneos, así como también del recubrimiento de las células de sostén de los vasos, pericitos y células del músculo liso [31]. Esto convierte a los vasos linfáticos en una barrera fácil de atravesar por las células tumorales. Además, la circulación casi pasiva que posee el sistema linfático, facilita la supervivencia de las células tumorales.

La angiogénesis tumoral es indispensable para que un tumor pueda desarrollarse. Sin embargo, la inhibición de la linfoangiogénesis (formación de nuevos vasos linfáticos a partir de vasos existentes) no afecta de manera considerable el desarrollo del tumor primario [32]. Debido a que los vasos sanguíneos y linfáticos comparten un mismo origen embrionario y responden a muchos de los mismos factores de crecimiento es probable que los tumores induzcan de igual manera tanto la angiogénesis como la linfoangiogénesis, si bien no existen evidencias definitivas. La linfoangiogénesis se ha visto en pocas variantes tumorales tales como melanoma y carcinomas escamosos de cabeza y cuello [33, 34]. Una de las razones de este fenómeno podría ser la presencia de inhibidores de la linfoangiogénesis, aunque aún no se han descrito de manera clara moléculas con esta función [17].

El proceso metastásico es altamente ineficiente

Aunque un gran número de células cancerosas se liberan a partir de un tumor primario agresivo, son pocas las que logran generar metástasis. Este proceso poco eficiente, ha sido bien documentado en observaciones en seres humanos y en modelos animales. Butler y Gullino pudieron cuantificar el número de células que entran a la circulación sistémica diariamente, estimándolo en unos 4×10^6 células tumorales liberadas por gramo de tumor primario [35]. Por otro lado, mediante el conteo de colonias en los pulmones luego de aplicar una inyección endovenosa de células cancerosas en suspensión a animales de laboratorio, es posible obtener una cuantificación un poco más precisa de la formación de nódulos metastásicos [36]. Aún empleando tumores transplantables altamente agresivos, la eficiencia de la diseminación metastásica es menor al 0.1%. Estudios cinéticos efectuados en ratones, apuntan a una masiva destrucción de células tumorales en la microcirculación. Como resultado de daños mecánicos por interacción con las paredes de la microvasculatura y de distintos mecanismos de respuesta inmunológica, las células tumorales son destruidas en minutos o en unas pocas horas [37].

Siguiendo estas evidencias, se ha encontrado que las células viables individuales o no agregadas a menudo fallan para formar metástasis, mientras que las células tumorales que conforman conglomerados o émbolos multicelulares desarrollan una alta capacidad metastásica luego de ser inyectadas por vía endovenosa [38]. A este respecto, se ha descrito que células provenientes de tumores de tejido conectivo tales como fibrosarcomas y gliomas tienden a migrar individualmente, mientras que las células de melanoma y carcinomas a menudo migran colectivamente [30]. Topal *et al.* han demostrado que células de cáncer colónico agregadas

tienen una alta eficiencia metastásica en el hígado comparada con células no agregadas. Las metástasis hepáticas fueron observadas en 81% de las ratas después de una inyección intraportal de 5×10^5 células tumorales bajo la forma de agregados multicelulares. En cambio, la eficiencia metastásica bajó al 16% después de la inyección de la misma cantidad de células viables pero en forma desagregada, como suspensión monocelular [39]. Al agregarse, las células tumorales podrían sobrevivir en grandes aglomerados y ser atrapadas en la microcirculación, donde lograrían adherirse a las células endoteliales. De esta forma, serían capaces de soportar las agresiones mecánicas y evadir los mecanismos de defensa del hospedador y, de esta forma, estar en condiciones de formar tumores secundarios.

Las células tumorales ingresadas a la corriente sanguínea interaccionan con componentes del sistema hemostático mediante la expresión de factores directamente involucrados en la agregación plaquetaria, o citoquinas que modulan los procesos inflamatorios. Un ejemplo de estos eventos, es la expresión del factor tisular (TF) sobre la superficie celular del epitelio transformado. TF es expresado generalmente por las células endoteliales en respuesta a señales de daño tisular. La presencia de TF dispara la cascada de coagulación, conduciendo a la formación de trombina. La trombina cataliza la conversión del fibrinógeno circulante en fibrina insoluble que se deposita alrededor del tejido dañado, sirviendo de sostén para la regeneración del tejido. TF es una proteína asociada a membrana, y su aumento en la superficie de las células tumorales puede activar el sistema de coagulación. Este proceso se ve beneficiado por la angiogénesis tumoral que forma vasos demasiado permeables a los factores de coagulación y fibrinógeno [40]. Estos eventos permiten que se forme un depósito de fibrina alrededor de las células

tumorales, determinando la formación de microtrombos que incrementan la eficiencia del proceso de metástasis [41]. Esta cubierta de fibrina aumenta las probabilidades de atrapamiento de las células tumorales en la microvasculatura del órgano blanco, las protege de las agresiones del sistema inmune y previene la destrucción por daño mecánico durante su paso por la circulación [42].

Como se mencionó previamente las células tumorales que logran colonizar un órgano distante deben sobrevivir al daño mecánico de la circulación, evadir los mecanismos de defensa inmunológico y superar interacciones críticas con distintos componentes homeostáticos del huésped, [19]. En línea con estos conceptos, la administración de un potente inhibidor sintético de la enzima profibrinolítica uroquinasa junto con células metastásicas de carcinoma mamario, dió como resultado un aumento de la colonización pulmonar [43].

Por otro lado, los eventos trombóticos ocurridos en pacientes con el síndrome de Trousseau, entidad que corresponde al tromboembolismo sufrido por pacientes con cáncer, pueden ocurrir lejos del sitio donde se encuentra el tumor primario. Este hecho sugiere que el tumor también puede ejercer un efecto procoagulante sistémico. En este sentido, se describió que TF puede ser liberado a la circulación en asociación con micropartículas de membrana liberadas de la superficie de las células neoplásicas [44]. Estas vesículas extracelulares derivadas de membrana son también conocidas como exosomas y juegan un rol importante en la comunicación intracelular y la progresión tumoral. Los exosomas derivados de tumor u oncosomas, pueden transportar proteínas oncogénicas, transcriptos, ADN y distintos microARNs (miR) [45]. Los miR son secuencias cortas de ARN simple cadena de 21 a 23 nucleótidos que regulan la

expresión génica. Dichas moléculas poseen la capacidad de unirse a una secuencia específica de ARN mensajero, bloquear su traducción y causar su degradación. Se conoce que distintos perfiles de expresión o silenciamiento de microARNs se asocian a tipos específicos de cáncer [46].

Genes asociados a la diseminación metastásica

Se han asociado distintos genes a cada una de las etapas dentro de la cascada metastásica. Estos se denominan metastogenes y se clasifican en tres categorías:

- Genes de iniciación de la metástasis: Permiten a las células transformadas invadir el tejido circundante promoviendo la motilidad celular, la degradación de la matriz extracelular, la angiogénesis y la evasión del sistema inmune. Por ejemplo genes reguladores de la invasión mediada por la vía del factor de crecimiento de hepatocito (HGF) y su receptor (HGFR), tales como el gen codificante para metadherina.

- Genes de progresión de la metástasis: La expresión de estos genes en células tumorales que entraron en circulación aumenta su capacidad de traspasar las paredes de los capilares, implantarse y sobrevivir en el nuevo sitio colonizado. Un claro ejemplo es el gen codificante para la proteína lisil oxidasa (LOX). La excreción sistémica de LOX conlleva a su acumulación en los pulmones, donde se ha sugerido que actúa en las proteínas de la MEC del órgano generando un nicho permisivo para las células cancerosas favoreciendo su infiltración.

- Genes de virulencia metastásica: Confieren propiedades esenciales para la colonización del órgano blanco específico. Su expresión consolida el

fenotipo metastásico de células diseminadas que exitosamente completaron las etapas de iniciación y progresión de la cascada metastásica. Factores como la Interleuquina 11 (IL-11) movilizan a los osteoclastos; células que degradan, remodelan y reabsorben hueso. A pesar de que no le confiere ninguna ventaja a las células de carcinoma mamario presentes en el tumor primario, permite a las células tumorales en circulación establecer metástasis osteolíticas en hueso [47].

Tropismo y microambiente metastásico

Como se mencionó previamente, además de las propiedades intrínsecas de las células tumorales, el microambiente tumoral juega un rol clave en la supervivencia y en la progresión metastásica de la enfermedad. La contribución del estroma asociado al tumor favorece lo que en sí mismo es un proceso altamente ineficiente, e incluye a la respuesta angiogénica, y la participación multifacética de fibroblastos y células inmunes. En el 2010, Condeelis *et al.*, reportaron mediante el uso de microscopía intravital en modelos murinos que células invasivas de cáncer mamario comigraban y se intravasaban junto con células endoteliales y macrófagos perivasculares formando unidades microestructurales designadas como TMEM o microambiente tumoral metastásico [48]. Estudios en pacientes con cáncer mamario agresivo y resistente a terapia endócrina y molecular revelaron una asociación positiva entre valores de TMEM encontrados en circulación y el riesgo de desarrollar metástasis [49]. Hace varias décadas se encontraron las primeras evidencias de la presencia de células tumorales y estromales (fibroblastos activados, monocitos y plaquetas) en circulación formando agregados heterotípicos en modelos animales [50].

Adicionalmente, tras analizar biopsias de metástasis cerebrales de pacientes con cáncer mamario, renal, pulmonar y ovárico, se observó que los nódulos metastásicos portaban células estromales del sitio primario respectivo [51].

Determinados tipos de cáncer muestran patrones órgano-específicos de metástasis. El cáncer de mama con frecuencia desarrolla metástasis en pulmón, hueso o hígado, mientras que el cáncer de próstata forma metástasis principalmente en hueso [52, 53]. Sólo un porcentaje de la distribución de las metástasis puede ser explicado por el atrape mecánico en la microcirculación (teoría anato-mecánica). La teoría del suelo y la semilla formulada en 1889 por Stephen Paget, señala que las células tumorales (semillas) sólo pueden crecer en el órgano cuyo microambiente (suelo) sea apropiado y permisivo [49]. Según estos nuevos hallazgos parecería ser que las células tumorales serían capaces de acarrear una porción de su propio “suelo” (células del microambiente tumoral primario), y que esto les serviría como un estroma provisorio hasta que las células tumorales metastásicas recluten un nuevo estroma. Adicionalmente se observó que estos focos metastásicos pueden crecer intravascularmente. Estas observaciones ponen en juicio al paradigma clásico de la cascada metastásica, donde la adhesión e intravasación en el órgano blanco no serían necesarias, ya que las metástasis pulmonares podrían comenzar su crecimiento dentro de la vasculatura [54].

Angiogénesis en procesos fisiológicos y patológicos

La vasculatura de la mayoría de los tejidos adultos es quiescente debido a la preponderancia de factores inhibitorios sobre activadores de la angiogénesis. Sin embargo, en determinados procesos fisiológicos normales como la embriogénesis y la reparación/cicatrización de heridas, o en diversas condiciones patológicas incluyendo el desarrollo tumoral, la artritis reumatoidea y diversas enfermedades cardiovasculares, este equilibrio cambia a favor del fenotipo pro-angiogénico.

La angiogénesis se puede visualizar como un proceso de *sprouting* o brotación de nuevos vasos a partir del endotelio vascular preexistente (Figura 2). Dicho proceso puede dividirse en dos etapas; una de activación y otra de resolución. La fase de activación involucra: producción y secreción de factores angiogénicos; activación y proliferación de células endoteliales; aumento en la permeabilidad vascular y deposición extravascular de fibrina; desensamblaje de la pared vascular; degradación de la membrana basal; migración e invasión celular de la MEC; y formación del lumen capilar. Finalmente, en la etapa de resolución, tras la reconstrucción de la MEC, el ensamblaje de la pared vascular y el reclutamiento y diferenciación de células de músculo liso, el flujo sanguíneo se establece en el vaso recién formado [55].

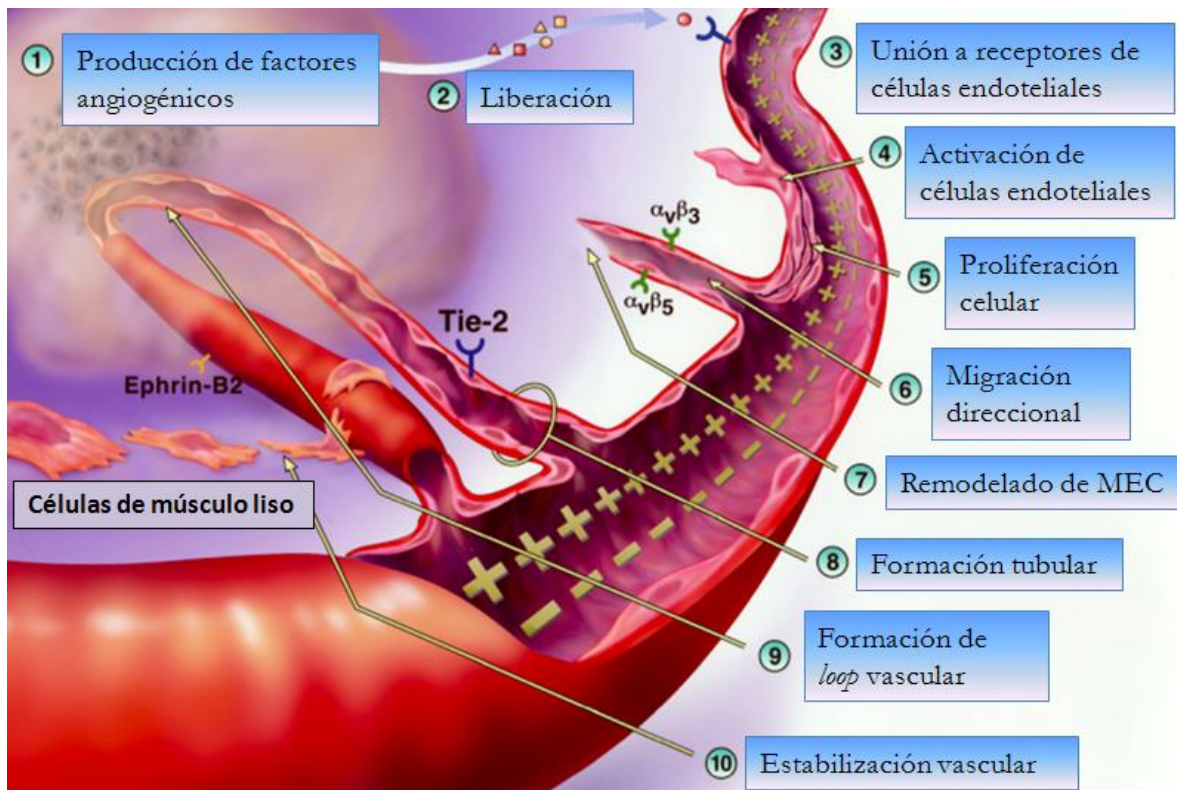


Figura 2. Angiogénesis. Etapas involucradas en la brotación de nuevos vasos a partir del endotelio vascular pre-existente (Adaptado de “*The angiogenesis foundation*”).

Como se mencionó anteriormente la regulación del proceso angiogénico está dado por un balance entre moléculas que estimulan el proceso angiogénico y otras que lo inhiben. En este sentido, la migración hacia un fenotipo pro-angiogénico de determinado tejido está dada por el aumento en la biodisponibilidad de factores estimuladores de la angiogénesis. Esto introduce el concepto de “*switch* angiogénico”. En un contexto tumoral, cuando el *switch* está “apagado” los factores antiangiogénicos predominan, en cambio cuando el balance se vuelca levemente hacia agentes activadores del proceso angiogénico y el *switch* se

“enciende”, una corona vascular se desarrolla alrededor del foco tumoral, irrigándolo con nutrientes y favoreciendo su crecimiento [56].

Moléculas reguladoras del proceso angiogénico

Como se comentó anteriormente existen factores que promueven o inhiben el proceso angiogénico. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es un poderoso mitógeno de células endoteliales y uno de los mediadores más potentes de la angiogénesis fisiológica y patológica. Sus receptores (VEGFR) poseen actividad tirosín quinasa y en adultos son expresados primordialmente en el endotelio. Cuando el VEGF es secretado en exceso por las células tumorales y se une al VEGFR-2 presente en las células del endotelio vascular estimula la formación de nuevos brotes vasculares.

Uno de los mayores estímulos para la expresión de VEGF es la hipoxia. El desarrollo de nuevos vasos puede ser considerado una de las tantas respuestas adaptativas a la falta de oxígeno. Existe un regulador clave de dichas respuestas denominado factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1). Además de activar la expresión de genes involucrados en la angiogénesis, actúa sobre el transporte de oxígeno, metabolismo del hierro, transporte de glucosa y señalización de procesos tales como la apoptosis, invasión y metástasis.

Otros ejemplos de factores proangiogénicos son los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), prostaglandinas y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) [56].

Una estrategia ampliamente usada por las células tumorales para estimular el fenotipo proangiogénico es la regulación negativa de inhibidores endógenos de la angiogénesis tales como la trombospondina-1 (TSP-1), angiopoietina-2 (Ang-2) o el interferón- β (Tabla 1).

Existe otro mecanismo de regulación que involucra a las proteasas, las cuales pueden controlar la biodisponibilidad de activadores e inhibidores angiogénicos. Mientras que un amplio grupo de proteasas pueden liberar FGF almacenado en la MEC, por otro lado la plasmina, un agente proangiogénico del sistema de coagulación, puede ser clivado para dar lugar a un poderoso antiangiogénico denominado angiostatina [57].

Angiogénesis inducida por tumor

El crecimiento de una masa neoplásica requiere de manera imprescindible del establecimiento de un lecho vascular que le permita a las células tumorales nutrirse, tener acceso al oxígeno y por el que pueda llevarse a cabo la remoción de sus productos de desecho.

La hipoxia acontece rápidamente en el desarrollo de un foco tumoral debido a la alta tasa proliferativa de las células que lo componen. Bajo estas condiciones, los tumores pueden permanecer en estado latente meses e incluso años hasta que una subpoblación adquiere la capacidad de inducir angiogénesis. Ante el *switch* proangiogénico el tumor entonces es capaz de expandir su tamaño y obtiene también una ruta de escape para diseminarse a otros órganos. Mientras las células tumorales no sean capaces de inducir la formación de nuevos vasos, la masa tumoral no alcanzará un tamaño mayor a 1-1.5 mm de diámetro [58]. El switch

angiogénico puede ocurrir en diferentes etapas del desarrollo tumoral dependiendo del tipo tumoral que se trate y el ambiente que lo rodea. Algunas lesiones pre-malignas son capaces de inducir angiogénesis y este evento permite la progresión de la enfermedad.

Tabla 1. Algunos de los factores estimuladores o inhibitorios involucrados en la regulación del proceso angiogénico.

Factores angiogénicos	Factores antiangiogénicos
1-Butiril glicerol	2-metoxi-estradiol
FGF ácido	ADAMTS-1
FGF básico	Angiopoietina-2
Angiogenina	Angiostatina
Angiopoietina-1 (Ang1)	Antitrombina III
Colágeno	Calreticulina
Entactina	Canstatina
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	Inhibidor derivado de cartílago (CGI)
Efrinas	Endostatina
Fibronectina	Fragmento derivado de fibronectina
Factor estimulador de granulocitos (G-CSF)	Gro-b
Fibronectina	Heparinasas
Heparina/heparan sulfato	Gonadotrofina coriónica humana (hCG)
Factor de crecimiento hepatocitario (HGF)	Interferones α , β , γ
Interleuquina-8	Interleuquina -1, -4, -12
Laminina	Ligandos de PPAR γ
Leptina	Maspina
Prostaglandinas	TIMPs
Factor de crecimiento transformante (TGF)- α y $-\beta$	PEX
Factor de necrosis tumoral (TNF-a)	Dominio kringle 5 de plasminógeno
VEGF	Trombospondina-1 y-2

La vascularización que induce un tumor ocurre principalmente mediante el mecanismo de angiogénesis. Sin embargo, existen evidencias recientes que indican que algunos tumores son capaces de reclutar células precursoras endoteliales (EPC) desde la médula ósea en un proceso que emula al proceso vasculogénico, es decir la formación de primordios vasculares de *novο* [59]. Los factores involucrados en la estimulación de este proceso son el VEGF-A, el factor de crecimiento de placenta (PIGF), el factor derivado del estroma (SDF-1/CXCL12) y la angiopoietina-1 (Ang-1) [60]. El microambiente tumoral también posee un papel importante en la diferenciación del fenotipo vascular. Por otro lado, se ha demostrado recientemente que las células endoteliales *per se* pueden secretar ciertas quemoquinas que reclutan del lecho vascular a EPC para ser incorporadas a los nuevos vasos en crecimiento [59, 61].

El proceso neoangiogénico tumoral no difiere en las características generales del proceso fisiológico. Sin embargo, la fuente de los inductores angiogénicos y la sobreestimulación por parte del tumor y el microambiente tumoral dan como resultado una vasculatura poco organizada y disfuncional (se describirá más adelante). La inducción del factor de crecimiento VEGF-A por parte del tumor puede, por sí solo, iniciar el proceso angiogénico en una vasculatura quiescente. Este agente proangiogénico promueve la dilatación de los vasos e incrementa la permeabilidad permitiendo que las proteínas plasmáticas se filtren a través de los vasos y se depositen sirviendo de matriz provisoria para que las células endoteliales activadas puedan migrar. Este paso es acompañado por la pérdida del recubrimiento de los pericitos, proceso mediado por angiopoietina-2, un ligando de TIE-2. TIE-2 es un receptor del tipo tirosina quinasa que se expresa selectivamente en células endoteliales [62]. La membrana basal y la matriz extracelular deben ser

degradadas para permitir la migración de las células endoteliales. A medida que ésto ocurre las células endoteliales forman una columna de migración, proliferan y se produce la diferenciación endotelial, donde las células cambian su forma y se adhieren unas a otras formando el lumen tubular. La asociación de nuevos pericitos al vaso formado culmina con el proceso angiogénico en condiciones fisiológicas, ya que este evento reduce la dependencia de las células endoteliales al VEGF secretado por el organismo. Sin embargo, la pobre asociación de los pericitos en la angiogénesis tumoral puede explicar la continua estimulación del proceso.

Los tumores expresan varios factores pro-angiogénicos. Aunque el FGF fue el primero en ser descubierto, VEGF-A es el más ubicuo. La mayoría de los tumores también son capaces de secretar VEGF-C y VEGF-D, los cuales se unen al receptor VEGFR2 y activan vías estrechamente cercanas a VEGF-A.

Características de la vasculatura tumoral

Los vasos sanguíneos que induce el tumor, al igual que muchas de las características del propio del tumor, escapan a los mecanismos fisiológicos normales. De esta manera, la vasculatura tumoral posee una arquitectura distintiva y funcionalmente anómala (Figura 3). Poseen una estructura y diámetro irregular, generalmente dilatados, con una morfología tortuosa, con grietas y propensos a la hemorragia, ya que tienen paredes débiles y permeables. Por otro lado, su estructura irregular no siempre termina conectada a otro vaso y muchas veces no resultan funcionales [63].

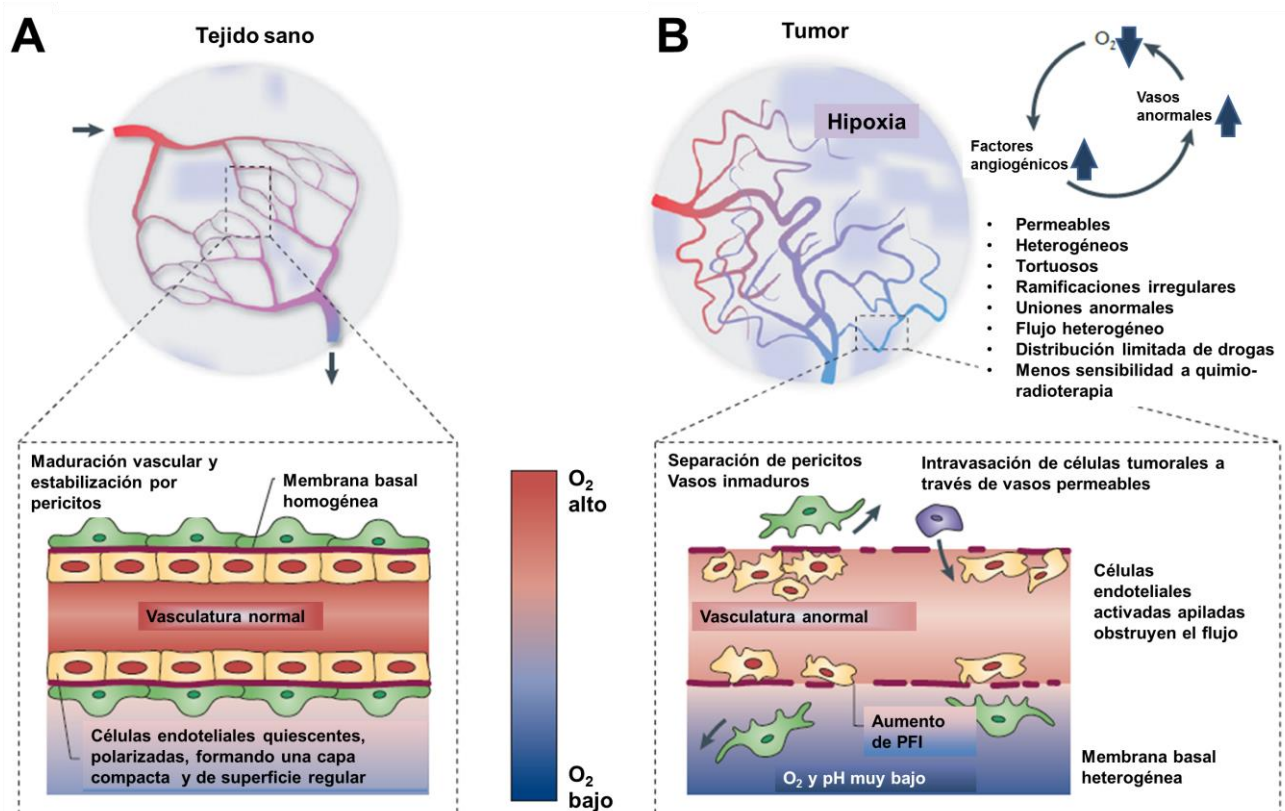


Figura 3. Características de la vasculatura tumoral. (A) la vasculatura asociada a tejidos sanos se forma siguiendo patrones ordenados y estables (panel superior), con paredes vasculares y endotelio normales (panel inferior), garantizando un suministro regular de nutrientes. (B) en contraste, en tumores establecidos, la vasculatura presenta anomalías, tanto estructurales como funcionales, favoreciendo la formación de regiones hipóxicas, que a su vez estimulan la secreción de factores angiogénicos y la formación de nuevos vasos disfuncionales. PFI; presión de fluido intersticial (Adaptado de Carmeliet & Jain, 2011).

Además, los vasos sanguíneos tumorales no se encuentran organizados en vénulas, arteriolas y capilares definidos como sucede en la vasculatura normal, sino que comparten características de todos los tipos. Esto se debe al constante estímulo de factores angiogénicos secretados por el tumor, induciendo un crecimiento sostenido de nuevos vasos. La expresión de antígenos de superficie en las células endoteliales generalmente resulta anormal. La asociación con las células de sostén es frecuentemente, más débil que lo normal, y el número de células de sostén presentes asociadas a las paredes vasculares también varía [64].

El flujo sanguíneo en los vasos tumorales es generalmente irregular como resultado de la estructura caótica, desplazándose más lentamente que lo normal y a veces en forma oscilante; ésto conduce frecuentemente a que los capilares sean disfuncionales [65]. Asimismo, los vasos sanguíneos tumorales sufren una constante remodelación y la permeabilidad vascular varía ampliamente en el interior del tumor. Estas redes vasculares fisiológicamente disfuncionales no aseguran un suministro regular de nutrientes. Además, el crecimiento rápido, una característica de los tumores malignos, también implica que el suministro de oxígeno y nutrientes puede escasear en los bordes menos vascularizados, ya que el tumor posee una demanda mucho mayor respecto del suministro provisto por la vasculatura. Tanto la vascularización anormal como el crecimiento tumoral generan áreas de hipoxia que, a su vez, estimulan una mayor formación de vasos.

Estas características estructurales y funcionales de la vasculatura incrementan la resistencia a tratamiento de los tumores ya que resultan en una distribución limitada de los fármacos y una menor sensibilidad a quimio- y radioterapia [63].

Proteasas involucradas en la regulación del proceso angiogénico

Para que puedan llevarse a cabo los distintos eventos que conducen a la angiogénesis, es necesaria la remodelación del tejido circundante. Esto pone de manifiesto el papel preponderante de las proteasas durante la formación del sistema vascular. Sin embargo, ésta no es la única ni la más importante acción del conjunto de proteasas intervinientes en estos complejos mecanismos. Ellas pueden contribuir al proceso de neovascularización mediante la activación, liberación y modificación de factores de crecimiento proangiogénicos. Por otro lado, las proteasas también pueden generar fragmentos que poseen propiedades antiangiogénicas debido al procesamiento de la MEC y de factores hemostáticos [22].

Todos estos productos de clivaje tienen efectos importantes sobre el delicado balance entre los factores que inducen la migración celular y los factores que mantienen a las células endoteliales en un estado de quiescencia y de mayor diferenciación. La fina regulación de la actividad de estas proteasas contribuye a la dirección del proceso angiogénico.

Las proteasas que intervienen en la neoangiogénesis pueden actuar de forma intracelular o extracelular. Las intracelulares están involucradas en la maduración y procesamiento proteico, regulación de factores de transcripción tales como el HIF-1, degradación vía proteosoma y también inducción de apoptosis, como es el caso de las caspasas. Por otro lado, las proteasas extracelulares están encargadas de la degradación de las proteínas de la matriz extracelular durante la progresión de la migración celular y la invasión. Además, la actividad proteolítica pericelular controla la

disponibilidad de factores de crecimiento proangiogénicos activos y diferentes citoquinas.

Existen tres grandes grupos de endoproteasas encargadas del procesamiento, remodelación y liberación de factores angiogénicos a partir de la MEC. Estos grupos están compuestos por cisteíno proteasas, MMPs y serino proteasas. Dado su relevancia en el presente trabajo, nos centraremos en los dos últimos grupos de endopeptidasas.

Las MMPs, también llamadas matrixinas, pertenecen a una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que tienen afinidad por componentes específicos de la matriz extracelular, y también intervienen en la activación de proteínas tales como otras MMPs y factores de crecimiento [22]. Las MMPs solubles son expresadas como proenzimas inactivas que solo se convierten a la forma activa una vez que se encuentran presentes en el ambiente extracelular. El uso de las MMPs como blancos moleculares para el tratamiento del cáncer fue una idea atractiva en el comienzo pero resultó poco efectivo debido a que las MMPs son indispensables para el desarrollo y el normal funcionamiento orgánico y por su multifuncionalidad. Dicha complejidad se manifestó en los primeros esfuerzos para inhibir las MMPs en el tratamiento de tumores, los cuales arrojaron resultados no satisfactorios.

Entre las serinoproteasas que pueden participar en el proceso angiogénico, los activadores de plasminógeno (PA) y la plasmina tienen un rol preponderante. Desde hace décadas el uPA y la plasmina han sido reconocidas como proteasas que están involucradas en la migración celular y la invasión. Tanto el uPA como el tPA pueden activar al plasminógeno en una enzima de amplio espectro como lo es la plasmina. Esta molécula de

plasmina actúa sobre otras moléculas del sistema fibrinolítico y sobre sí misma (acción autocatalítica), generando una molécula de menor tamaño denominada angiostatina. La molécula de angiostatina es un poderoso inhibidor de la angiogénesis fisiológica y tumoral [66].

Existe un modelo que explica a la angiogénesis como un proceso hemostático, regulado por un frágil equilibrio entre coagulación y fibrinólisis. Un leve desbalance generado por inhibición, pero también por sobreestimulación de la fibrinólisis podría prevenir la angiogénesis. En dicho modelo se propone que inclusive cuando el *switch* angiogénico está encendido, los factores de regulación negativa cumplen un rol clave limitando la proteólisis en exceso, afirmando que factores pro-angiogénicos ampliamente aceptados como tPA, uPA y plasmina pueden desempeñar un rol inverso al administrarse en dosis altas. Esto significa que moléculas que estimulan o generan una proteólisis excesiva en el tumor podrían convertirse en poderosos agentes antiangiogénicos y antitumorales [67].

El factor antiangiogénico angiostatina

Numerosos son los ensayos preclínicos que buscan encontrar en los antiangiogénicos endógenos el éxito en la terapia dirigida contra la angiogénesis tumoral [68]. La razón por la cual es muy atractivo el uso de agentes inhibidores de la angiogénesis de tipo endógeno es su baja toxicidad y la ausencia de respuesta inmunogénica. La ausencia de efectos colaterales o tóxicos es debido a que ejercen su acción específicamente sobre la vasculatura en activa proliferación y no en los vasos quiescentes. Las moléculas más conocidas de estos tipos de inhibidores, son la endostatina y la angiostatina.

Como se mencionó previamente, la angiostatina es liberada de su molécula parental, el plasminógeno, mediante la acción de los activadores de plasminógeno y ciertas metaloproteasas como MMP-7, MMP-9 y MMP-12 [69]. Dicha molécula puede contener varios miembros de los cinco dominios característicos de la molécula de plasminógeno denominados dominios *kringle* (K1 a 5), dependiendo del sitio exacto de proteólisis.

La angiostatina actúa sobre la proliferación, reorganización del citoesqueleto y migración de células endoteliales. Su mecanismo de acción involucra la unión directa con la enzima ATP sintasa presente en las mitocondrias y la superficie celular del endotelio induciendo un descenso abrupto del pH intracelular conduciendo a la apoptosis [56].

Hasta el momento, se han descrito varios receptores específicos para angiostatina que son expresados en la superficie endotelial. El primero identificado fue la adenosina trifosfato sintasa (ATP sintasa) [70]. Existen otros posibles candidatos para el reconocimiento de la molécula de angiostatina, como la angiomotina [71], la anexina II y el receptor del factor de crecimiento hepatocitario HGFR, pero el rol biológico que cumplen es aún un tema de debate [72].

Aparentemente el efecto directo de la angiostatina no se limita a células endoteliales. Fue reportado que tras la internalización de la angiostatina en células tumorales, ésta era capaz de unirse al menos a dos proteínas dentro de la mitocondria; malato deshidrogenasa (un miembro del ciclo de Krebs) y la ATP sintasa. Distintos ensayos *in vitro* e *in vivo* mostraron que tumores tratados con angiostatina, al igual que su vasculatura asociada, desplegaban niveles disminuídos de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y la proteína c-Myc y un aumento considerable en la

proteína antiangiogénica thrombospondina-1. Además se observó una reducción en el reclutamiento e infiltración de macrófagos derivados de médula ósea [73].

Hasta aquí se han discutido distintas características y eventos claves en la biología tumoral que se hacen presentes en la gran mayoría de cánceres sólidos. Sin embargo, el presente trabajo se centró en evaluar la actividad antitumoral de distintos análogos peptídicos de vasopresina (descritos en detalle más adelante) y su potencial aplicación, particularmente en el manejo del cáncer mamario. Para ello se utilizaron distintos modelos experimentales preclínicos de carcinomas mamaros, tanto murinos como humanos, cada uno con características fenotípicas particulares. A continuación se describen distintas características relevantes y específicas del cáncer mamario.

Cáncer mamario

El cáncer de mama es uno de los tipos de cáncer más comunes con más de 1,300,000 casos y 450,000 muertes anuales a nivel mundial. Con más de 5,400 muertes por año en Argentina, es la primera causa de muerte por tumores en mujeres, y es el cáncer de mayor incidencia con una tasa de 74 casos por cada 100,000 mujeres. Luego de Uruguay, es el país de América con la tasa de mortalidad más alta por cáncer de mama (con 20.1 y 24.3 defunciones cada 100,000 mujeres respectivamente) [74].

Las neoplasias mamarias constituyen una patología clínicamente heterogénea, ya que existen diferentes subtipos que presentan diferentes perfiles moleculares, histopatológicos, comportamientos biológicos, perfiles de riesgo y pronóstico [75].

Clasificación molecular del cáncer mamario

Clínicamente, esta enfermedad se categoriza en tres tipos básicos diferentes utilizando técnicas de inmunohistoquímica (IHQ), dependiendo de la expresión de ciertos receptores [76]. En el primer tipo se agrupan todos aquellos subtipos que expresan el receptor de estrógeno (ER+) y progesterona (PR+). En este grupo se encuentran el 70-80% de los casos de cáncer mamario. Particularmente el ER pertenece a la familia de receptores nucleares de hormonas, y es activado por la hormona estrógeno o 17 β -estradiol. Una vez activado es traslocado al núcleo en donde despliega su actividad como activador transcripcional de distintos genes tras unirse al DNA. También está reportado que despliega funciones adicionales a su actividad mediada por la unión a DNA. ER puede asociarse a la proteína de membrana caveolina-1 y formar complejos con proteína G y distintos receptores tipo tirosina quinasa tales como el EGFR y el receptor de factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1). A través de estos receptores, el ER puede señalizar al núcleo por medio de las vías de las proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPK) y fosfoinositol 3-quinasa (PI3K/Akt). En líneas generales, la activación de ER con estrógeno estimula la proliferación de células mamarias, resultando en división celular y replicación del DNA. El tipo tumoral ER+ se caracteriza por un fenotipo menos agresivo, menor expresión de marcadores proliferativos, buena respuesta a quimioterapia y alteraciones genéticas leves en comparación a la enfermedad hormono-independiente ER-. Estos tumores suelen tener aberraciones genéticas substanciales en comparación a tumores hormono-dependientes ER+/PR+, tales como mutaciones en p53, alta inestabilidad genómica y genes supresores de tumor BRCA1 y 2 disfuncionales [77].

En el segundo grupo se hallan los tumores que presentan una amplificación del gen *her2/erbB2* y sobre-expresan HER-2/neu en la membrana plasmática de las células tumorales. Este grupo representa el 20-30% de los pacientes de cáncer mamario. El HER-2/neu es una glicoproteína de 185 kDa con actividad tirosina quinasa en su cara citosólica, que actúa como receptor del factor de crecimiento de tipo epidérmico humano. La señalización tras su estimulación promueve la proliferación celular e inhibe la apoptosis vía MAPK, fosfolipasa C, proteína quinasa C (PKC), PI3K/Akt y el transductor de señal y activador de la transcripción (STAT). Tiene la capacidad de formar heterodímeros con el resto de los receptores de la familia HER. Dicha dimerización resulta en la autofosforilación de sus residuos tirosina en la cara citoplasmática, y en la iniciación de diversas cascadas de señalización. Los pacientes que sobre-expresan este oncogen generalmente presentan tumores altamente proliferativos y agresivos, con resistencia a terapias convencionales. Sin embargo poseen una buena tasa de respuesta a terapia dirigida basada en anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular de unión a ligando y el dominio de heterodimerización.

El 10-20% restante de los tumores mamarios se clasifican en el tercer grupo denominado cáncer de mama triple negativo (CMTN) el cual se caracteriza por no expresar el receptor de estrógeno, ni el de progesterona ni el receptor HER-2/neu [78]. El CMTN es un subtipo histológico altamente agresivo con opciones de tratamiento limitadas y un mal pronóstico. Para la mayoría de los pacientes que presentan enfermedad residual luego del tratamiento neoadyuvante, existe un riesgo alto de recaída con un pico de eventos metastásicos luego de 1 año. En un estudio reciente que incluía 284 pacientes la sobrevida media luego de la recaída metastásica en CMTN

fue de 1 año, comparada con 2.3 años para otros tipos de cáncer mamario [79].

Con el desarrollo de tecnologías de microarreglos basadas en marcadores genómicos, se lograron clasificar con mayor exactitud los diferentes subtipos de cáncer mamario en 4 grupos: carcinoma mamario de tipo luminal A, de tipo luminal B, de tipo Basal y de tipo HER-2/neu. Los tumores caracterizados por una baja expresión de claudina fueron originalmente agrupados dentro del tipo Basal debido a la ausencia de ER, PR y HER-2/neu y a su mal pronóstico. Sin embargo, estos tumores presentan características únicas tales como baja expresión de claudina-3, claudina-4, del marcador de proliferación Ki-67, expresión de marcadores vinculados a células *stem* cancerosas (CSC) mamarias y un enriquecimiento de proteínas asociadas a la EMT (Tabla 2) [80, 81]. Esta nueva clasificación promete ofrecer mejores diagnósticos y diseñar terapias más específicas en búsqueda de estrategias terapéuticas más efectivas y evitar la quimioterapia adyuvante en aquellos casos en los que no es necesaria.

Si bien estas características histopatológicas y/o genómicas permiten realizar un diagnóstico y diseñar una estrategia terapéutica, la causa de muerte de estas pacientes no es el tumor primario sino las metástasis en sitios distantes. Los sitios metastásicos más frecuentes para tumores primarios mamarios son hueso, pulmón e hígado. Aproximadamente 10-15% de los pacientes con cáncer de mama desarrollan metástasis dentro de los primeros 3 años de la detección inicial de tumor primario. Aunque existen casos en los que la manifestación de metástasis se da hasta 10 años posteriores al primer diagnóstico [52].

Tabla 2. Clasificación molecular de carcinoma mamario.

<i>Clasificación</i>	<i>Perfil IHQ</i>	<i>Otras características</i>
Luminal A	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER-2/neu ⁻	Ki67 bajo, buena respuesta a terapia endócrina y a quimioterapia.
Luminal B	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER-2/neu ⁺	Ki67 alto, usualmente buena respuesta a terapia endócrina, variable con respecto a la quimioterapia, HER-2/neu ⁺ respondedores a trastuzumab (detallado más adelante).
Basal	ER ⁻ , PR ⁻ , HER-2/neu ⁻	EGFR ⁺ y citoqueratina5/6 ⁺ , Ki67 alto, no responde a terapia endócrina, usualmente buena respuesta a quimioterapia.
Baja expresión de claudina	ER ⁻ , PR ⁻ , HER-2/neu ⁻	Baja expresión de Ki67, claudina-3, claudinina-4 y claudinina-7. Respuesta intermedia a quimioterapia.
HER-2/neu	ER ⁻ , PR ⁻ , HER-2/neu ⁺	Ki67 alto, buena respuesta a trastuzumab y a quimioterapia.

Alternativas terapéuticas en cáncer mamario

Los avances en el estudio de las bases moleculares y de los trastornos fisiológicos que caracterizan a las células tumorales, han impulsado una nueva tendencia en el tratamiento de pacientes con patologías neoplásicas. Previo a los vastos conocimientos de biología molecular el principal objetivo de la terapia contra el cáncer era erradicar todas las células malignas del cuerpo del paciente. El nuevo paradigma en la actualidad es tratar al cáncer residual como una enfermedad crónica,

alterando rutas metabólicas específicas con la esperanza de arrestar o revertir el crecimiento tumoral.

La mayoría de las drogas antitumorales tradicionales interfieren con la mitosis, síntesis de ADN y sistemas de reparación. Su eficacia es tan contundente como su toxicidad asociada. Una nueva clase de agentes inducen retardo en el crecimiento tumoral y apoptosis al centrar su accionar en receptores de membrana tipo quinasa, quinasas de señalización intracelular, anomalías epigenéticas, vasculatura tumoral y microambiente [82].

Particularmente para el carcinoma mamario, el abordaje terapéutico incluye cirugía, radioterapia y terapia adyuvante. La terapia elegida está basada en la determinación de la expresión de receptores por inmunohistoquímica [78]. Existen tres tipos de terapias sistémicas para el cáncer de mama: terapia hormonal, quimioterapia y terapia dirigida.

Terapias sistémicas

La terapia de tipo hormonal tiene como objetivo explotar la presencia de los receptores de estrógeno y/o progesterona en los tumores, permitiendo la utilización del antagonista estrogénico tamoxifeno y de los inhibidores de aromatasa que bloquean la síntesis de estrógeno. Los agentes antihormonales concomitantes con quimioterapia son la estrategia terapéutica más utilizada para tumores mamarios ER y PR positivos.

Actualmente se utiliza quimioterapia como neoadyuvante, adyuvante y en escenarios metastásicos [83]. La quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas (por ej. doxorubicina) se convirtió en la más utilizada desde

los años 1990s. A estos agentes se los combina con ciclofosfamida, 5-fluorouracilo y taxanos.

Los taxanos son agentes antimicrotubulares que interfieren con la dinámica del citoesqueleto celular. Dentro del grupo de los taxanos se encuentra el paclitaxel. Este citotóxico promueve el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabiliza la estructura microtubular al prevenir la despolimerización. Esta estabilidad resulta en la inhibición de la reorganización normal de la red de microtúbulos, proceso clave que permite la interfase y la mitosis celular. Además, el paclitaxel genera arreglos anormales de microtúbulos durante el ciclo celular, y favorece la formación de múltiples fibras de áster en la mitosis, finalmente induciendo arresto del ciclo y apoptosis.

La administración de quimioterapia no sólo afecta a las células cancerosas que se dividen rápidamente, sino que también afecta a algunas de las células normales del cuerpo, particularmente las células normales que poseen una tasa replicativa alta, como las del cabello, los ovarios, las paredes de la boca, las paredes del tracto intestinal y las células sanguíneas (leucocitos, hematíes y plaquetas).

Con respecto a las terapias dirigidas, se destaca la utilización del anticuerpo monoclonal anti-HER-2/neu trastuzumab (Herceptin®, Roche) para aquellos tumores mamarios que presentan la amplificación en este gen. Recientemente fue incorporado al arsenal de tratamientos del cáncer mamario metastásico HER-2/neu positivo, otro anticuerpo monoclonal denominado pertuzumab (Perteja®, Roche). Dicho anticuerpo inhibe la dimerización de HER-2/neu con otros receptores de la familia HER. La combinación de pertuzumab con trastuzumab y el taxano docetaxel

prolongó significativamente la sobrevida libre de enfermedad en comparación con terapia basada en trastuzumab y docetaxel [84].

Además fue aprobado como tratamiento de primera línea la combinación del anticuerpo monoclonal anti-VEGF bevacizumab (Avastin®, Genentech/Roche) con paclitaxel en pacientes con cáncer mamario metastásico HER-2/neu negativos. Los inhibidores de tirosina quinasa también fueron aprobados para el tratamiento de cáncer mamario. Un ejemplo de ellos es el inhibidor lapatinib (Tykerb®, GlaxoSmithKline), que es inhibidor de HER-1 y HER-2/neu [83].

A pesar del reciente desarrollo de estrategias terapéuticas muy eficaces para el cáncer mamario, los tumores triple negativos siguen siendo difíciles de tratar ya que se trata de una enfermedad biológicamente agresiva con pocas opciones terapéuticas. Todavía no se ha encontrado ninguna terapia molecular dirigida con efectos contundentes sobre la progresión de la enfermedad triple negativa. En los últimos años se han testado distintas pequeñas moléculas inhibidores y anticuerpos monoclonales contra la vía de VEGF, varios receptores con actividad tirosina quinasa, incluyendo EGFR, y la poli ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP-1). Si bien algunos ensayos clínicos mostraron resultados prometedores, en líneas generales los hallazgos han sido mayoritariamente decepcionantes [79]. Actualmente la quimioterapia es la única herramienta disponible, aunque las respuestas siguen siendo limitadas [85].

Cirugía y el período perioperatorio como una oportunidad terapéutica

Como se mencionó previamente, el tratamiento del cáncer mamario es multidisciplinario y puede incluir cirugía, radiación y terapia sistémica. La extirpación de la masa tumoral mediante cirugía ha sido la principal modalidad de tratamiento para cánceres sólidos, incluido el mamario. Sin embargo muchos cánceres de origen epitelial tienen asociado un mal pronóstico luego de la extirpación de los tumores, incluso en estadíos tempranos. La progresión tumoral en estos casos se atribuye a la persistencia de células neoplásicas ocultas en distintos tejidos como un signo de la enfermedad mínima residual (EMR). Si bien se sabe que la angiogénesis, la inmunovigilancia y distintos componentes microambientales, incluyendo la MEC, citoquinas y factores de crecimiento poseen un rol relevante en la quiescencia celular, los mecanismos que rigen la transición del estado inactivo hacia un estado activo de los residuos micrometastásicos no están completamente descifrados [86].

Según lo reportado en bibliografía, la remoción del tumor alteraría el crecimiento de la EMR, desencadenando el crecimiento tumoral perioperatorio. Los mecanismos por los cuales la cirugía podría promover la progresión tumoral y empeorar el pronóstico de los pacientes incluyen: siembra directa de células tumorales en el sitio de la intervención quirúrgica, estimulación de tumores subclínicos mediante inflamación postquirúrgica y crecimiento metastásico acelerado por pérdida de factores inhibitorios derivados del tumor primario [87].

Efectores antiangiogénicos secretados por el tumor primario tienen la capacidad de mantener a los focos metastásicos distantes en estados de quiescencia e inactividad. Distintos ensayos preclínicos demostraron que la

excisión de la masa tumoral primaria reactiva el crecimiento de las metástasis [88]. Adicionalmente, el proceso inflamatorio asociado a cirugía comparte mediadores también involucrados en el crecimiento tumoral y la invasión. Como se describió previamente, distintas células del microambiente tumoral incluyendo fibroblastos y macrófagos, así como también diversos factores humorales de la inflamación, tales como VEGF y MMP-9, promueven la progresión cancerosa [89]. El trauma quirúrgico y los procesos de cicatrización que lo acompañan, inducen la producción y liberación de mediadores inflamatorios y diversos factores angiogénicos [90]. Se han encontrado altas concentraciones de factores proangiogénicos en muestras de fluido de heridas quirúrgicas en pacientes de cáncer mamario, sugiriendo la necesidad de antagonizar ese tipo de respuesta protumoral por medio de terapia local o sistémica [91]. Paralelamente, la cirugía puede inducir inmunosupresión favoreciendo el crecimiento y la diseminación de células cancerosas. La supresión de la actividad de los linfocitos citotóxicos *natural killer* (NK) en un escenario postoperatorio correlaciona con el aumento en el número de metástasis en modelos animales de diseminación experimental y espontánea. Tai *et al.* recientemente reportaron que la administración de inmunoterapia en la ventana preoperatoria inmediata lograba reducir drásticamente la diseminación metastásica postcirugía en modelos animales de cáncer mamario [92].

Coffey *et al.* propusieron un paradigma terapéutico novedoso, en donde el período perioperatorio representa una oportunidad única y pasajera en la cual el paciente puede ser protegido de los efectos oncológicos de la remoción del tumor [93]. Si bien la remoción quirúrgica de tumor ofrece grandes chances de una sobrevida libre de enfermedad a largo

plazo a pacientes con tumores sólidos, paradójicamente también puede contribuir al desarrollo de recurrencias locales y metástasis distantes. La manipulación quirúrgica provoca la liberación de células tumorales viables. La presencia de células malignas en sangre periférica fue confirmada en pacientes sometidos a cirugía de cáncer mamario [94]. De manera similar, la quimioterapia convencional, puede tener un efecto movilizador sobre células cancerosas mamarias [95].

Un tratamiento perioperatorio podría ofrecer la oportunidad de modular el microambiente inflamatorio temprano y reducir las tasas de recurrencia locorregional. Adicionalmente, favorecer la hemostasia luego de la manipulación quirúrgica podría contribuir a una rápida encapsulación del tejido tumoral residual, limitando la intravasación de las células tumorales. En este sentido agentes hemostáticos como la aprotinina [96] y el ácido tranexámico (AT) [97] han sido usados extensamente en la clínica en contextos quirúrgicos. La infusión intraoperatoria del agente aprotinina, un inhibidor no específico de proteasas, se asoció a un beneficio en materia de sobrevida en pacientes de cáncer colorectal sometidos a resección hepática por metástasis [96]. Por otro lado, el AT es un inhibidor de la fibrinólisis utilizado con muy buena tolerancia en el manejo de distintos desórdenes de la coagulación. El AT inhibe la formación de plasmina a partir del plasminógeno, al bloquear su sitio de unión con fibrina. A altas concentraciones resulta ser un inhibidor no competitivo de la plasmina [98]. La administración de AT es una práctica segura en la remoción quirúrgica de tumores en pacientes con cáncer [99]. Particularmente en pacientes de cáncer mamario, el uso perioperatorio y postoperatorio de AT reduce la frecuencia de complicaciones asociadas a cirugía en procedimientos de

lumpectomía (extirpación de la masa tumoral y parte del tejido normal circundante) y mastectomía (extirpación de mama completa) [97].

Uso de anticoagulantes en cáncer mamario

Como se describió previamente, la agregación de células tumorales en circulación en aglomerados multicelulares favorece su supervivencia durante el tránsito hemático o linfático, haciéndolas más resistentes a las agresiones mecánicas e inmunológicas del hospedador. El potencial metastásico de dichas células es también aumentado por la formación de un escudo de fibrina alrededor del agregado celular que lo protege de distintos agentes del sistema inmune y previene aún más la destrucción por daño mecánico durante su paso por la circulación. Esto está causado por la producción y secreción a la circulación sanguínea de distintos factores procoagulatorios por parte de las células malignas. Como resultado adicional, el paciente presenta un cuadro sistémico hipercoagulable o protrombótico, con múltiples complicaciones asociadas.

La trombosis venosa y la embolización pulmonar son las dos complicaciones tromboembólicas más comunes en cáncer y son responsables de un gran número de muertes prematuras y casos de morbilidad. Fennerty reportó que pacientes oncológicos presentan un riesgo de enfermedad tromboembólica venosa (ETV) entre 4 a 5 veces mayor que pacientes sanos. Algunos tipos tumorales presentan un mayor riesgo de ETV que otros. Por ejemplo, las neoplasias hematológicas se asocian a un aumento de 28 veces el riesgo de ETV. Si bien estos datos difieren levemente entre distintos estudios, los tumores ováricos, pancreáticos, cerebrales y hematológicos se encuentran entre los tipos de cáncer con

mayor riesgo. A pesar de que estos tumores tienen mayor probabilidad de ser asociados a ETV, tumores como los mamarios o pulmonares, debido a su alta incidencia, son responsables de la mayoría de episodios de ETV en términos absolutos. Otros factores como la cirugía, la administración de quimioterapia, la edad y la obesidad de los pacientes oncológicos también impactan en la incidencia de ETV. De hecho, la incidencia de trombosis de vena profunda en pacientes oncológicos que no reciben tratamiento profiláctico para ETV durante la cirugía es del 30%. Tratamiento con heparinas de bajo peso molecular como la enoxaparina logran reducir drásticamente la incidencia de EVT, y es usada de rutina para pacientes sometidos a cirugía oncológica [100].

Debido al papel que posee la coagulación en el desarrollo y progresión del cáncer, así como también los efectos secundarios ocasionados por la tendencia a la coagulación de los pacientes oncológicos, se ha investigado profundamente la inhibición de la coagulación como estrategia antitumoral mediante el uso de anticoagulantes tales como los antagonistas de vitamina K y heparina, entre otros [101].

Análogos de vasopresina y sus receptores

Como se explicó previamente, para alcanzar un órgano distante y desarrollar un nuevo foco tumoral, las células neoplásicas deben escapar del tumor primario, intravasarse, diseminarse a través del sistema arterial o linfático, adherirse al endotelio del órgano blanco y extravasarse, para finalmente organizarse y crecer como un nuevo foco metastásico [102]. Este proceso secuencial de invasión y metástasis se ve favorecido por la neovascularización o angiogénesis, la que, además de nutrir y permitir el crecimiento de la masa tumoral, representa una ruta de escape para las células cancerosas con potencial metastásico.

A pesar de que la invasión tumoral y metástasis, determinan la agresividad biológica y la progresión de la enfermedad, gran mayoría de los tratamientos adyuvantes convencionales no centran su acción sobre la angiogénesis tumoral ni la diseminación metastásica. Compuestos con la capacidad de modular la homeostasis, particularmente la fibrinólisis, y el perfil proteolítico celular podrían interferir con el proceso angiogénico y la diseminación de células tumorales vía hemática.

Es por esto que ya hace algunos años la vasopresina y su análogo desmopresina (ver a continuación) han sido motivo de estudios relacionados al cáncer. Su administración induce, entre otros fenómenos, una rápida liberación sistémica de factores hemostáticos y profibrinolíticos, y un aumento en la síntesis de óxido nítrico en el endotelio vascular. A continuación se presenta una breve reseña sobre estos compuestos y su uso en investigación oncológica.

La hormona arginina vasopresina

Las hormonas peptídicas de la neurohipófisis son movilizadas desde el hipotálamo hacia la hipófisis por unas proteínas transportadoras denominadas neurofisinas, y están involucradas en una amplia gama de efectos biológicos. Las dos hormonas que son sintetizadas por la neurohipófisis son la oxitocina y la vasopresina. Dichas hormonas neurohipofisiarias son liberadas de gránulos de almacenamiento mediante un mecanismo de exocitosis mediado por la activación de la ATPasa neuronal dependiente de Ca^{++} -calmodulina. Consecuentemente el contenido de los gránulos es descargado a los vasos sanguíneos que se encuentran próximos a las terminales nerviosas [103]. La oxitocina induce la contracción del útero y la eyección de leche, mientras que la vasopresina se encarga principalmente de mantener el balance hidrosalino en el organismo, causando un efecto antidiurético e incrementando la presión arterial [104]. Despliega también otras acciones, incluyendo la contracción del intestino, la glucogenólisis hepática, la agregación plaquetaria, la liberación del factor VIII de la coagulación, del factor de von Willebrand (FVW) y del tPA. No obstante, estos últimos efectos tienen mayormente un interés farmacológico, ya que se presentan en concentraciones de vasopresina 50 a 1,000 veces superiores respecto de las que se encuentran normalmente en el plasma [105]. La secuencia peptídica de la vasopresina incluye 9 aminoácidos, presentando un puente disulfuro entre los aminoácidos de las posiciones 1 y 6. Su estructura se encuentra muy conservada, puesto que es idéntica en casi todos los mamíferos [106].

Receptores de vasopresina V1r, V2r y V3r

La vasopresina ejerce sus efectos biológicos a través de los distintos receptores de vasopresina presentes en el organismo. La familia de receptores de vasopresina incluyen el receptor de vasopresina tipo 1 (AVPR1 o V1r), el de tipo 2 (AVPR2 o V2r) y el de tipo 3 (AVPR3 o V3r, también referido en la bibliografía como V1b). El receptor V1r, al cual se le atribuye un rol preponderante en la regulación de la presión arterial, se encuentra en diversos tejidos del organismo incluyendo vasculatura, corazón, hígado, riñones, cerebro y plaquetas. El receptor V3r es principalmente específico de células corticotrópicas de la glándula anterior pituitaria, y está asociado a los efectos sobre el comportamiento social y la respuesta al *stress*. Finalmente el V2r se expresa en túbulos colectores renales y endotelio vascular, mediando los efectos antidiuréticos y hemostáticos.

Los receptores de vasopresina son proteínas de membrana plasmática cuyos tamaños varían entre 371 y 424 aminoácidos, comprendiendo 7 hélices transmembranas unidas por 3 bucles intracelulares y 3 bucles extracelulares. Dentro de una misma especie los tres tipos de variantes presentan una homología de secuencia del 45%. Además, estas isoformas son conservadas entre especies, alcanzando un 90% de homología para un subtipo en particular. Los receptores de vasopresina pertenecen a la familia 1b de los receptores acoplados a proteína G (GPCR) [107]. Los miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de un puente disulfuro entre el primer y segundo bucle extracelular, y una arginina conservada en la secuencia Arg-Asp-Tyr localizada en el segundo bucle intracelular.

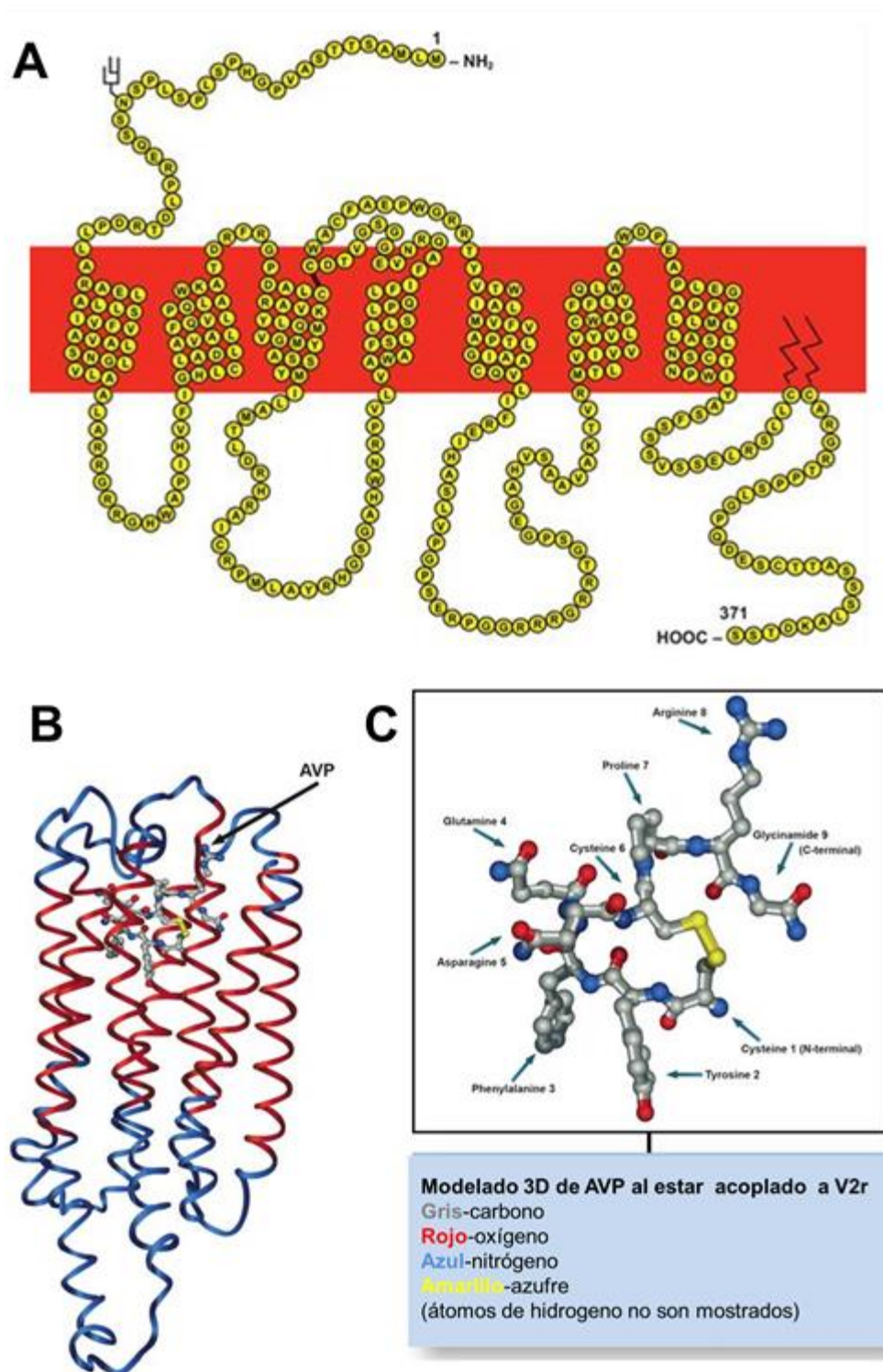


Figura 4. Representación esquemática y modelado tridimensional del V2r, miembro de la familia de receptores de vasopresina. (A) composición aminoacídica del V2r (utilizando el código de una letra) y su organización topográfica con respecto a la membrana plasmática (franja roja). En el diagrama se indican sus extremos N-terminal (Met1) y C-terminal (Ser371), una glicosilación única en Asn22, los 7 dominios transmembrana, el característico puente disulfuro entre el primer y segundo bucle extracelular, y el anclaje a la cara interna de la membrana plasmática en las Cys341 y Cys 342 por medio de las cadenas alifáticas de dos ácidos palmíticos. (B) modelado tridimensional del complejo formado por V2r y la AVP acoplada al posible sitio activo. (C) modelado tridimensional de la AVP (Adaptado de Juul *et al.*, 2014).

El sitio de unión a la hormona involucra a la parte superior de las hélices transmembrana, los bucles extracelulares y la región N-terminal de los receptores (Figura 4) [104].

La principal diferencia entre estos receptores es el mecanismo de acople entre su activación y las rutas de señalización activadas río abajo; activación de la adenilato ciclasa (AC) para V2r y fosfolipasa C para V1r y V3r. Para desencadenar dichas respuestas, regiones intracelulares de los receptores se acoplan de manera selectiva a distintos tipos de subunidades de la proteína Gα. Mientras que para el V1r el segundo bucle intracelular es el responsable del acople con la proteína Gαq/11, en el V2r es el tercer bucle intracelular el involucrado en acoplarse con, en el caso de este receptor, a la Gαs. Cuando los GPCR como el V1r están acoplados a la proteína Gαq/11 y son estimulados, activan a la fosfolipasa C-β (PLC-β) la cual cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP-2) dando como resultado dos mensajeros secundarios; el inositol trifosfato (IP3) y el diacilglicerol (DAG). El primero induce la liberación de Ca⁺⁺ al unirse a los canales de calcio presente en el retículo endoplásmico, y el DAG, en presencia de Ca⁺⁺, activa de manera directa a la PKC [108].

Debido a que este trabajo se basa en el estudio de agonistas selectivos del receptor V2r, a continuación se profundizan distintos aspectos

del receptor, con particular interés en las vías de señalización asociadas a su activación.

Receptor de vasopresina V2r y vías de señalización asociadas

Como se mencionó previamente el V2r es un GPCR, de 371 aminoácidos, presentando 7 dominios transmembrana y cuyo tercer bucle intracelular está acoplado a la subunidad G α s [104]. La estimulación del V2r mediante ligandos agonistas eleva los niveles de AMPc intracelular tras la activación de la enzima adenilato ciclasa por medio de la subunidad G α s.

Ruta de señalización AC/AMPc/PKA

Existen al menos 9 isoformas de la AC íntimamente relacionadas entre sí, y cada variante consiste en dos dominios hidrofóbicos y dos dominios citoplasmáticos, resultando en una enzima pseudo-simétrica [109]. Además de responder a G α s y a forskolina, la AC puede responder a señales provenientes de otras subunidades de la proteína G, y distintas quinasas tales como la PKC o la proteína quinasa dependiente de AMPc (proteína quinasa A o PKA), entre otras. El AMPc producido por la AC es degradado por fosfodiesterasas (PDE). Estas enzimas son metalofosfohidrolasas que catalizan la hidrólisis de nucleótidos cíclicos hacia sus formas inactivas y no-cíclicas. Si bien el mecanismo de hidrólisis por PDEs es el principal mecanismo responsable de atenuar la señalización vía AMPc, se han reportado otros sistemas de control. Dos miembros de la familia transportadora ABC (*cassette* de unión a ATP), las proteínas de resistencia a multidrogas 4 y 5 (MRP-4 y MRP-5) han demostrado tener la

capacidad de exportar AMPc y regularizar los niveles intracelulares del mensajero, por medio de mecanismos dependientes de energía [110].

En la mayoría de los casos, los efectos fisiológicos del AMPc son mediados por eventos de fosforilación en diversas proteínas blanco catalizados por la PKA. Dicha enzima se compone de dos subunidades regulatorias que inhiben la actividad de dos subunidades catalíticas unidas. La unión de una molécula de AMPc a cada subunidad regulatoria induce la liberación de las subunidades catalíticas permitiendo fosforilar los residuos tirosina o treonina de sus proteínas blanco, así modulando su actividad. La PKA activada puede migrar a núcleo y fosforilar la proteína regulatoria de respuesta a AMPc cíclico CREB (debido a su nombre en inglés *cAMP response element binding protein*). CREB, luego de reclutar a su coactivador CBP, induce la expresión de múltiples genes blanco regulando eventos que incluyen procesos metabólicos, de señalización, proliferación, diferenciación y supervivencia [108]. La activación de CREB no es PKA-específica. Su fosforilación en el residuo serina 133 responsable de su activación, puede estar mediada además por la interacción con múltiples quinasas, incluyendo Akt, la quinasa S6 ribosomal pp90 (p90Rsk) y quinasas dependientes de Ca^{++} -calmodulina [110].

Otros efectores de AMPc

Debe enfatizarse que no todos los efectos del AMPc son mediados vía PKA. El segundo mensajero también puede unirse a los factores de intercambio Epac1 y 2 (también conocidos como cAMP-GEF-I y II) o estimular de manera directa distintos canales iónicos.

Los Epac están involucradas en el control y regulación de distintos efectores, incluyendo a las pequeñas GTPasas de la familia Ras, modulando distintos procesos celulares claves como transporte de iones, proliferación celular y diferenciación, supervivencia y apoptosis, integridad cromosomal, transcripción génica, entre otros. Adicionalmente, el esquema lineal tradicional de la fosforilización mediada por AMPc, se tornó más complejo debido al descubrimiento de proteínas de andamiaje tales como las AKAPs, conocidas también como proteínas de anclaje de la quinasa A. Las AKAPs pueden unirse a las subunidades regulatorias de la PKA y así secuestrarla en compartimientos celulares específicos, sin perder la capacidad de interactuar con otras moléculas de la señalización. Por ejemplo, la AKAP79 interactúa al mismo tiempo con PKA, PKC y la fosfatasa dependiente de calcio PP2B en regiones celulares cercanas a la membrana plasmática. Se asume que las distintas AKAPs regulan la señalización mediada por AMPc a un nivel espacio-temporal [108, 111].

Otros receptores intracelulares de AMPc incluyen canales iónicos tales como los canales regulados por nucleótidos cíclicos (CNG) y los regulados por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización (HCN). Los HCN son responsables de mediar el ritmo cardíaco, y son regulados por la unión a AMPc la cual altera el potencial de membrana induciendo la apertura de los canales. Por otro lado, los canales CNG son mediadores importantes del olfato, y a pesar de también estar regulados por la unión a AMPc su funcionamiento es independiente al potencial de membrana.

A grandes rasgos, el efecto celular dado por AMPc depende principalmente de los receptores activados, y esto está ligado al tipo celular y/o a la localización subcelular de la señal [108].

Desensibilización del receptor V2r

El número de receptores en la pared celular se mantiene relativamente constante debido a la combinación de síntesis de nuevos receptores, degradación proteolítica, internalización constitutiva (sin estimulación por ligando) y reciclado a la membrana. Sin embargo la unión del V2r con su ligando generalmente está asociada a una desensibilización del receptor, limitando la respuesta a posteriores desafíos hormonales. Dicha desensibilización o pérdida de efecto biológico del receptor estaría asociada, al menos en gran parte, a una internalización del V2r vía clatrina mediada por la unión con arrestinas luego de la estimulación con el ligando. El patrón de reciclado y recirculación del V2r hacia la membrana celular es extremadamente lento, y posiblemente esté asociado a que una fracción considerable de los receptores internalizados sea degradado vía lisosomas. La proteína X de interacción con ALG-2, también conocida como Alix, aumenta la tasa de degradación lisosomal y juega un rol regulatorio clave en la respuesta análogos de vasopresina al modular la desensibilización del receptor V2r [112].

Recientemente Feinstein *et al.* reportaron que vasopresina, a diferencia de oxitocina, continua generando AMPc y promoviendo la activación de PKA por períodos prolongados de tiempo luego de retirar el ligando y de la internalización del receptor. Contrario al modelo clásico de desensibilización de GPCR mediante arrestinas, tras la estimulación del V2r con vasopresina las arrestinas se unen al complejo receptor-ligando y extienden en vez de acortar la generación de AMPc. Esta vía de señalización es apagada mediante el complejo endosomal conocido como retrómero. Este complejo soluble heterotrimérico se une a distintas moléculas transportadas en endosomas tempranos y las reparte a múltiples

destinos tal como el aparato de Golgi. A su vez, también ha demostrado desensibilizar la señalización sostenida de AMPc en otro GPCR, el receptor de la hormona paratiroidea humana (PTHr). Sin embargo no se pueden descartar otros mecanismos de desensibilización, incluyendo cambio de afinidad por el agonista inducido por cambios conformacionales del receptor o bloqueo de su síntesis a un nivel pre- o postranscripcional [113].

El análogo sintético desmopresina

La desmopresina (dDAVP, 1-desamino-8-D-arginina vasopresina) es un análogo sintético de la vasopresina, descrito por primera vez en los años 60 [114]. DDAVP es una droga hemostática de muy buena tolerancia utilizada en una numerosa cantidad de condiciones clínicas que cursan con desórdenes de la hemostasia y sangrado. Respetando la estructura general de su hormona parental vasopresina, su secuencia cuenta 9 aminoácidos, y un puente disulfuro uniendo las cisteínas en posiciones 1 y 6. Sin embargo dicha molécula cuenta con modificaciones específicas que le otorgan propiedades características frente a la vasopresina. Con la deaminación de la cisteína en posición 1 y su transformación en ácido 3-mercaptopropiónico (Mpa), se prolonga significativamente el efecto antidiurético. Por otro lado, la sustitución de la L-Arginina por una D-Arginina en posición 8 disminuye drásticamente el efecto presor característico de la hormona natural, al afectar la afinidad con el V1r (Figura 5).

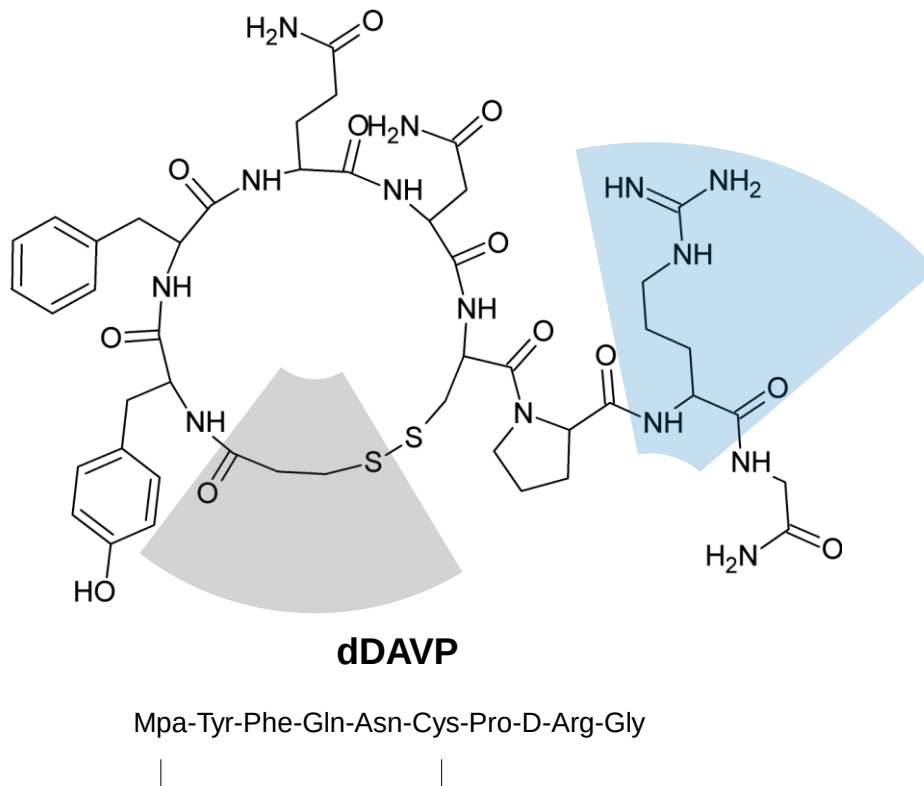


Figura 5. Secuencia peptídica de la hormona sintética desmopresina (dDAVP, 1-desamino-8-D-arginina vasopresina). Este nonapéptido difiere de la hormona natural vasopresina por la desaminación de homocisteína en posición 1 (área sombreada de color gris) y una sustitución en la posición 8 de una L-arginina por una D-arginina (área sombreada de color azul). La secuencia de aminoácidos se muestra utilizando el código estándar de 3 letras y el puente disulfuro entre las posiciones 1 y 6 es representado con una línea conectora.

El rango de dosis de dDAVP aplicada por vía parenteral es de 0.3 a 2 $\mu\text{g/kg}$ (i.v. o s.c.). La inyección de dDAVP es útil cuando la droga no es tolerada o adecuadamente absorbida a través de las vías intranasal o conjuntival. La ruta parenteral también se indica en el tratamiento de los procesos hemorrágicos, debido que los niveles sanguíneos de dDAVP

requeridos para un efecto hemostático satisfactorio son 5 a 10 veces mayores que para la acción antidiurética. La metabolización de dDAVP es llevada a cabo por hígado y riñón, aunque es algo más lenta que para la vasopresina. Cerca del 60% es liberada por el riñón sin ser metabolizada [105].

Efectos biológicos y usos clínicos de desmopresina

En contraste con la hormona vasopresina, que interacciona con los distintos receptores de membrana (V1r, V2r y V3r), el análogo sintético dDAVP es un agonista selectivo del receptor V2r. Este subtipo de receptor se expresa en los túbulos colectores del riñón y es responsable de la acción antidiurética de la hormona [115]. Además, el receptor V2r se expresa en las células endoteliales, mediando la mayoría de los efectos no renales de dDAVP.

Los efectos vasopresor, glucogenolítico y agregante plaquetario de la vasopresina están mediados por receptores V1r, dependientes de fosfatidilinositol, en tanto que la acción antidiurética y el efecto hemostático mediado por la liberación del factor VIII y FVW están ligados al receptor V2r.

En los túbulos colectores del riñón, la activación del receptor V2r por vasopresina o dDAVP produce retención hídrica, debido a la inducción de la translocación de los canales de agua acuaporina-2, en un fenómeno de exocitosis mediado por AMPc [116].

Entre los efectos más relevantes sobre el sistema hemostático se deben mencionar la liberación endotelial del factor de coagulación VIII, el tPA y particularmente el FVW.

El FVW es una glicoproteína que juega un rol primordial en el mantenimiento de la hemostasia del organismo, facilitando la adhesión de plaquetas al subendotelio. Funciona como un transportador del factor VIII de la coagulación, protegiéndolo de la degradación proteolítica. El FVW es sintetizado como una proteína precursora en las células endoteliales y megacariocitos. Este precursor sufre dimerización, glicosilación, clivaje proteolítico y ensamblado de los dímeros clivados en un gran multímero (500-15,000 kDa). Los multímeros de FVW son almacenados en gránulos secretores especializados denominados cuerpos de Weibel-Palade. La dDAVP activa los receptores V2r e induce la secreción del FVW a través de la liberación de los cuerpos de Weibel-Palade. Por otra parte, dDAVP induce un incremento en los niveles plasmáticos del factor VIII de la coagulación, aunque los mecanismos por los que esto se lleva a cabo no se encuentran totalmente esclarecidos. La dDAVP podría inducir la secreción del factor VIII o favorecer su protección de la degradación proteolítica por el incremento del FVW.

El rol de la dDAVP en la fibrinólisis fue uno de los primeros efectos descritos para este compuesto sintético. La actividad profibrinolítica de la dDAVP es debido al incremento del activador tisular del plasminógeno (tPA), una enzima proteolítica encargada de convertir el plasminógeno en plasmina y de esta manera iniciar la degradación de fibrina. Se piensa que el endotelio microvascular es la principal reserva de tPA plasmático. En células endoteliales cultivadas, el tPA se expresa en niveles bajos. La expresión aumenta en respuesta a *shock* cardiogénico, trombina, histamina, ácido retinoico, factor de crecimiento del endotelio vascular y butirato de sodio, usualmente por aumento de la actividad transcripcional. No obstante, existen evidencias *in vitro* e *in vivo*, que indican que el tPA es secretado a

partir de reservas celulares ya sintetizadas. En respuesta a dDAVP, se produce un incremento rápido del tPA plasmático, como ocurre con la administración sistémica de agentes β -adrenérgicos [117]. La co-localización del FVW y el tPA en el mismo compartimiento podría explicar el efecto coordinado de la dDAVP sobre los niveles plasmáticos de estas dos proteínas [118].

La dDAVP posee propiedades vasodilatadoras, asociadas a un descenso en las presiones sistólica y diastólica, aumento del gasto cardíaco y erupción facial. Estudios de perfusión han demostrado que dDAVP ejercen un efecto vasodilatador directo luego de ser inyectados en forma intraarterial, por un mecanismo dependiente de óxido nítrico [119]. Estas observaciones, sugieren una activación directa de la enzima óxido nítrico sintasa en el endotelio vascular, dependiente del receptor V2r y mediado por AMPc.

La molécula de adhesión P-selectina se expresa en células endoteliales y es contenida en los cuerpos de Weibel-Palade. Su presencia también se ha reportado en gránulos presentes en megacariocitos y plaquetas [120]. Kanwar *et al.* demostraron que la dDAVP induce un incremento transitorio de la expresión de P-selectina sobre el endotelio de la vena umbilical humana, como también en plaquetas humanas y de rata. Los primeros estudios indicaron que la expresión de P-selectina en las células endoteliales es muy importante durante el inicio de la interacción entre leucocitos y células endoteliales, conocido como rodamiento, requisito inicial para la adhesión y migración leucocitaria [121]. Además, se ha demostrado que la dDAVP incrementa la capacidad de los monocitos sanguíneos de unirse activamente a las plaquetas, debido a la expresión de ligandos sialilados de P-selectina sobre la superficie de los monocitos [122].

Tradicionalmente, debido a sus propiedades antidiuréticas, la dDAVP se ha utilizado en el tratamiento de la diabetes insípida y otras patologías asociadas a la poliuria (emisión de volúmenes de orina mucho mayores a los observados en condiciones normales). La diabetes insípida es una condición patológica infrecuente asociada a la falla en la producción y/o secreción de la vasopresina involucrando a la neurohipófisis (diabetes insípida central) o a una insensibilidad a la vasopresina por parte del tejido renal (diabetes insípida nefrogénica), causado, entre otras cosas, por mutaciones en el V2r presente en los túbulos colectores renales.

A final de la década de los 70, se introdujo el uso de dDAVP para el tratamiento de la Hemofilia A y la enfermedad de von Willebrand, entre las coagulopatías hereditarias más comunes. Mientras que la Hemofilia A es una patología causada por la deficiencia del factor VIII, la enfermedad de von Willebrand es causada por una deficiencia, tanto en cantidad como en calidad, del FVW. En esta última, la mayoría de los pacientes cursan una enfermedad leve, que puede mantenerse inadvertida hasta un traumatismo o una intervención quirúrgica. Las coagulopatías también pueden ser adquiridas. Por ejemplo la enfermedad de von Willebrand puede manifestarse en pacientes tras episodios autoinmunes causando formas multiméricas anormales del FVW. El tratamiento con dDAVP también ha mostrado ser muy eficaz en el manejo de desórdenes de la coagulación inducidos por drogas, anormalidades en el funcionamiento plaquetario causado por falla renal o hepática y en cirugías con alto riesgo de sangrado que involucren a pacientes que no necesariamente presenten desórdenes en la coagulación [123-125].

Efectos adversos de la dDAVP

La única complicación relevante es la inducción de intoxicación hídrica luego de aplicaciones repetidas. La retención excesiva de líquido por acción de dDAVP puede provocar un estado de hiponatremia, es decir un trastorno electrolítico caracterizado por un descenso en los niveles de sodio en sangre. Algunos de sus síntomas incluyen, pero no están limitados a, náuseas, vómitos, cefaleas y crisis convulsivas. Esta complicación poco habitual, está en relación a alteraciones del componente inhibitorio del mecanismo de la sed y podría evitarse reduciendo la ingesta de líquidos. Es recomendable continuar la administración de dDAVP sólo cuando vuelve a manifestarse la poliuria [125].

Los episodios trombóticos asociados al uso de dDAVP son infrecuentes. En una revisión de casos reportados en seres humanos, el riesgo protrombótico fue estimado en 0.0001% [126].

Análogos de vasopresina y cáncer

Expresión de vasopresina y sus receptores en células tumorales

La presencia en la superficie celular de receptores neuropeptídicos en células tumorales, entre los que se incluye los receptores de vasopresina, ha sido reportado extensamente en la literatura [127-129]. En particular, se ha establecido la presencia de receptores de vasopresina de todos los tipos (V1r, V2r y V3r) en líneas tumorales de cáncer de pulmón de células pequeñas y de mama [130]. Adicionalmente, la expresión de variantes anómalas del receptor V2r, también se ha reportado en ciertas líneas tumorales de pulmón y mama. El análisis por RT-PCR y Western Blot de la línea tumoral MCF-7 mostró que estas células pueden expresar todos los subtipos del receptor de vasopresina así como también variantes anormales [128].

Se ha postulado que la expresión de la hormona vasopresina podría representar parte de la transformación oncogénica temprana en tejido mamario. Esto se basa en que no existe evidencia de su expresión en tejido mamario normal o en hiperplasias atípicas, mientras que sus productos génicos relacionados se encuentran en todos los casos analizados de carcinomas mamarios *in situ* preinvasivos [131].

La hormona vasopresina es secretada de forma autócrina por la mayoría de los carcinomas, siendo capaz de estimular su proliferación inclusive a bajas concentraciones tras activar el receptor V1r. Sin embargo, está establecido que en concentraciones mayores esta hormona puede inducir el efecto contrario [132, 133]. Mientras que los efectos promitogénicos mediados por el V1r estarían asociados a aumentos en la

actividad de las enzimas PKC, PLC e incrementos en los niveles de Ca^{++} intracelular, la estimulación selectiva del V2r se vincula a una reducción de la proliferación celular mediada por la activación de la enzima AC, aumento subsecuente de los niveles de AMPc y la actividad de la PKA [128, 134, 135]. Está ampliamente reportado que incrementos en los niveles de AMPc intracelular usando análogos permeables de AMPc tales como 8-Br-AMPc o agentes elevadores de AMPc, incluyendo determinadas hormonas y forskolina, pueden desencadenar arresto del ciclo celular, inhibición de la migración y respuestas proapoptóticas de numerosas variantes de células tumorales, incluyendo cáncer mamario [136-138]. Consecuentemente, distintos autores han postulado a la vía de señalización AC/AMPc/PKA como un sistema supresor del crecimiento de cáncer mamario que podría ser utilizado como blanco para bloquear la progresión tumoral [138, 139].

Adicionalmente, está reportado que el receptor de vasopresina tipo V2r puede estimular a las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) ERK1/2 en una vía de señalización independiente a la proteína G heterotrimérica [140].

Efectos antitumorales del péptido dDAVP

Efectos sobre el crecimiento *in vitro*

En el año 1997 se reportó que la vasopresina y su análogo peptídico, y agonista selectivo del V2r, desmopresina, tenían la capacidad de modular el crecimiento de cultivos de células carcinomatosas mamarias *in vitro*, y la secreción tumoral de la uPA, una proteasa involucrada en la formación de

metástasis hemáticas [141]. Los principales efectos *in vitro* hasta ahora reportados de la dDAVP sobre células de carcinoma mamario que presentan el receptor V2r son citostáticos y angiostáticos [142, 143]. Keegan *et al.* demostraron que el efecto antiproliferativo de dDAVP sobre células de cáncer mamario humano MCF-7, podía ser bloqueado mediante el uso de satavaptan (SR121463), un antagonista químico del V2r, confirmando que el efecto citostático del péptido estaría mediado por el receptor de vasopresina tipo 2 presente en la membrana de las células tumorales [130]. Hace ya algunos años nuestro grupo reportó una modulación del crecimiento similar sobre cultivos celulares de la línea de carcinoma mamaria murina altamente agresiva F3II. Utilizando concentraciones relevantes desde un punto de vista farmacológico de entre 100 hasta 1,000 nM, dDAVP logró inhibir la proliferación de F3II hasta un 25% en una manera dosis dependiente [143].

Efectos sobre la diseminación tumoral

En el año 1999 se logró demostrar por primera vez que dDAVP era capaz de disminuir la capacidad metastásica de células de cáncer mamario utilizando dosis clínicamente relevantes. Para evaluar la acción del péptido sobre el fenómeno de diseminación tumoral a distancia se utilizó nuevamente el modelo F3II altamente agresivo y metastásico. La coinyección vía endovenosa de dDAVP junto a células de carcinoma mamario F3II inhibió de manera drástica la formación de metástasis experimentales. Llamativamente se observó que un tratamiento breve de las células con dDAVP previo a la inoculación en el torrente sanguíneo no afectaba de manera significativa su potencial metastásico, demostrando que

más allá del efecto directo sobre las células tumorales, se requiere de un efecto modulador por parte del hospedador para alcanzar su máxima actividad antimetastásica.

También se evaluó el efecto del plasma obtenido de animales control y tratados con dDAVP sobre la capacidad de agregación *in vitro* de las células tumorales. Tras 30 minutos de la inoculación i.v. de dDAVP o vehículo salino (grupo control) en ratones BALB/c, se extrajo sangre arterial a la cual se le agregó una suspensión de células tumorales. Luego de 15 minutos en agitación se observó que, mientras el grupo control presentaba múltiples agregados celulares, las células incubadas en plasma de animales tratados con dDAVP permanecían principalmente como una suspensión monocelular. Estos resultados indicarían que los factores de la hemostasia liberados desde el endotelio vascular por acción de dDAVP, tales como la proteasa tPA o el FVW, podrían modular la agregación multicelular y reducir la formación de émbolos tumorales circulantes, así limitando el potencial metastásico de las células diseminadas [144]. Adicionalmente Terraube *et al.* mostraron que el factor de FVW juega un rol protector contra la diseminación de las células tumorales en un modelo murino deficiente para el factor de FVW [145]. Las células de melanoma y cáncer pulmonar tuvieron una mayor capacidad para formar metástasis en los ratones que no expresaban el factor de FVW. La restitución de los niveles plasmáticos en los ratones mutantes por coinyección de las células tumorales con el FVW recombinante humano redujo el número de metástasis pulmonares. El FVW es sintetizado por las células endoteliales y los megacariocitos, pero el FVW plasmático parece tener un origen principalmente endotelial. Como se mencionó previamente, la inyección endovenosa de dDAVP induce la liberación de multímeros de alto peso molecular de FVW, alcanzando un

pico de concentración a los 60 minutos y una vida media en plasma de 8-10 horas [115, 123]. El FVW podría participar en la interacción de las células tumorales con las plaquetas y el subendotelio, y podría impedir las metástasis reduciendo la adherencia y/o sobrevida de las células tumorales en la microvasculatura pulmonar [145].

Efectos de antitumorales de dDAVP durante la cirugía de cáncer mamario en modelos preclínicos y en ensayos clínicos veterinarios

Teniendo en consideración su acción sobre la diseminación experimental de células de cáncer mamario, y sus efectos hemostáticos, Girón y colaboradores evaluaron su potencial aplicación como adyuvante perioperatorio durante la cirugía de tumores de cáncer mamario agresivos. Ratones BALB/c portadores de tumores mamarios F3II localmente avanzados fueron sometidos a una manipulación experimental controlada y extirpación de la masa primaria, con o sin administración de dDAVP durante el acto operatorio. Cerca de la totalidad de los animales tratados con dDAVP mostraron los ganglios regionales libres de tumor (88% de los animales) y una reducción significativa del 65% en los nódulos metastásicos en pulmón tiempo después de la cirugía. En contraste solo el 13% de los animales del grupo control tuvieron ganglios linfáticos libres de metástasis. Adicionalmente sus pulmones presentaban múltiples lesiones metastásicas con una mediana de 27 nódulos pulmonares por animal [146].

Considerando la acción antitumoral de dDAVP en distintos modelos preclínicos de cáncer, Hermo y colaboradores llevaron a cabo un ensayo clínico piloto en medicina veterinaria evaluando la efectividad de desmopresina administrada de manera perioperatoria durante la

mastectomía en 21 perras portadoras de tumores mamarios localmente avanzados. Se descartó la presencia de metástasis pulmonares previas al acto quirúrgico mediante radiografías de tórax. La dDAVP fue administrada en dosis de 1 µg/kg i.v. 30 minutos antes y 24 horas después de la cirugía. El tratamiento perioperatorio utilizando dDAVP aumentó drásticamente la sobrevida libre de enfermedad y duplicó la sobrevida general de los animales tratados. Dichos resultados fueron confirmados en un ensayo clínico extendido incorporando 28 nuevos pacientes caninos, replicando el esquema de tratamiento. En dicho ensayo la acción terapéutica de dDAVP se hizo particularmente evidente en las variantes tumorales más agresivas, correspondientes a carcinomas moderadamente o pobremente diferenciados [147, 148].

Efectos de dDAVP sobre la vasculatura asociada a tumor y la producción de factores reguladores de la angiogénesis

Otro hallazgo interesante fue la actividad antiangiogénica de dDAVP en el modelo murino F3II de carcinoma mamario. Para evaluar el efecto de dDAVP sobre la inducción temprana de la vascularización por parte de células tumorales *in vivo*, ratones BALB/c fueron inoculados en el límite entre la dermis y el tejido subcutáneo con células F3II. La dDAVP fue administrada diariamente vía endovenosa utilizando una dosis de 2 µg/kg durante 5 días. Una vez finalizado el protocolo, los ratones pertenecientes al grupo control inoculados con vehículo salino, desplegaron una profusa e irregular vascularización alrededor de los implantes tumorales. En contraste, en los animales administrados con dDAVP la angiogénesis inducida por

tumor fue drásticamente inhibida, revelando una menor densidad vascular y una vasculatura menos tortuosa [142].

Los hallazgos sugieren que la actividad antiangiogénica de dDAVP se vincularía con una mayor producción de angiostatina, en un mecanismo que sería dependiente de la expresión del receptor V2r de vasopresina en las células cancerosas. El agregado de dDAVP *in vitro* moduló de manera positiva la generación de angiostatina en las líneas de cáncer mamario F3II y MCF-7 pero no en las variantes humana y murina de melanoma negativas para V2r, evidenciando una respuesta dependiente del tipo tumoral y que podría estar relacionada a la presencia del receptor V2r. Asimismo, la producción de angiostatina en presencia de dDAVP se correlacionó con la producción de proteasas, mostrando un aumento considerable de los niveles de activadores de plasminógeno en los medios condicionados de F3II y MCF-7, así como también se encontró una modulación positiva de las MMPs expresadas por ambas líneas tumorales [142].

Al igual que en las células del endotelio vascular, dDAVP induciría en las células tumorales la producción de activadores del plasminógeno y otras proteasas. En distintas líneas tumorales se demostró que los activadores del plasminógeno se asocian directamente con la generación de angiostatina, un conocido efector angiostático que se genera a partir del clivaje del plasminógeno presente en la MEC [149].

Por otra parte, tras analizar la expresión de los principales participantes del proceso angiogénico mediante microarreglos de ARN mensajero en las células MCF-7, dDAVP fue capaz de inducir un descenso en los niveles de dos poderosos agentes proangiogénicos, el VEGF-B y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Además, se encontró

una inhibición completa en la expresión de HIF-1A y TGF- β 3 (Datos no publicados).

Como se mencionó previamente, el HIF-1A es un factor de transcripción clave en la respuesta sistémica y celular a la hipoxia. Por otro lado, la molécula TGF- β 3 es un polipéptido multifuncional que controla muchos aspectos de las funciones celulares. Posee una acción bifásica sobre la tumorigénesis inhibiendo la proliferación de ciertos tipos celulares lo que lo posiciona como un supresor de tumor, pero a medida que avanza la progresión tumoral, esta molécula despliega características promotoras del desarrollo tumoral, promoviendo la invasión, la angiogénesis y el desarrollo de metastásis [150]. Estos resultados sugieren que dDAVP podría modular el proceso angiogénico no solamente mediante la producción de inhibidores angiogénicos, sino también a través de una disminución en la expresión de ciertos promotores del crecimiento endotelial. Así, se limitaría la capacidad de las células tumorales de inducir tempranamente la angiogénesis alrededor de su foco de crecimiento.

Rol dual y recíproco de dDAVP sobre el endotelio vascular y las células tumorales

Los nuevos enfoques terapéuticos que usan anticuerpos monoclonales y pequeñas moléculas inhibitoras dirigidos a distintas vías claves de señalización, concentran su accionar en claros efectos antagonistas. Los análogos de vasopresina en cambio, serían agonistas selectivos de vías que modularían la agresividad de las células tumorales, afectando su proliferación, su capacidad de inducir angiogénesis y de generar metástasis.

Al actuar sobre los receptores de las células tumorales y del endotelio microvascular, el péptido ejercería un doble mecanismo antitumoral. Por un lado una acción citostática y angiostática en las células tumorales, estimulando un ciclo proteolítico que lleva a la producción de angiostatina, y por otro lado la liberación endotelial de factores de la coagulación, que mejoran la hemostasia e interfieren la anidación de células metastásicas.

Actividad antitumoral de dDAVP sobre otros carcinomas

Monstein *et al.* publicaron una caracterización completa de la expresión de receptores de vasopresina en el tracto gastrointestinal humano, mostrando la presencia del V2r en biopsias de esófago, estómago, colon y recto [151]. Adicionalmente, se caracterizó la expresión del receptor V2r en las líneas celulares de carcinoma colónico humano COLO-205 y murino CT-26. En el 2010 nuestro grupo reportó la actividad del péptido dDAVP como agente antitumoral en modelos experimentales de cáncer de colon. En ratones singénicos inoculados i.p. con células CT-26, la administración de dDAVP (i.v. 2 µg/kg) redujo la acumulación de líquido ascítico y la formación de nódulos tumorales intestinales. Además, el uso de dDAVP inhibió la progresión tumoral en animales con implantación quirúrgica intraesplénica de células tumorales colónicas. También se observaron las primeras evidencias de los efectos cooperativos *in vitro* entre dDAVP y 5-fluorouracilo, terapéutico citotóxico usado de rutina para el tratamiento de cáncer colónico [152].

Recientemente, nuestro grupo reportó los primeros resultados sobre la actividad antitumoral de dDAVP en modelos experimentales de cáncer con características neuroendócrinas (NE). Los tumores NE abarcan un

grupo de neoplasias altamente heterogéneas, caracterizadas por una profusa vascularización y, en general, una buena respuesta a terapia hormonal basada en análogos de somatostatina. Particularmente en carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC) V2r-positivo, el cual expresa distintos marcadores NE, el tratamiento *in vitro* con el dDAVP en concentraciones nanomolares altas, redujo significativamente la proliferación y la migración celular de manera concentración dependiente. Dichas acciones antitumorales no se observaron en otras líneas celulares V2r-negativas, incluyendo células de carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC). Confirmando la noción que el efecto anticanceroso *in vitro* estaría mediado estrictamente vía el V2r, en las células de SCLC respondedoras el péptido se bloqueó la expresión de dicho receptor mediante silenciamiento génico usando ARN de interferencia (siRNA). Como consecuencia, el efecto antiproliferativo de dDAVP fue completamente bloqueado [153].

Complementando estos hallazgos, la actividad antimetastásica de dDAVP sobre células cancerosas V2r-negativas inyectadas en ratones singénicos inmunocompetentes se vió severamente limitada. Para este ensayo se inocularon células de melanoma murino B16 en la vena lateral de ratones híbridos C57BL/6j-CBA, y la dDAVP fue inyectada utilizando dosis de 2 µg/kg. El tratamiento de dDAVP resultó en una inhibición leve no significativa del 20% en el número de nódulos pulmonares en comparación con el grupo control [154].

Un nuevo análogo de vasopresina

Además de sus ampliamente reportados efectos sobre la hemostasia, dDAVP parece producir un efecto dual antimetastásico y antiangiogénico, interrumpiendo el “diálogo” cooperativo entre el tumor y el endotelio vascular [102]. Teniendo en cuenta sus propiedades, dDAVP resulta ser un compuesto líder muy interesante para el desarrollo de nuevos análogos peptídicos derivatizados con actividad biológica exacerbada. Dichos péptidos heredarían características únicas y atractivas de su análogo parental como su producción estandarizada y fácilmente escalable, alta especificidad y baja toxicidad.

El Laboratorio de Oncología Molecular comenzó hace varios años el desarrollo racional de nuevos análogos de vasopresina, y particularmente de desmopresina, en búsqueda de compuestos con actividad antitumoral aumentada. El diseño de las distintas variantes peptídicas se centró en modificaciones aminoacídicas y estructurales dirigidas hacia el ciclo conformacional ubicado en el extremo N-terminal de las moléculas, región clave en la interacción ligando-V2r y, como consecuencia, en su actividad biológica [155-159]. Mediante modelados tridimensionales computacionales Trzepalka *et al.* estudiaron la interacción de la molécula vasopresina y el receptor tipo V2r. Se logró concluir que sólo la porción cíclica de la vasopresina (aminoácidos entre posiciones 1 y 6) interactúa con las hélices internas del receptor, mientras que la región C-terminal (aminoácidos 7, 8 y 9) se caracteriza por poseer una considerable movilidad. En contraste, esta región, en particular la cadena lateral del aminoácido Arg en posición 8, interactúa fuertemente con un *loop* extracelular del receptor V1r, limitando

drásticamente su movilidad [160]. Eso explicaría porque la sustitución de la L-Arginina por una D-Arginina en posición 8 disminuye drásticamente el efecto presor de la molécula al afectar la afinidad por este tipo de receptor. Es por este motivo que la modificación de aminoácidos (AAs) en el diseño racional de nuevos análogos fue concentrada en las posiciones 4 y 5 dentro del ciclo de los análogos ya que es el que dicta la afinidad con nuestro receptor de interés.

La búsqueda de nuevos péptidos agonistas del V2r incluyó el diseño de distintos isómeros quirales, variantes tetrapeptídicas y nonapéptidos de longitud completa [157]. En una evaluación inicial sobre varios análogos sintéticos derivatizados, un compuesto cíclico demostró propiedades citostáticas y angiostáticas exacerbadas respecto de la molécula parental desmopresina, y otros análogos evaluados [157, 161, 162]. El compuesto fue denominado análogo “[V⁴Q⁵]dDAVP” (1-desamino-4-valina-5-glutamina-8-D-arginina vasopresina) (Figura 6).

Como se mencionó previamente, en primer lugar se analizaron los efectos de los distintos derivados peptídicos sobre la proliferación *in vitro* de células de tumorales utilizando el modelo de carcinoma mamario humano V2r-positivo MCF-7. En dicha instancia el panel de péptidos incluía a la molécula parental dDAVP, sus análogos derivatizados [V⁴Q⁵]dDAVP y [A⁴Q⁵]dDAVP, sus respectivas variantes tetrapeptídicas YFQN, YFVQ e YFAQ, el isómero quiral de la variante más activa; [D-V⁴Q⁵]dDAVP, entre otros. Se observó que [V⁴Q⁵]dDAVP desplegó un efecto antiproliferativo significativamente mayor sobre células cancerosas mamarias al compararlo tanto con su análogo parental dDAVP, como con el resto de los análogos sintéticos sobre los cuales se efectuó el testeo inicial [157].

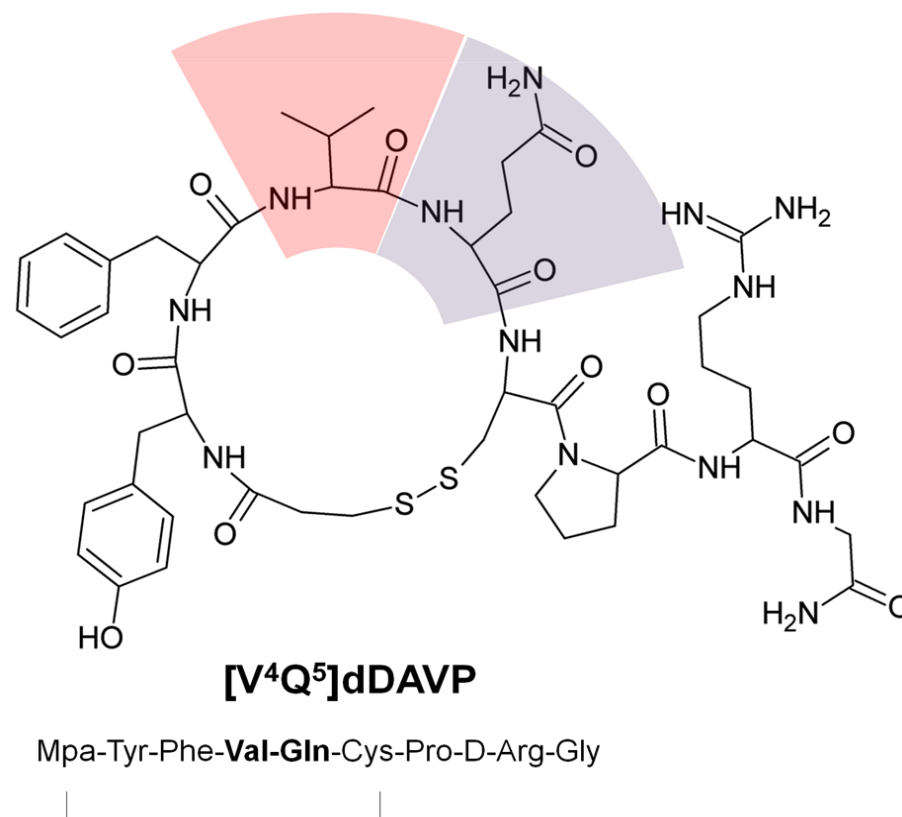


Figura 6. Secuencia peptídica del análogo sintético [V⁴Q⁵]dDAVP (1-desamino-4-valina-5-glutamina-8-D-arginina vasopresina). Este nonapéptido difiere de su péptido parental dDAVP por dos modificaciones aminoacídicas en la región del ciclo de la molécula; la sustitución de una glutamina por una valina en posición 4 (área sombreada de color roja) y una sustitución en la posición 5 de una asparragina por una glutamina (área sombreada de color violeta). La secuencia de aminoácidos se muestra utilizando el código estándar de 3 letras y el puente disulfuro entre las posiciones 1 y 6 es representado con una línea conectora. Los aminoácidos en negrita indican las posiciones modificadas.

En una evaluación preliminar, reportamos la efectividad angiostática del nuevo análogo peptídico [V⁴Q⁵]dDAVP en comparación con su análogo parental dDAVP en modelos de cáncer mamario murino (Figura 7). Utilizando células F3II inoculadas en el espacio intradérmico de ratones BALB/c, se observó que [V⁴Q⁵]dDAVP desplegaba una mayor eficacia antitumoral al inhibir drásticamente la respuesta angiogénica temprana inducida por tumores insipientes, comparado con los grupos tratados con dDAVP o vehículo salino (0.84 ± 0.05 , 1.03 ± 0.07 y 1.64 ± 0.2 respectivamente, densidad vascular expresada como vasos/mm², promedio $\pm$ SEM, $P < 0.001$) (Figura 7A) [161].

Este efecto antiangiogénico aumentado de [V⁴Q⁵]dDAVP se asoció con una mayor producción de angiostatina en línea con lo reportado previamente por Ripoll *et al.* Células de carcinomama mamario tratadas durante 24 horas con concentraciones en el rango nanomolar de [V⁴Q⁵]dDAVP aumentaron la generación del efector antiangiogénico angiostatina a partir de plasminógeno, en comparación con el grupo incubado con vehículo salino o incluso con dDAVP. Los análisis densitométricos realizados sobre las bandas de angiostatina obtenidas mediante la técnica *western blot* revelaron que, mientras la incubación con dDAVP indujo un aumento del 50% en la producción de angiostatina, el nuevo análogo [V⁴Q⁵]dDAVP incrementó en aproximadamente 150% la generación del factor antiangiogénico en cuestión con respecto al grupo control (Figura 7B y C) [162].

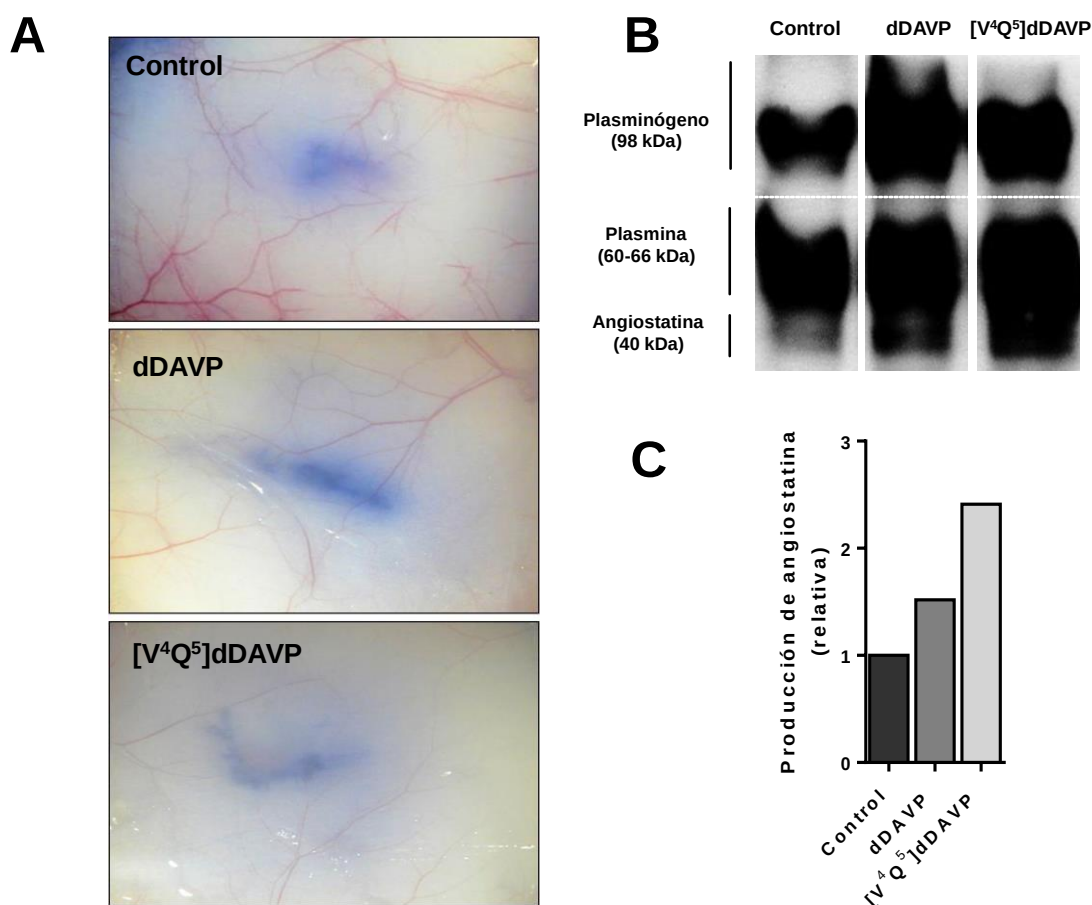


Figura 7. [V⁴Q⁵]dDAVP despliega un efecto antiangiogénico mejorado y una mayor producción de angiostatina comparado al análogo parental dDAVP. (A) ensayo de angiogénesis inducida por células de cáncer mamario murino F3II creciendo en ratones inmunocompetentes BALB/c. Imágenes representativas de implantes tumorales pertenecientes a los distintos grupos experimentales tras 5 días de tratamiento endovenoso con vehículo salino (control), dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP. (B) la conversión de plasminógeno a angiostatina mediada por células cancerosas mamarias fue revelada mediante la técnica de *western blot* luego de 24 horas de incubación con las drogas. (C) análisis densitométrico realizado sobre las bandas de angiostatina.

Diseño racional de [V⁴Q⁵]dDAVP

No es la primera vez que se altera la composición aminoacídica de la molécula de vasopresina o sus análogos derivados en búsqueda de un mayor efecto agonista o antagonista. Modificaciones en los AAs tirosina y fenilalanina en las posiciones 2 y 3 mostraron una intolerancia hacia AAs aromáticos, polares o cargados resultando en una pérdida de la actividad farmacológica de la vasopresina *in vivo* [163]. Esto indicaría que cambios drásticos en la polaridad o hidrofobicidad de los AAs presentes en el ciclo de la vasopresina afectan profundamente su afinidad por su receptor. Por otro lado Chan *et al.* descubrieron que una sustitución en la posición 3 con tienilalanina a pesar de aumentar levemente el efecto antidiurético mediado por el receptor V2r, generaba una rápida pérdida de actividad y una menor estabilidad química [164].

En el péptido sintético [V⁴Q⁵]dDAVP las modificaciones realizadas en las posiciones 4 y 5 (el cambio de Gln y Asn a Val y Gln, respectivamente) se realizaron respetando el [V⁴Q⁵]dDAVP carácter polar débil o no polar presente en la molécula dDAVP basándonos en que un aumento drástico en la polaridad podría interferir negativamente con la afinidad por el receptor. De hecho, al reemplazar a la Gln por una Val en la posición 4 estamos aumentando levemente el carácter hidrofóbico de la cadena lateral. En el año 2008 Manning *et al.* hipotetizaron que un aumento en la hidrofobicidad en la posición 4 mejoraría la interacción de ligandos relacionados con vasopresina con el receptor V2r [165]. En otro estudio reciente, Manning y colaboradores reportaron que [V⁴]dDAVP (4-valina-1-deamino-8-D-arginina vasopresina) posee una afinidad 10 veces mayor que dDAVP, con valores de K_i de 2.2 y 23.3 nM, respectivamente [158].

Además, con el objetivo de mejorar la estabilidad de la molécula, la substitución conservativa en posición 5, reemplazando Asn por Gln, fue basada en su susceptibilidad distintiva a la deaminación [166, 167]. Vale recalcar que las modificaciones presentes en el esqueleto estructural de dDAVP en las posiciones 1 y 8 (deaminación de la cisteína y el cambio de L-Arg por su estereoisómero D-Arg, respectivamente) no fueron alteradas.

Analizando en conjunto estos resultados, el análogo [V⁴Q⁵]dDAVP resulta ser un candidato interesante para profundizar los estudios sobre sus efectos sobre el comportamiento y la agresividad de células de tumorales de origen mamario, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Objetivos

Objetivo general

La desmopresina es un derivado sintético de la hormona antidiurética vasopresina con propiedades hemostáticas y antitumorales. El Laboratorio de Oncología Molecular ha desarrollado nuevos análogos peptídicos de la molécula vasopresina con propiedades antitumorales desplegadas en modelos murinos. Estos péptidos fueron diseñados racionalmente para ser agonistas exclusivos del receptor de vasopresina V2r. El objetivo general del presente trabajo se centró en investigar la actividad antitumoral del nuevo análogo peptídico 1-desamino-4-valina-5-glutamina-8-D-arginina vasopresina ($[V^4Q^5]dDAVP$) sobre distintos modelos de cáncer mamario con relevancia clínica para explorar su potencial uso en el manejo de la enfermedad.

Objetivos específicos

I. Determinar el esquema de administración de desmopresina asociado a una mayor eficacia antimetastásica, para luego evaluar el desempeño de su nuevo análogo derivatizado $[V^4Q^5]dDAVP$.

- Explorar la eficacia de desmopresina como agente antimetastásico utilizando distintos esquemas de administración con relevancia clínica.
- Analizar la asociación del efecto antimetastásico de desmopresina con su accionar hemostático.
- Evaluar la toxicidad aguda del nuevo análogo $[V^4Q^5]dDAVP$, previo a estudiar su eficacia antimetastásica en modelos animales.

- Utilizando el esquema de administración más conveniente, estudiar el efecto de $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre la diseminación de células tumorales vía hemática.
- Explorar la eficacia de $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre la progresión metastásica espontánea.

II. Caracterizar la acción antitumoral del nuevo análogo $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre distintos aspectos relevantes de la biología tumoral.

- Investigar las señales intracelulares asociadas al receptor V2r y a la activación del eje AC/AMPC/PKA mediada por $[V^4Q^5]dDAVP$.
- Estudiar el efecto de $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre el crecimiento celular en modelos bi- y tridimensionales, y su impacto sobre la progresión del ciclo celular.
- Evaluar los efectos directos de $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre eventos relacionados a la adhesión y motilidad de células tumorales.
- Estudiar la modulación de $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre el proceso angiogénico.
- Explorar el efecto de $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre la progresión tumoral de xenotransplantes de células cancerosas humanas en ratones atímicos.

III. Explorar los potenciales beneficios terapéuticos de $[V^4Q^5]dDAVP$ en combinación a quimioterapia.

- Evaluar el potencial efecto cooperativo *in vitro* de $[V^4Q^5]dDAVP$ y el citotóxico paclitaxel sobre la formación y el crecimiento de colonias de cáncer mamario humano.
- Estudiar el efecto del tratamiento con $[V^4Q^5]dDAVP$ en combinación a protocolos convencionales de quimioterapia sobre xenotransplantes de células cancerosas humanas en ratones atímicos.

Materiales y Métodos

Líneas celulares

Para la realización de este trabajo se utilizaron tres modelos de carcinoma mamario: la línea de carcinoma mamario murino F3II y las líneas de carcinoma mamario humano MCF-7 y MDA-MB-231. Para ensayos de angiogénesis *in vitro* se utilizaron además las células microvasculares endoteliales de pulmón humanas HMVEC-L.

La línea celular F3II de carcinoma mamario murino es una variante sarcomatoide altamente agresiva, hormono-independiente y metastásica establecida a partir de una subpoblación clonal de un tumor espontáneo originado en un ratón BALB/c [43]. F3II forma tumores altamente invasivos y metastásicos, con una profusa vascularización, en ratones inmunocompetentes BALB/c. A pesar de expresar el receptor de estrógeno, la línea celular no muestra sensibilidad al estímulo de estrógeno *in vitro*, y crece formando tumores de manera equivalente en ratones BALB/c hembras y machos. Las células F3II no muestran una clara sobreexpresión de HER-2/neu al ser evaluadas mediante inmucitoquímica.

Las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 fueron adquiridas de la *American Type Culture Collection* (ATCC) y fueron aisladas originalmente a partir de derrames pleurales en distintas pacientes caucásicas de cáncer mamario. Las células hormono-dependientes MCF-7 retienen múltiples características del epitelio mamario diferenciado y expresan el receptor de estrógeno y progesterona. Dichas células no son tumorigénicas en ratones inmunocomprometidos a menos que se lleve a cabo una suplementación con estrógeno, y expresan un fenotipo poco agresivo. Por otro lado, la línea hormono-independiente triple negativa MDA-MB-231 no expresa los receptores ER ni PR, así como tampoco sobreexpresa HER-2/neu. En ensayos *in vivo*, las células MDA-MB-231 son capaces de formar tumores

localmente invasivos si se inoculan en gran número en ratones atímicos BALB/c.

Las células MCF-7, MDA-MB-231 y F3II crecen *in vitro* adheridas al sustrato hasta formar una monocapa confluyente. Estas líneas son mantenidas en cultivos en monocapa en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (D-MEM, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor y 80 µg/ml de gentamicina. Todas las células utilizadas fueron subcultivadas aproximadamente tres veces por semana, usando una solución de disociación enzimática con 0.025% de tripsina y 0.01 % de ácido etildiaminotetraacético o EDTA (Gibco) diluído en PBS. La viabilidad celular fue evaluada usando la técnica de exclusión con el colorante vital azul tripán.

Por otro lado, la línea microvascular endotelial de pulmón humana HMVEC-L fue obtenida de la firma Cascade Biologics. Las células crecieron en monocapa en *coating* de gelatina y fueron cultivadas en medio de crecimiento endotelial suplementado con un conjunto de factores de crecimiento específico para células microvasculares (EGM-MV-2 Bullet Kit, Lonza) y en condiciones de baja concentración de suero fetal bovino según las especificaciones del proveedor. El medio de cultivo fue renovado día por medio hasta que llegaron a confluencia. Los cultivos fueron repicados una vez por semana.

Análogos peptídicos

Los análogos sintéticos dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP fueron sintetizados en el marco de un convenio de codesarrollo entre la Universidad Nacional de Quilmes y la compañía Romikin S.A. La responsable de la síntesis fue la

Dra. Nancy Iannucci de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Biotecnología, Universidad de Buenos Aires. Los péptidos se sintetizaron en fase sólida con protección N α -Fmoc mediante la estrategia de bolsa de té. Los productos sintéticos fueron purificados por la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC) e identificados mediante espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS). La cuantificación se realizó utilizando como referencia un *standard* comercial de dDAVP adquirido a BCN Peptides (San Quinti de Mediona, Barcelona, España). En todos los ensayos *in vivo* la droga fue diluída en solución fisiológica.

Tratamientos

Los animales tratados con los análogos dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP recibieron dosis de 0.3-2 μ g/kg por vía endovenosa. Dicho rango de dosis posee relevancia clínica con efectos hemostáticos ampliamente reportados en humanos [125], y con propiedades antitumorales reportadas en modelos preclínicos murinos y ensayos clínicos veterinarios en caninos [142, 144, 147, 148]. DDAVP puede inducir taquifilaxis si es administrada diariamente [115]. Es por esto que en tratamientos que se extienden por más de 5 días, los análogos fueron administrados respetando un esquema de 3 dosis semanales. El grupo control recibió solo el vehículo salino. Los experimentos *in vitro* fueron llevados a cabo usando concentraciones de los análogos del rango nanomolar y micromolar bajo, un rango consistente con las dosis empleadas *in vivo* [142, 144, 147, 148]. También se evaluó el beneficio terapéutico de [V⁴Q⁵]dDAVP combinado al quimioterápico paclitaxel (TaxolTM, Bristol-Myers Squibb). Luego de determinar la sensibilidad de MDA-MB-231 al paclitaxel y calcular su IC₅₀, el efecto

cooperativo con $[V^4Q^5]dDAVP$ *in vitro* fue analizado ensayando concentraciones sub- IC_{50} del quimioterápico. En los protocolos *in vivo*, los animales bajo terapia basada en taxano fueron inoculados vía i.p. con una dosis semanal subóptima de paclitaxel de 10 mg/kg durante 6 semanas a partir de la 3^{era} semana [168].

Ensayos *in vitro*

Inmunofluorescencia

Con el objetivo de detectar la presencia del V2r en células tumorales y microvasculares, 2.5×10^5 células fueron sembradas por *well* sobre los *coverslide* (CV) ubicados en una placa de 12 *wells* en medio D-MEM suplementado con 10% de SFB. Los CV fueron lavados con PBS en frío. Se fijaron las células sobre los CV con 0.5 ml de paraformaldehído 4% por *well* durante 15 minutos a temperatura ambiente (RT).

Luego se incubaron los CV en 0.5 ml de NH_4Cl 50 mM por 5 minutos para exponer y fijar epítopes. Tras lavar con PBS, los CV fueron incubados en 0.5 ml de SFB al 3% por 15 minutos para bloquear sitios inespecíficos y reducir el *background*. Los CV se incubaron durante 1 hora en cámara húmeda a 37°C con 50 μ l de una dilución 1:50 del anticuerpo primario de conejo anti-V2r (Santa Cruz Biotechnology). La unión del anticuerpo primario fue detectada mediante incubación con una dilución 1:400 de un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) en PBS 0.1% SFB (Caltag). Finalmente,

las células fueron montadas en medio con 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para contrastar núcleos (Vector). Se almacenaron en -20°C protegidos de la luz hasta visualizarlos en el microscopio. Se utilizó el microscopio de fluorescencia Nikon TE-2000 y las fotografías fueron adquiridas con el software Nikon NIS-Elements.

RT-PCR

El ARN total de las células de carcinoma mamario humano utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) fue obtenido realizando una extracción con Trizol (Invitrogen). La muestra fue cuantificada mediante espectrofotometría UV a 260 nm y se evaluó la pureza de cada una de las muestras analizando la relación de absorbancia 260/280 nm. La integridad se chequeó mediante una corrida en gel de agarosa 1% p/v con formaldehído 20% v/v y MOPS 80% v/v.

Para la reacción de retrotranscripción, 2 µg de ARN molde junto a 500 ng de *primers* oligodT (12-18 pares de base o pb de longitud) y 1 µl de un mix de 10 mM de dNTPs fueron incubados a 65°C durante 5 minutos y luego 1 minuto en hielo. Tras el agregado de ditioneitol (DTT), buffer de primera cadena, inhibidor de RNAsa y la retrotranscriptasa SuperScript III (Invitrogen) se incubó la mezcla durante 60 minutos a 50°C. Se inactivó la reacción de polimerización a 70°C durante 15 minutos. Una vez obtenido el ADNc para la reacción de polimerasa en cadena (PCR) los *primers* utilizados fueron obtenidos de bibliografía [128]. Un volumen de 4 µl del mix resultante de la reacción de retrotranscripción se agregaron a 20 µl de Supermix (Invitrogen) junto a los *primers Forward* y *Reverse* (1 µl de una solución stock de 20 pmoles/µl cada uno). Las RT-PCR se visualizaron

mediante la confección de geles 2% de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Los primers utilizados amplificaron una secuencia de aproximadamente 820 pb. El gen de β -Actina se utilizó como control de carga. Los *primers* se obtuvieron de bibliografía y generaron un amplicón de 600 pb. La línea de carcinoma mamario humano MCF-7 fue utilizada como control positivo y la línea de melanoma humano SKMel fue usada como control negativo.

Determinación de niveles de AMPc y actividad de PKA

Los estudios sobre el eje de señalización AMPc/PKA se realizaron en colaboración con los Dres. Ernesto Podestá y Ulises Orlando, pertenecientes al Laboratorio IIMHNO, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional de Buenos Aires.

Cuantificación de AMPc. Brevemente, células MCF-7 fueron incubadas con [V^4Q^5]dDAVP (1,000 nM) o vehiculo salino durante 60 minutos y los niveles de AMPc intracelular fueron determinados usando el inmunoensayo enzimático competitivo *Cyclic AMP EIA kit* (ACE, Cayman Chemical Company) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Actividad de PKA. El efecto de [V^4Q^5]dDAVP sobre la actividad de PKA en extractos celulares totales de células MCF-7 fue determinado por la incorporación de ortofosfato marcado con [^{32}P] al sustrato de PKA histona H1 a partir de [^{32}P] γ -ATP. Se evaluó la actividad de la enzima presente en

células MCF-7 incubadas por 30 o 60 minutos en presencia o ausencia de $[V^4Q^5]dDAVP$ (1,000 nM) o 8-Br-AMPC (500 μM). 8-Br-cAMP es un análogo permeable de AMPC y fue utilizado como un control positivo de la activación de PKA. Luego del tratamiento, los cultivos de células tumorales se lavaron con PBS, fueron cosechados en un *buffer* que contenía 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1 $\mu g/ml$ leupeptina y 1 $\mu g/ml$ aprotinina, para luego ser homogeneizado (homogeneizador de pellet a motor, Kontes). Este material se utilizó para las determinaciones de la actividad de PKA. La histona H1 (0.5 $\mu g/\mu l$) fue incubada con 35 μg de proteínas celulares en una mezcla para reacción que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 100 μM ATP y 20 μCi de $[^{32}P]$ ATP (volumen total de 200 μl). Luego de 30 minutos de incubación a 30°C, las proteínas fueron precipitadas con tricloroacético (TCA) al 10%, luego de adicionar albúmina bovina sérica (BSA) y centrifugar a 5,000xG por 10 minutos. Las proteínas precipitadas fueron adsorbidas sobre papel de fosfocelulosa p81 (Whatman) y lavadas con 75 mM de ácido ortofosfórico (OPA). Tras el secado del papel se cuantificó la radioactividad en un contador β . Los resultados fueron expresados como el cociente de la actividad de PKA en presencia y ausencia de AMPC (1 μM).

Proliferación celular

Para medir la proliferación celular se utilizó un ensayo metabólico basado en la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa mitocondrial (método del MTT). Las células tumorales se siembran en D-MEM con 10% de SFB en placas de 96 *wells* (2.5×10^3 células/*well*). A las 24 horas se cambió el medio de cultivo y se llevaron a cabo los tratamientos con los distintos análogos sintéticos dDAVP y $[V^4Q^5]dDAVP$ a distintas

concentraciones. Tras 72 horas de incubación el ensayo se reveló agregando 20 μ l de MTT (Sigma) en una concentración inicial de 5 mg/ml en medio de cultivo sin rojo fenol. Se incubó por 2.5 horas a 37°C, se descartó el medio y se disolvieron los cristales de formazan en 200 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO). Por último, se leyó la absorbancia a 570 nm.

Cultivo clonogénico

Adicionalmente, los efectos antiproliferativos de dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP fueron evaluados en cultivos celulares de baja densidad utilizando un ensayo de crecimiento clonogénico. $0.8-1.2 \times 10^3$ células/*well* fueron sembradas en places de 24 *wells* y cultivadas durante 7 días en medio completo con concentraciones específicas de análogos peptídicos. El medio completo con droga o vehículo fue reemplazado cada 72 horas. Los cultivos fueron luego fijados con formalina y teñidos con cristal violeta para facilitar el conteo de colonias. Cúmulos de más de 20 o 50 células MCF-7 o MDA-MB-231, respectivamente, fueron considerados como colonias. También se evaluó el efecto cooperativo tras combinar [V⁴Q⁵]dDAVP (1,000 nM) con una concentración sub-IC₅₀ de paclitaxel (1 nM).

Cultivo tridimensional de esferoides

Con el objetivo de estudiar el impacto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre el crecimiento de células de carcinoma mamario humano en cultivos tridimensionales se desarrollaron dos ensayos de esferoides multicelulares.

El primero se usa para evaluar la capacidad de las células tumorales embebidas en extracto de membrana basal (EMB) para crecer y formar estructuras tridimensionales tipo esféricas. El segundo ensayo permite estudiar el crecimiento de esféricas completas y aisladas trasplantadas sobre una superficie no adherente.

El EMB utilizado fue Matrigel™, extraído del sarcoma murino de Engelbreth-Holm-Swarm, un tumor rico en proteínas de matriz extracelular. Este material contiene aproximadamente un 60% de laminina, 30% de colágeno IV y algunas otras moléculas como proteoglicanos de heparan sulfato, EGF, IGF, FGF, tPA, entre otros. Una vez polimerizada, esta mezcla compleja de proteínas y factores de adhesión y crecimiento, representa una matriz estructural, biológicamente activa, favoreciendo el establecimiento de las células tumorales tanto en escenarios *in vitro* como *in vivo*.

Esféricas múltiples en EMB. Placas de cultivo de 24 wells fueron recubiertas con Matrigel™ 1:3 en D-MEM, para luego agregar una mezcla compuesta por 6×10^3 células MDA-MB-231 en 200 μ l de Matrigel™ 1:5 en D-MEM (Figura 8). Luego se agregaron 200 μ l de D-MEM suplementado con 10 % de SFB junto con los análogos peptídicos a una concentración final de 1,000 nM. El medio de cultivo con o sin drogas se recambió cada 72 horas hasta alcanzar el día 14. El número y diámetro de los esféricas incrustados en EMB fue calculado utilizando fotografías tomadas con el microscopio invertido Nikon TE-2000 y el software Nikon NIS-Elements. También se evaluó el efecto sobre la formación de esféricas de $[V^4Q^5]$ dDAVP (1,000 nM) combinado a una dosis sub-IC₅₀ de paclitaxel (1 nM).

Crecimiento de esféricas aisladas sobre agar. Para continuar estudiando el efecto de los análogos peptídicos sobre el crecimiento

tridimensional de células cancerosas, se generaron esferoides multicelulares sobre una capa de MatrigelTM para luego ser transplantados individualmente a *wells* en condiciones de baja adherencia para monitorear su crecimiento individual. En primer lugar, se colocaron 70 μ l de *coating* de MatrigelTM 1:7 en D-MEM en cada *well* de una placa de 96 *wells* y se dejó polimerizar 30 minutos a 37°C. Luego se sembraron 7.5×10^3 células/*well* en 150 μ l de D-MEM suplementado con 10% de SFB. A día 6 se evaluaron los esferoides según morfología y tamaño usando microscopio invertido. Se seleccionaron esferoides con morfología característica de linaje celular [169], entre 400 y 700 μ m de diámetro (calculado usando funciones métricas del software Nikon NIS-Elements) y se traspasaron de manera individual a *wells* previamente recubiertos con 50 μ l de agar al 1 % p/v para simular condiciones de baja adherencia. Luego del traspaso, se seleccionaron solo aquellos esferoides con integridad estructural, morfología y tamaños apropiados, para luego ser repartidos en los distintos grupos experimentales (Figura 9). El crecimiento fue monitoreado midiendo su diámetro cada 3 días durante 9 días luego de su traspaso sobre agar, y fue relativizado a cada esferoide individual.

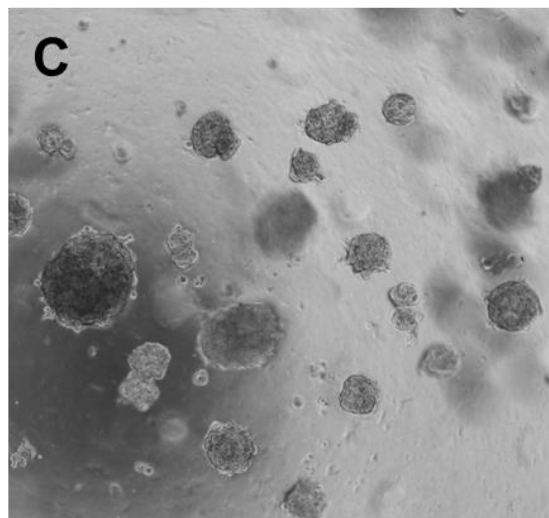
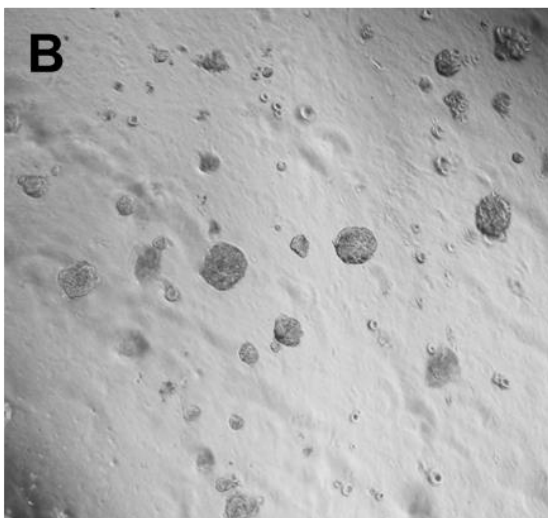
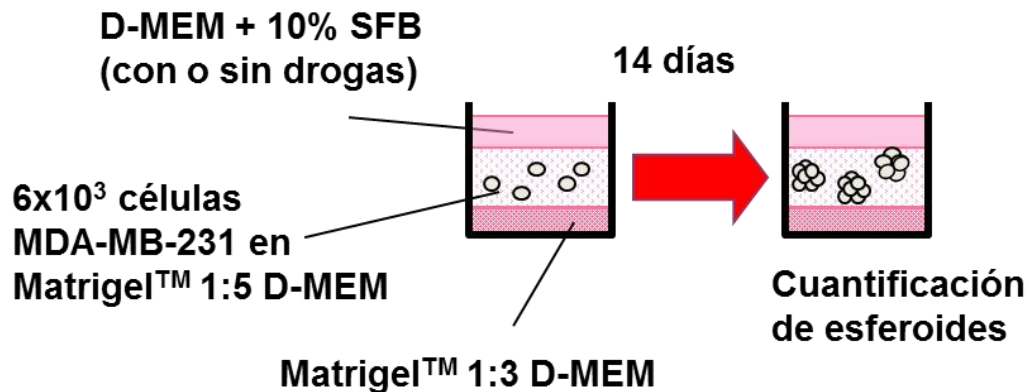
A

Figura 8. Ensayo de esferoides múltiples en EMB. (A) representación esquemática de la formación y crecimiento de esferoides MDA-MB-231 a partir de células embebidas en EMB Matrigel™. (B) y (C) esferoides MDA-MB-231 formados luego de 7 y 14 días de cultivo, respectivamente, en medio de cultivo completo. Aumento 40X.

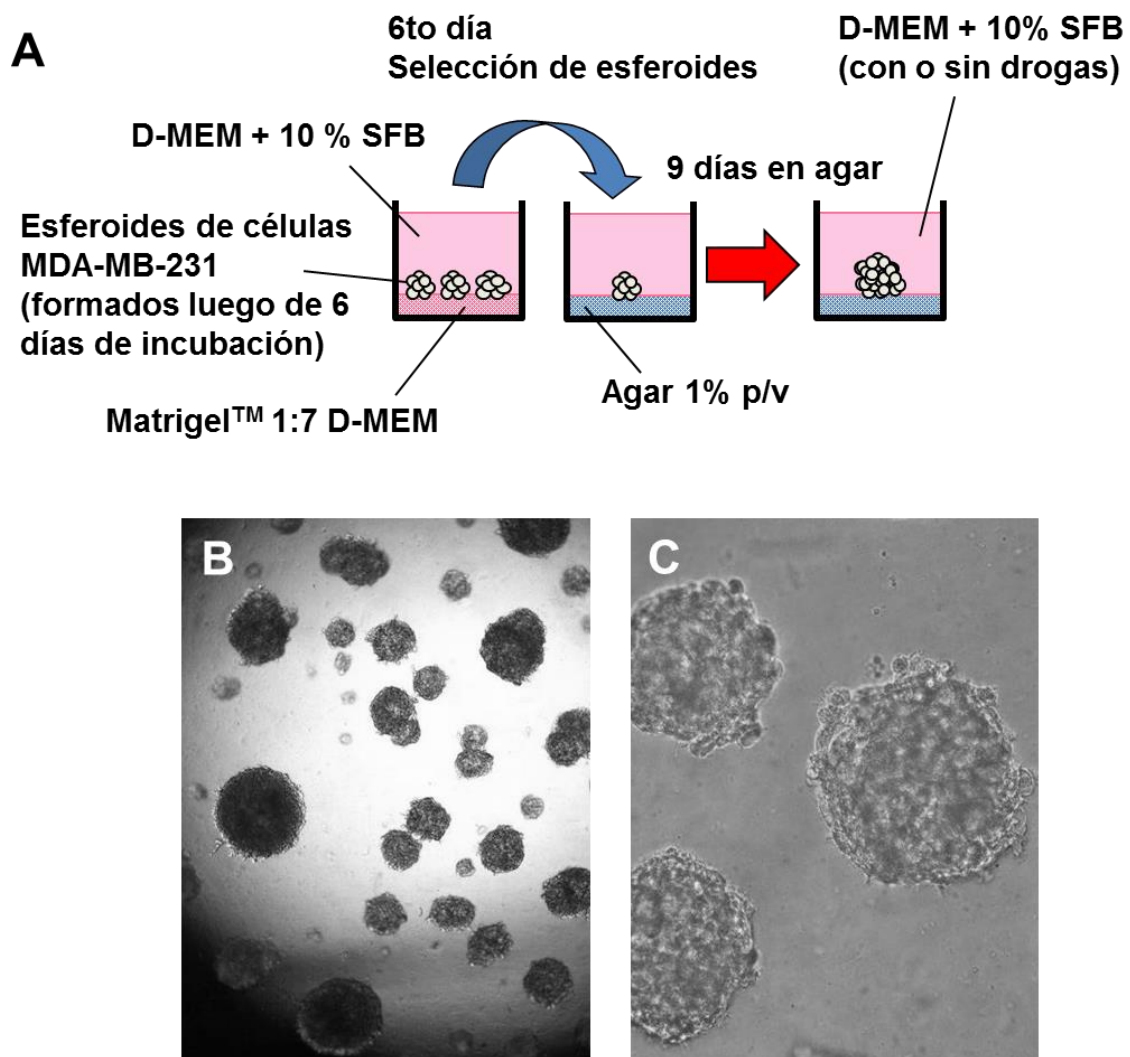


Figura 9. Ensayo de crecimiento de esferoides MDA-MB-231 aislados sobre agar. (A) representación esquemática de la formación en Matrigel™, selección, transplante y crecimiento en agar de esferoides MDA-MB-231. (B) y (C) esferoides MDA-MB-231 formados luego de 6 días de cultivo sobre Matrigel™. Solo aquellos esferoides que presenten un tamaño y morfología apropiado fueron seleccionados para ser transplantados de manera individual sobre superficies no adherentes. Aumento 40X y 200X, respectivamente.

Análisis del ciclo celular

La distribución del ciclo celular de células MDA-MB-231 fue evaluada por citometría de flujo. Las células ($3 \times 10^5/\text{well}$) fueron colectadas y sembradas en placas de 6 *wells* en medio completo. Tras 24 horas el medio completo fue reemplazado por D-MEM sin suero durante 48 horas. [V^4Q^5]dDAVP fue agregado a una concentración final de 1,000 nM y 1 hora después se agregó SFB al medio de cultivo con la droga. Tras 24 horas, las células fueron tripsinizadas, suspendidas en PBS 0.1% SFB, fijadas en etanol frío 70% v/v, tratadas con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNase A (Sigma-Aldrich) y teñidas con ioduro de propidio 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por 30 minutos a 37°C protegidas de la luz. Un total de 1×10^4 eventos fueron adquiridos en un citómetro de flujo FACSCan (BD). El análisis de los resultados se realizó con el programa WinMDI 2.9 (en.bio-soft.net).

Adhesión celular

Monocapas semiconfluentes de células MCF-7 y MDA-MB-231 cultivadas en medio completo fueron exhaustivamente lavadas con PBS para eliminar restos de SFB y cosechadas por tripsinización suave (0.5X con respecto a la concentración de tripsina y EDTA antes descripta). Luego de inhibir y eliminar la tripsina y el EDTA del sobrenadante por centrifugación, las células se dejaron reposar durante 1 hora en medio de cultivo libre de SFB para que las mismas se recuperen del proceso de tripsinización y reexpresen proteínas de membrana celular que podrían haber sido afectadas. Luego de transcurrida 1 hora, las células fueron preincubados con distintas concentraciones de los análogos peptídicos durante 1 hora. Luego, la mezcla conteniendo células tumorales, medio y

análogos peptídicos fue suplementada con SFB 10% para estimular la adhesión. Rápidamente se sembraron un total de 4×10^4 células por *well* en placas de 96 *wells*. Luego de 1 hora, las células fueron lavadas cuidadosamente con PBS, fijadas con metanol, teñidas con una solución al 0.1% p/v de cristal violeta y finalmente solubilizadas en una solución al 10% metanol v/v con 5% v/v de ácido acético. El número de células fue estimado midiendo absorbancia a 570 nm. También se evaluó el efecto de la coincubación de análogos peptídicos junto al SFB. Con este objetivo, se emularon las condiciones experimentales antes descritas, donde luego de 2 horas de reposo en medio de cultivo sin SFB luego de la tripsinización, las células fueron tratadas con los péptidos junto con el estímulo de SFB.

Migración de células tumorales y endoteliales: ensayo de herida en monocapa y Transwell™

Ensayo de herida en monocapa. 3×10^5 células MDA-MB-231 y MCF-7 fueron sembradas en cada *well* de una placa de 6 *wells* y crecidas en presencia de D-MEM suplementado con 10% SFB. Cuando las células alcanzaron 95% de confluencia se realizaron tres heridas sobre la monocapa y la placa se incubó a 37°C durante 16 o 24 horas, respectivamente, en presencia de 100 y 1,000 nM de dDAVP y $[V^4Q^5]$ dDAVP. Una herida control se realizó 1 hora antes de finalizar el ensayo. Las células fueron lavadas con PBS, fijadas con una solución al 10% v/v de formalina y luego teñidas con una solución al 5% p/v de azul de toluidina. El área invadida de 10 campos aleatorios por *well* fue cuantificada usando el programa *Image J* (NIH).

Migración en Transwell™. Se utilizaron cámaras de quimiotaxis con poro de 8 μ M (GBO) para placas de 24 wells. Se crecieron células MCF-7, MDA-MB-231 y HMVEC-L por 24 horas en D-MEM, 10% de SFB y luego fueron mantenidas durante 24 horas en condiciones de baja concentración de suero. Posteriormente 2.5×10^4 , 2.5×10^5 y 1×10^5 células MDA-MB-231, MCF-7 y HMVEC-L, respectivamente, fueron sembradas en el compartimiento superior de la cámara en medio sin suplementar en presencia de los distintos análogos peptídicos (100 y 1,000 nM) mientras que en la parte inferior de la cámara se agregó SFB al 10% como quimioattractante. Luego de un período de incubación de 16-24 horas las células que atravesaron la membrana porosa fueron teñidas con cristal violeta 0.5% p/v en metanol 20% v/v y fueron cuantificadas bajo microscopio. Las células presentes en la parte superior de los filtros fueron retiradas suavemente con un hisopo de algodón. El número de células que migraron y lograron atravesar la membrana en el grupo control fue considerado como el 100%.

Citoesqueleto de actina

Para observar el efecto de los los análogos peptídicos sobre el citoesqueleto de actina de células MDA-MB-231 y MCF-7, se sembraron células sobre cubreobjetos y se privó a las células de SFB por 16 horas. Se llevó a cabo un tratamiento de 1 hora con las drogas y luego se dió un pulso de EGF usando una concentración de 10 ng/ml (Invitrogen). Posteriormente se fijaron con una solución de 10% v/v formalina, se permeabilizaron con una solución de 0.1% tritón X-100 en PBS y se tiñeron utilizando faloidina, una micotoxina del grupo de las falotoxinas, conjugada a

Alexa Fluor 555 (Molecular Probes-Invitrogen) para permitir su visualización en microscopía de fluorescencia siguiendo el protocolo del fabricante.

Los cubreobjetos fueron lavados y colocados sobre portaobjetos con 6 μ l del medio de montaje para fluorescencia con DAPI previamente descrito. Finalmente las células fueron examinadas a un aumento 1,000X utilizando el microscopio de fluorescencia.

Angiogénesis *in vitro*

La capacidad de las células endoteliales de formar una red tubular se evaluó mediante el ensayo de morfogénesis capilar sobre MatrigelTM. Las placas de 24 pocillos se recubrieron con MatrigelTM (150 μ l por pocillo) y se dejó gelificar a 37°C durante 30 minutos. Luego, se sembraron 1×10^5 células en cada pocillo y se incubaron en presencia o ausencia de los análogos sintéticos dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP durante 20 horas en la estufa de cultivo. La formación de cordones endoteliales fue fotografiada a una magnificación de 100X en un microscopio invertido de campo claro y se procedió a la cuantificación de las estructuras tubulares por campo.

Ensayos *in vivo*

Animales

Para los ensayos *in vivo*, se utilizaron ratones inmunocomprometidos atímicos hembra BALB/c Fox1^{nu/-}, de 6-12 semanas de edad y un peso de 20-25 gramos provistos por el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Para los ensayos de metástasis experimentales y espontáneas se utilizaron ratones inmunocompetentes hembras BALB/c. Los animales fueron mantenidos en jaulas de a 5-10 ratones, con temperatura y ciclos de luz-oscuridad controlados, con libre acceso al agua y alimento. Los animales inmunocomprometidos fueron mantenidos en gabinetes de aislamiento en condiciones estériles con aire filtrado (HEPA 99.99%) con acceso a agua y alimento esterilizado.

Metástasis experimentales y espontáneas en ratones inmunocompetentes

Para evaluar el efecto de dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la formación de metástasis experimentales pulmonares vía hemática, se inocularon 2 x 10⁵ células F3II viables/0.3 ml D-MEM en la vena lateral de la cola de ratones BALB/c no anestesiados. Para facilitar la inyección intravenosa, se utilizó un baño de agua tibia para sumergir la cola de los animales e inducir vasodilatación.

Para evaluar la cinética de administración de dDAVP y el impacto sobre su eficacia como agente antitumoral, dosis de 1 µg/kg de dDAVP vía

i.v. fueron administradas a las 0, 24, 48 horas o 7 días tras el desafío tumoral.

Para evaluar la dosis-dependencia del efecto antimetastásico de dDAVP, dos administraciones endovenosas utilizando dosis de 0.3, 1 o 2 µg/kg fueron realizadas, la primera coinyectada con las células tumorales y la segunda 24 horas posterior al desafío tumoral.

El efecto del ácido tranexámico sobre la diseminación metastásica fue evaluado administrando dosis de 10 mg/kg i.v. a las 0 y/o 24 horas después de la inyección endovenosa de células tumorales F3II.

Luego se estudió el efecto antimetastásico de dDAVP (1 µg/kg i.v.) coinoculada con las células tumorales en combinación al agente anticoagulante enoxaparina (1 mg/kg/día s.c. durante 7 días, comenzando 24 horas postdesafío tumoral).

Con el fin de evaluar el efecto del nuevo análogo [V^4Q^5]dDAVP sobre la colonización pulmonar experimental de células F3II en comparación al compuesto parental dDAVP se utilizaron dos dosis de 0.3 µg/kg, la primera coinyectada con las células tumorales y la segunda 24 horas posterior al desafío tumoral.

Luego de 3 semanas, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Los pulmones fueron fijados en solución de Bouin y los nódulos pulmonares superficiales fueron contados. Tras el conteo, los pulmones se lavaron y fueron fijados en formalina 10% en PBS para posterior análisis histopatológico. Los distintos diseños experimentales se visualizan en la Figura 10.

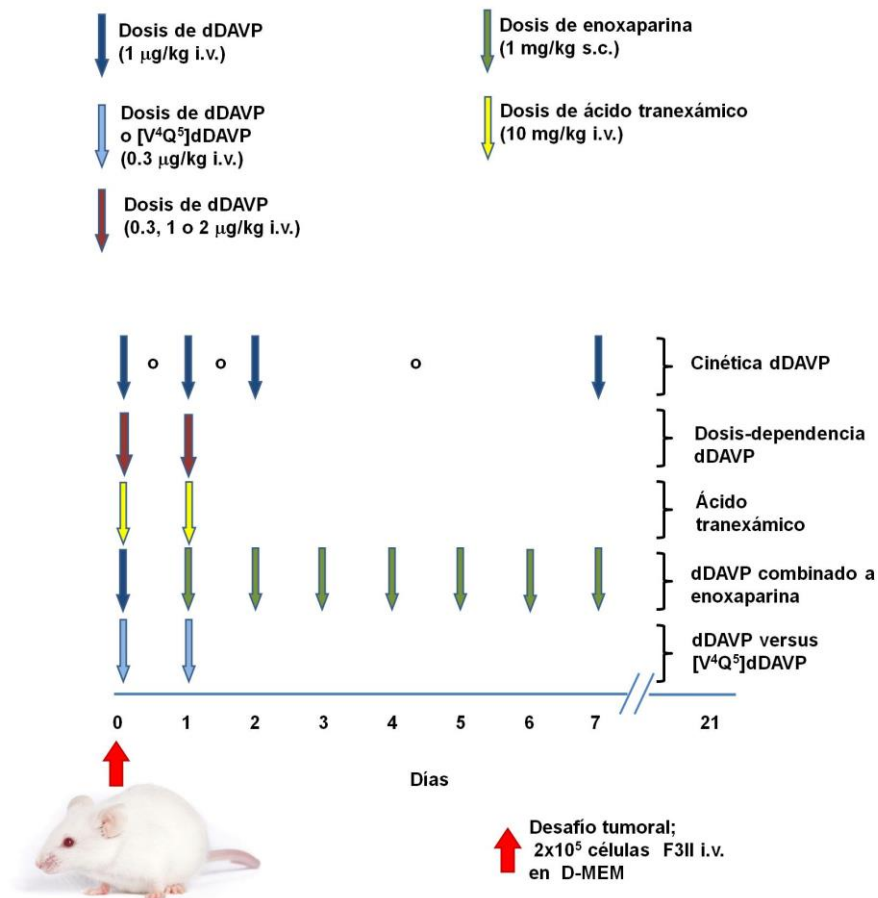


Figura 10. Diseño experimental del protocolo de metástasis experimental utilizado para evaluar el efecto *in vivo* de dDAVP (solo o en combinación con enoxaparina), ácido tranexámico o [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la diseminación vía hemática y la colonización pulmonar de células de cáncer mamario murino F3II en ratones inmunocompetentes BALB/c. El grupo control recibió solución salina en lugar de las drogas.

Para evaluar el efecto de dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la progresión metastásica espontánea de tumores F3II, se inocularon 2 x 10⁵ células F3II viables/0.3 ml D-MEM vía s.c. en el flanco derecho de ratones BALB/c (Figura 11). Luego de 7 días de latencia, los animales fueron tratados con 3 dosis semanales de 0.3 µg/kg i.v. de dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP. Luego de 7 semanas, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Los

pulmones fueron fijados en solución de Bouin y los nódulos pulmonares superficiales fueron contados como fue descripto previamente.

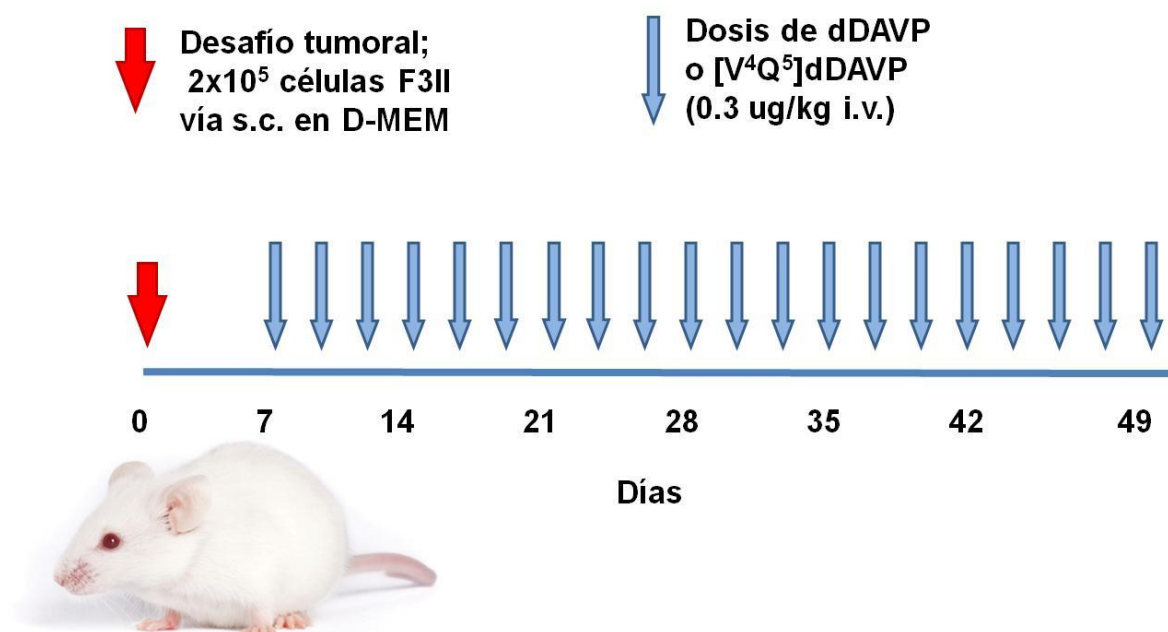


Figura 11. Diseño experimental del protocolo de progresión tumoral utilizado para evaluar el efecto *in vivo* de dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la diseminación tumoral espontánea a pulmón de tumores F3II en ratones inmunocompetentes BALB/c. El grupo control recibió solución fisiológica en lugar de las drogas.

Angiogénesis *in vivo*

Se evaluó la angiogénesis inducida por células tumorales mediante el ensayo de implante de MatrigelTM modificado. Para llevar a cabo dicho ensayo se mezclaron 500 µl de MatrigelTM en hielo con heparina (50 U/ml) y 4.5 x 10⁶ células de MDA-MB-231 en 100 µl de D-MEM. La heparina favorece la unión de distintos factores de crecimiento endotelial y sus respectivos receptores, tal como es el ejemplo de VEGF y el VEGFR [170].

La mezcla de MatrigelTM fue inoculada vía s.c. en el flanco derecho de ratones atímicos hembra BALB/c usando jeringas en hielo para evitar la polimerización del EMB. Los animales fueron sacrificados utilizando una cámara de monóxido de carbono a los 14 días postinyección. Las piezas de MatrigelTM fueron recuperadas, pesadas, fotografiadas y homogeneizadas en 300 ml de buffer de lisado RBC (por sus siglas en inglés *Red Blood Cell*). Luego su contenido de hemoglobina fue determinado mediante el kit de Drabkin (Sigma). El lote de animales tratados con los análogos sintéticos dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP recibió una dosis de 0.3 µg/kg por vía endovenosa, media hora antes de la inoculación del MatrigelTM con las células tumorales y 3 tratamientos por semana hasta el día 14 postdesafío.

Progresión tumoral de xenotransplantes en ratones inmunocomprometidos

Las células de carcinoma mamario humano MDA-MB-231 fueron cultivadas hasta semiconfluencia y cosechadas por tripsinización. Luego 5 x 10⁶ células/150 µl D-MEM se mezclaron con 150 µl de MatrigelTM (BD) para favorecer el establecimiento de los tumores [171] y fueron inoculadas en el flanco derecho de ratones atímicos por vía s.c. y se dejó progresar el tumor. Los animales fueron monitoreados mediante palpación periódica. El diámetro mayor y menor perpendicular del tumor fue medido con calibre 2 veces por semana y el volumen tumoral fue determinado mediante la fórmula: $\pi/6 \times \text{diámetro mayor} \times \text{diámetro menor}^2$. Al día 14, tras palpar los primeros focos tumorales, los animales fueron tratados con 3 dosis semanales de 0.3 µg/kg i.v. de dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP durante 4 semanas (Figura 12). Tras finalizar el protocolo los animales fueron sacrificados por

dislocación cervical. Las piezas tumorales fueron conservadas en formalina 10% en PBS para posteriores estudios histopatológicos.

En el protocolo de combinación de $[V^4Q^5]$ dDAVP y paclitaxel a partir del día 14 los animales fueron tratados con 3 dosis semanales de 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. de $[V^4Q^5]$ dDAVP combinadas o no a dosis semanales de paclitaxel de 10 mg/kg i.p. durante 6 semanas (Figura 13). Con el objetivo de evaluar sobrevida, los animales fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron el volumen de 1 cm^3 o luego de 4 meses de protocolo [172, 173].

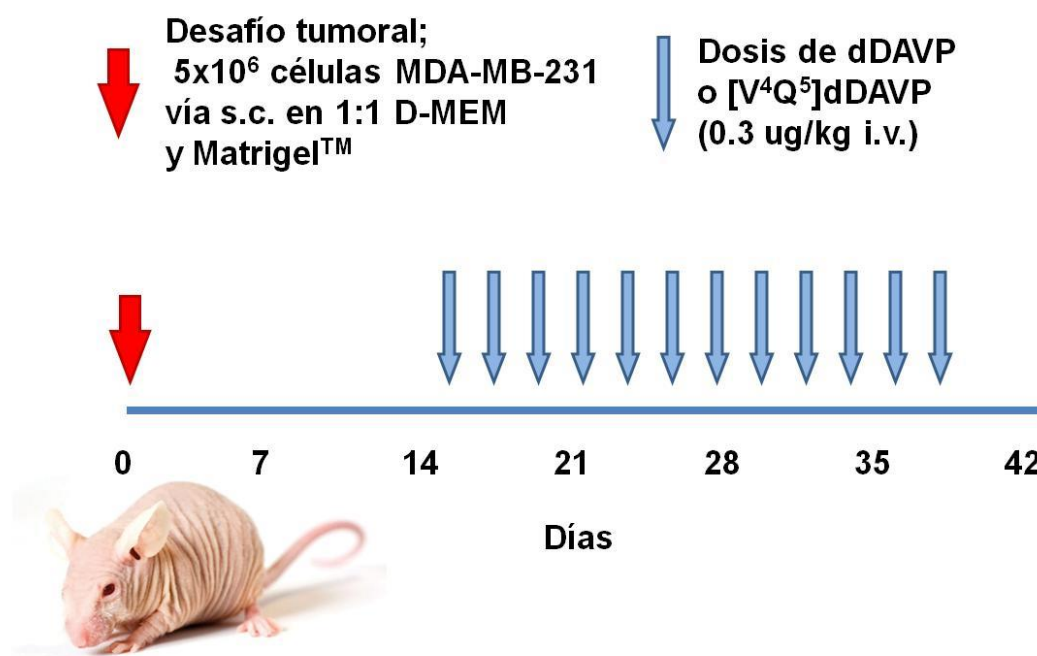


Figura 12. Diseño experimental del protocolo de progresión tumoral utilizado para evaluar el efecto *in vivo* de dDAVP o $[V^4Q^5]$ dDAVP sobre xenotransplantes de carcinoma mamario humano triple-negativo MDA-MB-231 en ratones atímicos BALB/c *nude*. El grupo control recibió solución fisiológica en lugar de las drogas.

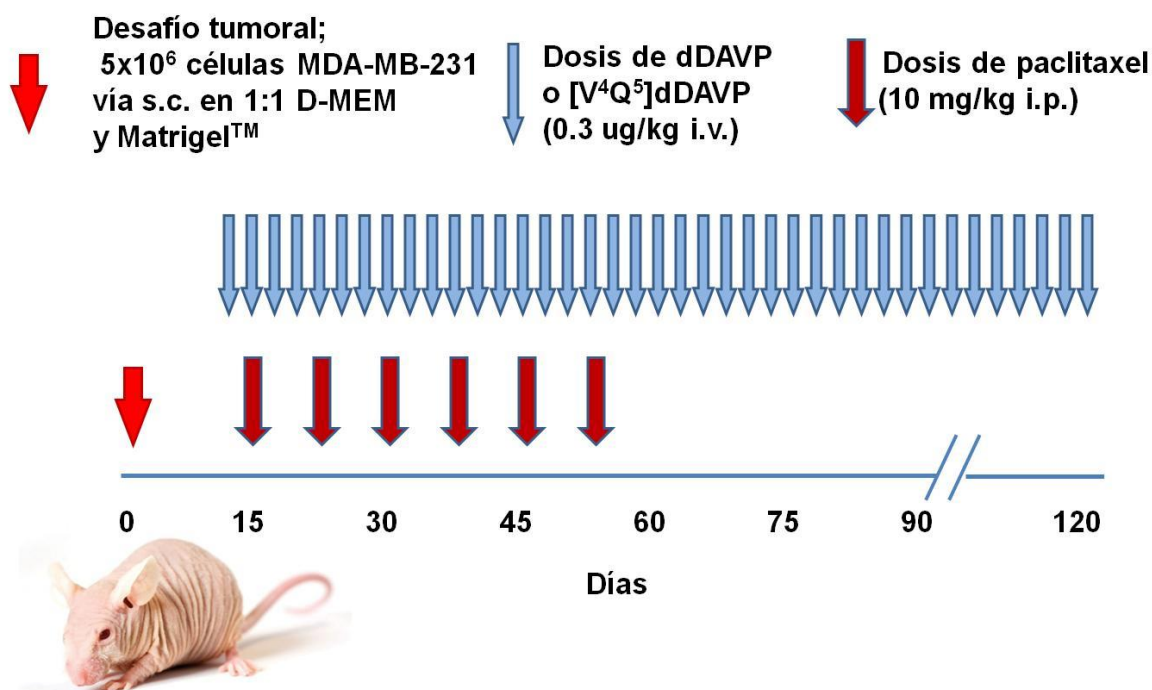


Figura 13. Diseño experimental del protocolo de progresión tumoral utilizado para evaluar el efecto *in vivo* de $[V^4Q^5]$ dDAVP combinado al citotóxico paclitaxel sobre xenotransplantes de carcinoma mamario humano triple negativo MDA-MB-231 en ratones atímicos BALB/c *nude*. El grupo control recibió solución fisiológica en lugar de las drogas.

Estudios histopatológicos

Las piezas pertenecientes a xenotransplantes de células MDA-MB-231 y pulmones colonizados por células F3II fueron fijadas en formalina 10% en PBS, y posteriormente fueron procesadas y montadas en portaobjetos cargados. Los cortes histológicos de los distintos grupos experimentales fueron teñidos mediante la técnica de hematoxilina y eosina (H&E) y evaluados por una especialista en anatomía patológica (Dra. Alejandra M. Scursoni, MN 88810 MP 225304, médica UBA, perteneciente al Laboratorio de Patología y Citología). En el caso de los xenotransplantes

se evaluó el estado de diferenciación de los tumores, grado de necrosis, ulceración e infiltración.

También se estudió la expresión del V2r en tumores pertenecientes a los distintos grupos experimentales por medio de inmunohistoquímica empleando un anticuerpo primario producido en conejo dirigido contra la región N-terminal del dominio extracelular del receptor V2r humano (Sigma) y un secundario conjugado a peroxidasa (Abcam). Brevemente, los tumores fueron desparafinados con xilol e hidratados usando concentraciones decrecientes de alcoholes. Los cortes hidratados se sometieron a un bloqueo con suero normal, y fueron incubados con el anticuerpo primario anti-V2r (dilución 1:50), seguido de una incubación durante 1 hora con el anticuerpo secundario (dilución 1:1,000). La detección de los anticuerpos unidos se realizó por medio de la incubación con diaminobenzidina (DAB) (Vector). Finalmente, se realizó una tinción nuclear de contraste con hematoxilina. A modo de control positivo fueron usados cortes histológicos pertenecientes a tumores subcutáneos de cáncer mamario humano MCF-7. También fueron utilizados como referencia tumores mamaros humanos V2r-positivos y -negativos.

Ensayos de toxicología

Los estudios de toxicología aguda fueron llevados a cabo en el Centro de Biología Experimental y Bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad Nacional del Litoral, bajo la dirección del Dr. Hugo H. Ortega. Para el ensayo se utilizaron 41 ratas Wistar y se evaluaron dosis i.v. de 1, 10 y 100 µg/kg de dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP. Los animales pertenecientes al grupo control recibieron el vehículo salino. Se llevó a cabo una evaluación clínica completa de los animales incluyendo, ritmo cardíaco y respiratorio, sistema nervioso, actividad motriz, parámetros bioquímicos y

hematológicos. También fue monitoreado el peso corporal, el consumo de alimento y agua.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando los programas GraphPad Prism 6, versión 6.01 (GraphPad Prism Software, La Jolla, CA, Estados Unidos). Si los datos poseían distribución paramétrica se utilizó el test ANOVA contrastado con Tukey para el análisis. En el caso que la distribución de los datos no fuese paramétrica se utilizó el test Kruskal-Wallis contrastado con Dunn's. La sobrevida animal fue evaluada mediante el estimador Kaplan-meier y analizada por el *test* Log-rank (Mantel Cox), en donde $X^2 > 7.2$. En los protocolos de progresión tumoral las tasas de crecimiento representan las pendientes de las regresiones lineales de los volúmenes tumorales en función del tiempo. La IC_{50} se determinó tras generar una regresión lineal del porcentaje de proliferación celular o crecimiento clonogénico en función de la concentración de péptido o quimioterápico ensayado e interpolar el valor en la curva generada. Los resultados son expresados como promedios $\pm$ SD o SEM, a menos que se aclare lo contrario. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$.

Resultados

Capítulo I

Efectos sobre la colonización metastásica pulmonar de distintos esquemas de administración de análogos de vasopresina

La diseminación metastásica implica varios procesos secuenciales que una célula tumoral debe concretar exitosamente para alcanzar y luego desarrollarse en un órgano distante. Para formar un tumor secundario, las células agresivas del tumor primario deben ser capaces de inducir la formación de una red vascular, no solo para obtener nutrientes y oxígeno, sino también para ganar una vía de escape hacia órganos distantes. Una vez arrestadas en el tejido blanco, las células tumorales metastásicas deben adherirse a las paredes de la microvasculatura, extravasarse y crecer en el nuevo órgano colonizado [174].

Un paso crítico de la cascada metastásica es el tránsito por el torrente sanguíneo, donde las células tumorales se encuentran vulnerables a la destrucción por el sistema inmune así como también a un gran *stress* mecánico ejercido por el flujo sanguíneo y todos los componentes de la sangre. La agregación celular y la embolización en coágulos ricos en fibrina, le ofrecen a las células tumorales un mecanismo de protección durante su paso por la circulación.

Como se describió detalladamente en la Introducción, la desmopresina es un derivado de la hormona antidiurética vasopresina con propiedades hemostáticas y profibrinolíticas [125]. Al actuar sobre el V2r presente en el endotelio vascular produce la liberación de diversos actores de la hemostasia y del sistema fibrinolítico, incluyendo el FVW y el tPA, respectivamente.

El tPA es una enzima catalítica para la conversión de plasminógeno a plasmina, una de las principales enzimas encargadas de la desintegración de los coágulos de fibrinas. Por otro lado, Terraube y col. demostraron que FVW ejerce un rol protector contra la diseminación de células tumorales en modelos murinos [145]. En nuestro laboratorio, se logró demostrar por primera vez que dDAVP era capaz de disminuir la capacidad metastásica de células de cáncer mamario murino. La administración endovenosa de dDAVP redujo la colonización pulmonar experimental de células cancerosas mamarias altamente agresivas e inhibió drásticamente la diseminación locorregional y a distancia en un modelo de manipulación y remoción quirúrgica de cáncer mamario murino [146]. Recientemente nuestro grupo también reportó que la dDAVP induce un efecto antiangiogénico asociado a la producción de angiostatina por parte de las células tumorales [142].

Teniendo en cuenta sus múltiples efectos sobre la hemostasia y la progresión tumoral, dDAVP se postuló como un compuesto líder prometedor para el desarrollo de nuevos análogos peptídicos con actividad biológica aumentada.

El objetivo central del presente capítulo fue profundizar el estudio sobre la eficacia antimetastásica de dDAVP y explorar el efecto antitumoral del nuevo péptido derivatizado de desmopresina [V⁴Q⁵]dDAVP. En primera instancia se evaluó la cinética de administración y dosis-dependencia del péptido parental de referencia dDAVP sobre su efecto antimetastático. Luego de explorar una potencial asociación del efecto antitumoral de dDAVP con la hemostasia, se evaluó la eficacia del nuevo derivado sintético [V⁴Q⁵]dDAVP en comparación con el análogo parental. Finalmente se exploró la capacidad del análogo peptídico mejorado [V⁴Q⁵]dDAVP de

modular la progresión metastásica espontánea en un modelo murino singénico de cáncer mamario.

Efecto citostático de dDAVP sobre células de carcinoma mamario F3II V2r-positivas

El análogo peptídico dDAVP es un agonista selectivo del receptor V2r. Como se ha mencionado previamente, este tipo de receptor, además de expresarse en tejido renal y vascular [125], es expresado por diversos cánceres humanos, incluyendo carcinoma colorrectal y mamario, y ciertas variantes de cáncer pulmonar [128, 131, 142, 152]. Las respuestas celulares de los análogos de vasopresina estudiados en el presente trabajo estarían mediados por la interacción entre el V2r presente en las células tumorales y vasculares, y dichos ligandos peptídicos. Es por eso que en primera instancia evaluamos la expresión del receptor de vasopresina tipo 2 en células de cáncer mamario murino hormono-independiente F3II. Dicha línea celular se utilizó a lo largo del Capítulo I como un modelo agresivo de diseminación metastásica. En la Figura I. 1. A se observa la detección del V2r en células de carcinoma mamario F3II mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo dirigido a una región del receptor altamente conservada entre especies. Las células tumorales F3II mostraron una intensa marcación fluorescente similar al patrón de expresión observado en las células MCF-7 utilizadas como control positivo [128], confirmando que la línea F3II es positiva para la expresión de V2r.

Luego de evaluar la presencia del blanco en las células tumorales, y previo a comenzar con los estudios *in vivo*, se evaluó la sensibilidad *in vitro* al tratamiento con dDAVP por parte de las células F3II. Con esta finalidad, se exploró la capacidad de dDAVP de modular la formación y el crecimiento

de colonias de células F3II en dos dimensiones. El ensayo de crecimiento clonogénico se basa en células que, luego de adherirse a sustrato, deben sobrevivir al tratamiento al cual se las han expuesto, y proliferar hasta formar colonias [175]. En este ensayo, células F3II fueron sembradas a baja densidad en placas de cultivo de 24 *wells* e incubadas durante 7 días en concentraciones crecientes del compuesto peptídico (100-1,500 nM). El medio de cultivo completo junto con la droga fue renovado a las 72 horas. Luego de finalizado el protocolo, la cuantificación de colonias reveló una reducción estadísticamente significativa en todas las concentraciones de dDAVP sobre la capacidad clonogénica de las células tumorales (Figura I. 1. B). Como se observa en las microfotografías mostradas en la Figura I.1.C, el tratamiento durante 7 días a una alta concentración de dDAVP inhibió el 60% de la formación de colonias de células F3II. Tras analizar las respuestas celulares a las diversas concentraciones de dDAVP se obtuvo un valor de IC_{50} de 700 nM calculado mediante regresión lineal.

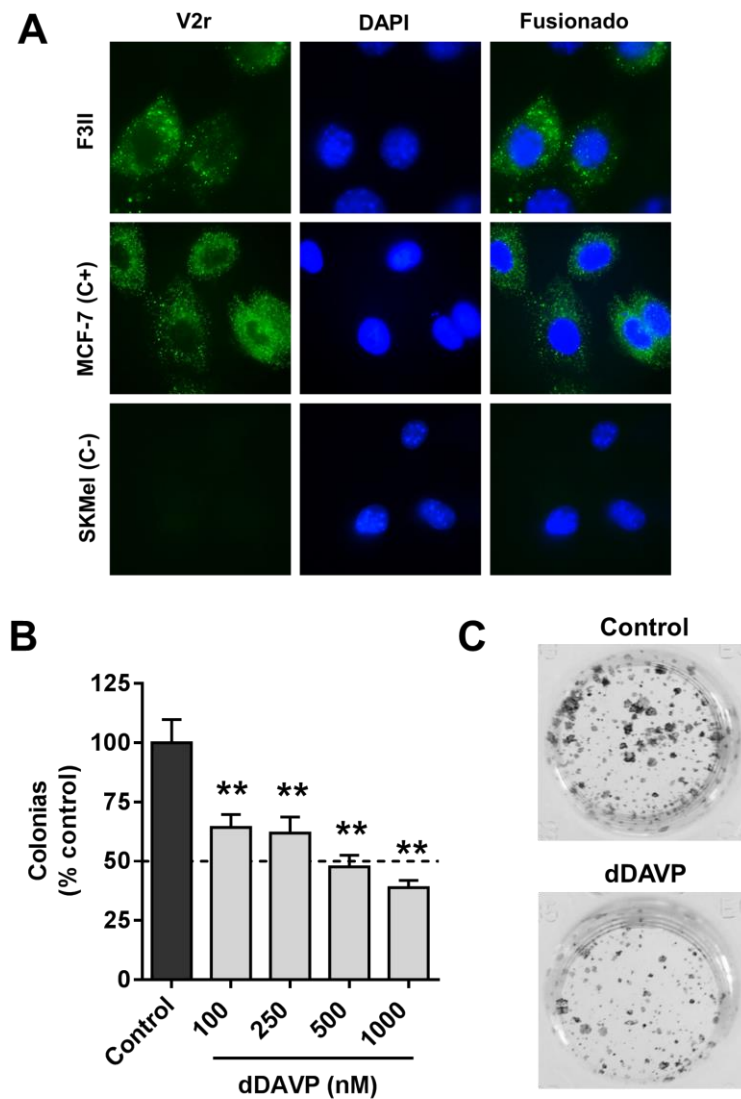


Figura I. 1. Efecto citostático de dDAVP sobre células de carcinoma mamario F3II V2r-positivas. (A) detección del receptor de V2r en células F3II mediante inmunofluorescencia. La presencia del receptor fue determinada empleando un anticuerpo primario dirigido contra V2r y un anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína. Los núcleos fueron marcados con DAPI. La línea de carcinoma mamario humano MCF-7 fue utilizada como control positivo (C+). La línea de melanoma humano SKMel fue usada como control negativo (C-). Aumento 1,000X. (B) inhibición de dDAVP sobre la formación de colonias. Células F3II fueron sembradas en placas de 24 pocillos e incubadas durante 7 días en concentraciones crecientes de dDAVP (100-1,500 nM). (C) microfotografías representativas del efecto de dDAVP (1,000 nM) sobre cultivos clonogénicos de F3II tras 7 días de tratamiento. Las colonias fueron fijadas con formalina y teñidas con cristal violeta. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM. Resultados representativos de al menos 3 ensayos independientes. **, $P < 0.01$; *versus* control. ANOVA contrastado con Tukey.

Dicho efecto antitumoral *in vitro* confirma los resultados reportados por Ripoll *et al.*, en donde la incubación con concentraciones en el rango micromolar bajo de dDAVP logró modular la proliferación de cultivos celulares de carcinoma mamario murino creciendo en fase exponencial [143].

Cinética de administración de dDAVP y su efecto sobre la eficacia antimetastásica

Las metástasis son responsables del 90% de las muertes vinculadas al cáncer [176, 177]. Particularmente en pacientes con cáncer mamario hormono-independiente, la recidiva metastásica usualmente ocurre en el pulmón y se le atribuye el desenlace fatal de la enfermedad [178].

En primer lugar, para darle continuidad a trabajos previamente publicados por nuestro grupo [143, 146, 147], se exploró la eficacia de dDAVP como agente antimetastásico utilizando distintos esquemas temporales de administración. Para abordar dicho objetivo, se utilizó un ensayo de colonización pulmonar experimental con células de carcinoma mamario murino hormono-independiente F3II. Como se mencionó previamente, dichas células presentan un fenotipo altamente agresivo y metastásico, siendo capaces de generar múltiples lesiones macroscópicas en pulmón, luego de 3 semanas de inoculadas vía endovenosa en ratones inmunocompetentes BALB/c.

En primer lugar se evaluó el efecto de una dosis clínicamente relevante de dDAVP (1 µg/kg) administrada i.v. a distintos tiempos desde la inoculación de células tumorales. Los esquemas temporales usados incluyeron; tiempo 0 (coinyectada con las células tumorales), 24, 48 horas y

7 días post-desafío tumoral. Luego de 21 días contados desde la inyección endovenosa de células F3II, los animales fueron sacrificados y los nódulos pulmonares fueron cuantificados.

El tratamiento con dDAVP disminuyó en un 62% y 50% la formación de nódulos pulmonares al ser coinyectada con las células tumorales (0 horas) o 24 horas después, respectivamente (Figura I. 2. A). La administración i.v. de dDAVP a las 48 horas o a los 7 días postdesafío tumoral no tuvo incidencia en el número final de metástasis pulmonares. En la Figura I. 2. B se observan secciones histológicas representativas de pulmones extraídos de animales pertenecientes a los distintos grupos experimentales teñidos mediante H&E. En los pulmones pertenecientes a animales tratados con vehículo salino (control) se visualizan múltiples nódulos subpleurales (localizados por debajo de la membrana que recubre los pulmones) e intrapulmonares, mientras que en los pulmones de ratones tratados tempranamente con dDAVP (0 o 24 horas postdesafío) se evidencian escasos nódulos periféricos.

Estos resultados indicarían que la administración de dDAVP en etapas tempranas de la diseminación tumoral resulta indispensable para maximizar su accionar antimetastásico.

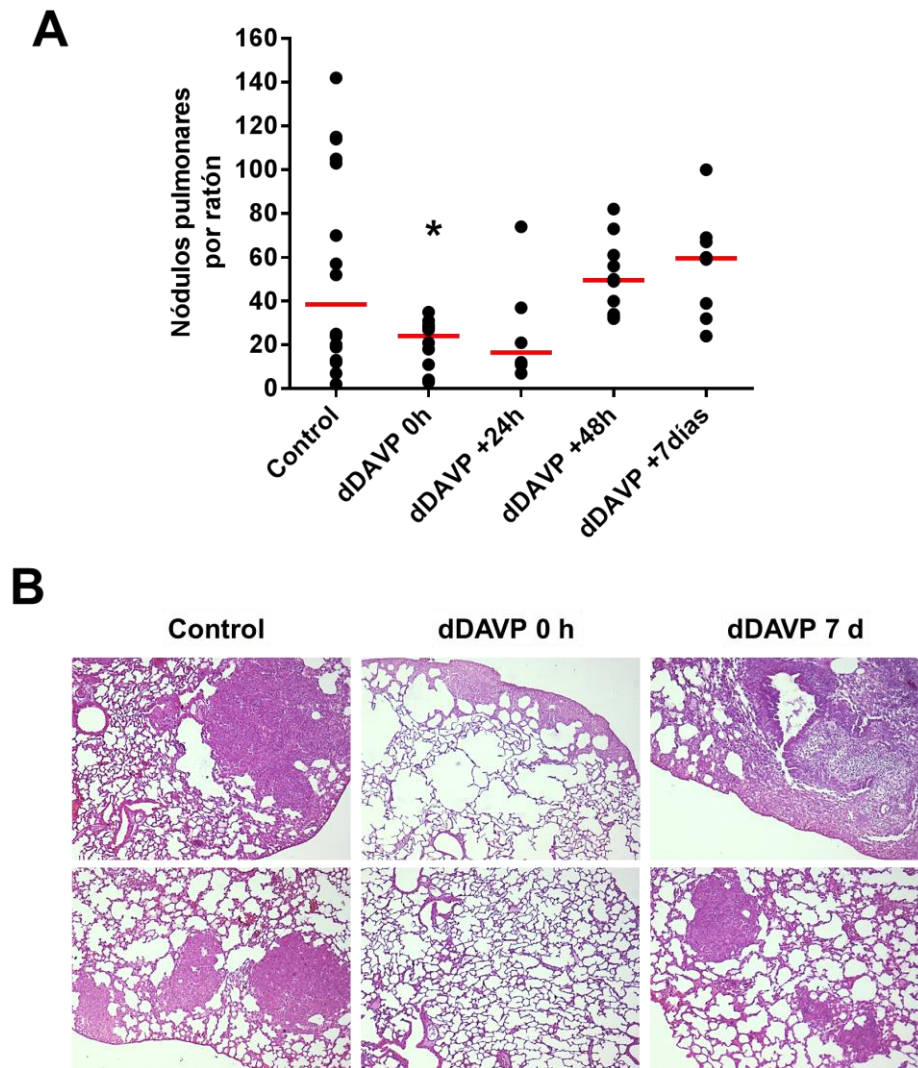


Figura I. 2. Cinética de administración de dDAVP y el impacto sobre su eficacia como agente antitumoral. (A) se inocularon 2×10^5 células F3II en la vena lateral de la cola de ratones BALB/c, y luego de 21 días los nódulos pulmonares metastásicos fueron cuantificados. Dosis de $1 \mu\text{g/kg}$ de dDAVP fueron administradas a tiempo 0, 24, 48 horas o 7 días tras el desafío tumoral. Los animales pertenecientes al grupo control recibieron el vehículo salino. (B) microfotografías representativas de pulmones pertenecientes a ratones del grupo control (vehículo salino) o ratones tratados con dDAVP ($1 \mu\text{g/kg}$) endovenosa a tiempo 0 (dDAVP 0h) o luego de 7 días (dDAVP 7d) tras la inoculación i.v. de células F3II. Tinción con hematoxilina y eosina, aumento 40X. Al menos 8 animales por grupo experimental. Los datos son expresados como medianas con valores ploteados. *, $P < 0.05$ versus control. Kruskal-Wallis contrastado con Dunn's.

Dosis-dependencia de dDAVP sobre la colonización metastásica experimental

A continuación se evaluó la dosis-dependencia del efecto antitumoral de la dDAVP utilizando el mismo modelo experimental de diseminación experimental evaluando dosis entre 0.3 y 2 $\mu\text{g/kg}$ vía i.v. Tomando en cuenta los resultados de la cinética de actividad de dDAVP, los animales recibieron dos dosis i.v., la primera coinoculada junto con las células tumorales y la segunda 24 horas después. El propósito de este tratamiento fue, no sólo actuar sobre las células tumorales que están en circulación hemática, sino también sobre aquellas células tumorales que han sobrevivido al tránsito en el sistema circulatorio y han logrado instalarse en el nicho metastásico.

La formación de nódulos tumorales pulmonares se vió drásticamente reducida con todos los tratamientos de dDAVP en las dosis endovenosas utilizadas (Tabla I. 1). Se evidenció una clara dosis-dependencia en el rango de 0.3 a 2 $\mu\text{g/kg}$ i.v., con una meseta en el efecto antimetastásico entre 1 y 2 $\mu\text{g/kg}$ llegando a una inhibición de la colonización pulmonar cercana al 70%. La administración subcutánea de dosis equivalentes no produjo ningún efecto sobre el número de nódulos pulmonares (datos no mostrados) [179].

Tabla I. 1. Dosis-dependencia del efecto del análogo parental dDAVP sobre la colonización metastásica experimental en pulmón de células F3II.

Tratamiento^a	Reducción porcentual de los nódulos pulmonares^b
dDAVP 0.3 µg/kg	32%*
dDAVP 1 µg/kg	64%**
dDAVP 2 µg/kg	70%**

Los ratones fueron inoculados con 2×10^5 células F3II en la vena lateral de la cola y sacrificados 3 semanas después. ^a Dos administraciones endovenosas de dDAVP fueron realizadas para ensayar cada dosis, la primera coinjectada con las células tumorales y la segunda 24 horas posterior al desafío tumoral. ^b Los nódulos pulmonares fueron cuantificados usando un microscopio de disección y se calculó las reducciones porcentuales sobre los promedios de los grupos experimentales versus el grupo control. Al menos 7-8 animales por grupo experimental. *, $P < 0.05$ y **, $P < 0.01$ versus control. ANOVA contrastado con Tukey.

Efecto del ácido tranexámico y la enoxaparina sobre la diseminación metastásica

Con el objetivo de explorar el rol directo de mecanismos hemostáticos en la actividad antimetastásica de dDAVP, se evaluaron drogas hemostáticas y anticoagulantes utilizando el modelo de metástasis experimental previamente descripto.

El ácido tranexámico es un inhibidor de la activación del plasminógeno con actividad antifibrinolítica inespecífica y retarda la disolución fisiológica de los coágulos sanguíneos.

Considerando sus propiedades sobre la hemostasia y el sistema fibrinolítico, se evaluó el potencial efecto antimetastásico del ácido tranexámico. La administración de 10 mg/kg i.v a las 0 y 24 horas después de la inyección endovenosa de células tumorales no afectó el número de nódulos pulmonares metastásicos con respecto al grupo control (Figura I. 3. A).

Las heparinas de bajo peso molecular se obtienen de la despolimerización de la heparina convencional, forman parte del arsenal terapéutico anticoagulante y se utilizan ampliamente con finalidad terapéutica o profiláctica de procesos tromboembólicos tales como cirugías.

Con el objetivo de explorar si el accionar de dDAVP se ve afectado por la inhibición de la coagulación, se evaluó el efecto antimetastásico del péptido en un protocolo combinado a enoxaparina, un derivado de bajo peso molecular de la heparina. Tanto el tratamiento individual de dDAVP (1 µg/kg) como el combinado con enoxaparina (1 mg/kg/día s.c. durante 7 días) disminuyeron en un 60% la colonización pulmonar de células tumorales. El tratamiento individual de enoxaparina no mostró ningún efecto significativo sobre las metástasis experimentales, al menos bajo las condiciones experimentales evaluadas (Figura I. 3. B).

Luego de analizar estos resultados podemos afirmar que el efecto antimetastásico de dDAVP no pudo ser reproducido por otro agente hemostático y tampoco fue afectado por el tratamiento concomitante con el anticoagulante enoxaheparina.

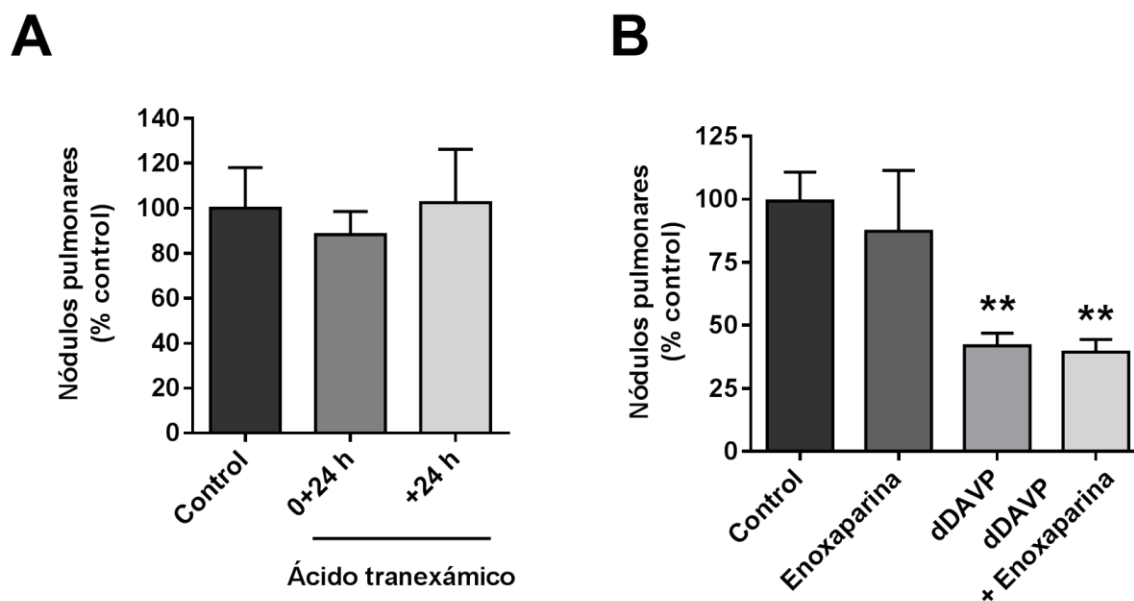


Figura I. 3. Efecto del ácido tranexámico y del agente anticoagulante enoxaparina sobre la diseminación metastásica. (A) se evaluó el potencial efecto antimetastásico del ácido tranexámico. El tratamiento consistió en la administración de 10 mg/kg i.v. a las 0 y/o 24 horas después de la inyección endovenosa de células tumorales F3II. (B) se evaluó el efecto antimetastásico de dDAVP (1 µg/kg i.v.) coinoculada con las células tumorales en combinación a enoxaparina (1 mg/kg/día s.c. durante 7 días). Los datos son expresados como promedio ± SEM y son la suma de dos experimentos individuales. 9-10 animales por grupo experimental. **: P<0.01 versus control. ANOVA contrastado con Tukey.

Derivatización de un nuevo análogo peptídico a partir de dDAVP

Como fue descripto en la Introducción, el nuevo análogo [V⁴Q⁵]dDAVP fue seleccionado a partir de un panel de péptidos derivatizados de dDAVP con distintas modificaciones en su secuencia y estructura, principalmente dirigidas hacia el ciclo conformacional ubicado en el extremo N-terminal de la molécula. Esta búsqueda de agonistas

selectivos de V2r con mayor actividad biológica incluyó isómeros quirales, variantes tetrapeptídicas y nonapéptidos de longitud completa [157]. Particularmente $[V^4Q^5]dDAVP$ se destacó por su actividad citostática y angiostática aumentada, en comparación con el análogo parental dDAVP, y otros péptidos evaluados [157, 161, 162].

Evaluación de la toxicidad aguda de $[V^4Q^5]dDAVP$ en ratas Wistar

Previo a evaluar el desempeño antitumoral del nuevo análogo peptídico $[V^4Q^5]dDAVP$ en modelos animales, se llevó a cabo un ensayo de toxicidad aguda en ratas Wistar con el objetivo de explorar los posibles efectos adversos del uso del compuesto. Con esta finalidad, se condujo una evaluación clínica completa de los animales incluyendo, ritmo cardíaco y respiratorio, sistema nervioso, actividad motriz, parámetros bioquímicos y hematológicos.

Estos estudios revelaron que la administración vía i.v. de $[V^4Q^5]dDAVP$ utilizando dosis de 1, 10 y 100 $\mu\text{g/kg}$ no tuvo incidencia sobre signos generales, peso corporal, consumo de agua y alimento de los animales analizados (Tabla I. 2). Aumentos leves y transitorios de glicemia y bilirrubina fueron observados en los grupos tratados. El resto de los parámetros bioquímicos y hematológicos no fueron alterados de manera significativa. dDAVP fue administrado como estándar de referencia, mostrando un perfil de seguridad consistente con trabajos previamente publicados [142, 148]. Estas observaciones sugieren que inyecciones únicas de $[V^4Q^5]dDAVP$ son seguras usando dosis hasta 300 veces superiores a las requeridas para obtener los efectos antiangiogénicos/antimetastásicos.

Tabla I. 2. Ensayo de toxicología aguda en ratas Wistar evaluando la administración de dosis intravenosas únicas de 1, 10 o 100 µg/kg de dDAVP o el nuevo análogo [V⁴Q⁵]dDAVP.

Parámetros ^a	Grupos experimentales						
	Control	dDAVP 1 µg/kg	dDAVP 10 µg/kg	dDAVP 100 µg/kg	[V ⁴ Q ⁵]dDAVP 1 µg/kg	[V ⁴ Q ⁵]dDAVP 10 µg/kg	[V ⁴ Q ⁵]dDAVP 100 µg/kg
Peso ^b (g)	218.3±8.7	234.2±8.1	240.3±9.4	241.8±16.8	225.4±16.8	226.0±10.9	225.8±6.1
Hematocrito ^c (%)	39.3±4.0	40.4±2.3	40.5±2.7	41.8±3.4	40.0±1.6	41.0±2.2	41.2±1.7
GR (10 ⁶ /ml)	5.1±0.5	5.2±0.3	5.5±0.3	5.7±0.3	5.6±0.2	5.4±0.5	5.5±0.2
GB (10 ³ /ml)	4.8±0.4	4.8±0.3	4.4±0.5	4.1±0.7	4.2±0.2	4.5±0.3	4.7±0.7
Fibrinógeno ^c (mg/dl)	198.3±44.8	221.0±67.8	226.7±48.4	243.0±63.1	206.0±56.7	210.0±41.8	179.5±45.7
Proteína total ^c (g/dl)	7.3±0.6	6.6±0.8	6.9±0.5	7.0±0.5	6.9±0.5	6.7±0.6	6.9±0.5
Bilirrubina directa (mg/dl)	0.08±0.02	0.13±0.04	0.14±0.02*	0.17±0.03*	0.11±0.01*	0.12±0.02*	0.16±0.05*
Glucosa (mg/dl)	179.9±4.1	207.0±25.7*	218.8±20.0*	230.7±12.1*	217.7±13.9*	221.1±19.7*	230.2±12.1*
Creatinina (mg/ml)	0.69±0.27	0.70±0.16	0.65±0.08	0.70±0.09	0.58±0.03	0.64±0.07	0.61±0.05
GGT (IU/l)	2.7±0.6	2.8±0.8	2.6±0.9	3.0±1.2	2.8±0.8	3.2±1.1	3.6±0.9
AST (IU/l)	34.7±6.4	36.6±11.6	30.0±5.6	47.5±17.8	39.2±6.7	51.2±30.6	46.6±20.1
ALT (IU/l)	19.0±1.0	22.8±3.4	22.6±3.4	21.3±2.1	20.6±2.7	19.6±3.1	20.4±3.1

^a Los parámetros toxicológicos fueron medidos 72 horas luego de la administración intravenosa de las drogas. ^b El peso corporal también fue monitoreado a las 24 y 48 horas posterior a las inoculaciones. ^c Para las cuantificaciones de hematocrito, fibrinógeno o proteína total las muestras de sangre también fueron analizadas luego de 1, 3, 6, 10 y 24 horas de la administración de las drogas, en las cuales no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (datos no mostrados). Abreviaturas: GR = glóbulos rojos, GB = glóbulos blancos, GGT= gamma-glutamyl transpeptidasa, AST = aspartato aminotransferasa, ALT = alanina aminotransferasa. Valores expresados como promedio ± SD. *, P<0.05. ANOVA contrastado con Tukey. 5-6 animales por grupo experimental.

Efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la colonización pulmonar experimental

Luego de determinar el esquema más óptimo de tratamiento utilizando la droga de referencia dDAVP y explorar el perfil de seguridad en modelos murinos, se evaluó el efecto antimetastásico del nuevo análogo [V⁴Q⁵]dDAVP. Se utilizó el mismo modelo experimental de colonización

pulmonar con células F3II ensayando dosis de los análogos peptídicos de 0.3 µg/kg vía i.v., a 0 y 24 horas postinoculación endovenosa de células tumorales. La dosis seleccionada corresponde a una dosis subóptima del análogo parental dDAVP, donde todavía el efecto antimetastásico no ha llegado a un *plateau* y es factible detectar una eficacia exacerbada.

La formación de nódulos tumorales pulmonares se vio drásticamente reducida con ambos tratamientos. Sin embargo, mientras que dDAVP logró una inhibición en el rango del 30-40%, el nuevo análogo [V⁴Q⁵]dDAVP logró mejorar el desempeño de su análogo parental y reducir la colonización un 62% con respecto al grupo control (Figura I. 4. A). Las lesiones metastásicas fueron clasificadas según diámetro utilizando una lupa de disección y una grilla milimetrada como referencia. Notablemente [V⁴Q⁵]dDAVP desplegó una eficacia antitumoral semejante sobre macronódulos mayores a 2 mm (Figura I. 4. B).

El peso de los pulmones que han sido blancos de múltiples metástasis suele aportar información valiosa sobre el grado de colonización metastásica que han sufrido. Es común que, a pesar de lograr visualizar y contabilizar los nódulos sobre el exterior de los lóbulos pulmonares, no se logre evaluar la real profundidad y tamaño de las lesiones pulmonares. Como se observa en la Figura I. 4. D, tras analizar los pesos pulmonares de los distintos grupos, solo el tratamiento con [V⁴Q⁵]dDAVP logró una reducción del peso con un valor cercano a pulmones sanos de ratones BALB/c reportados en bibliografía [180].

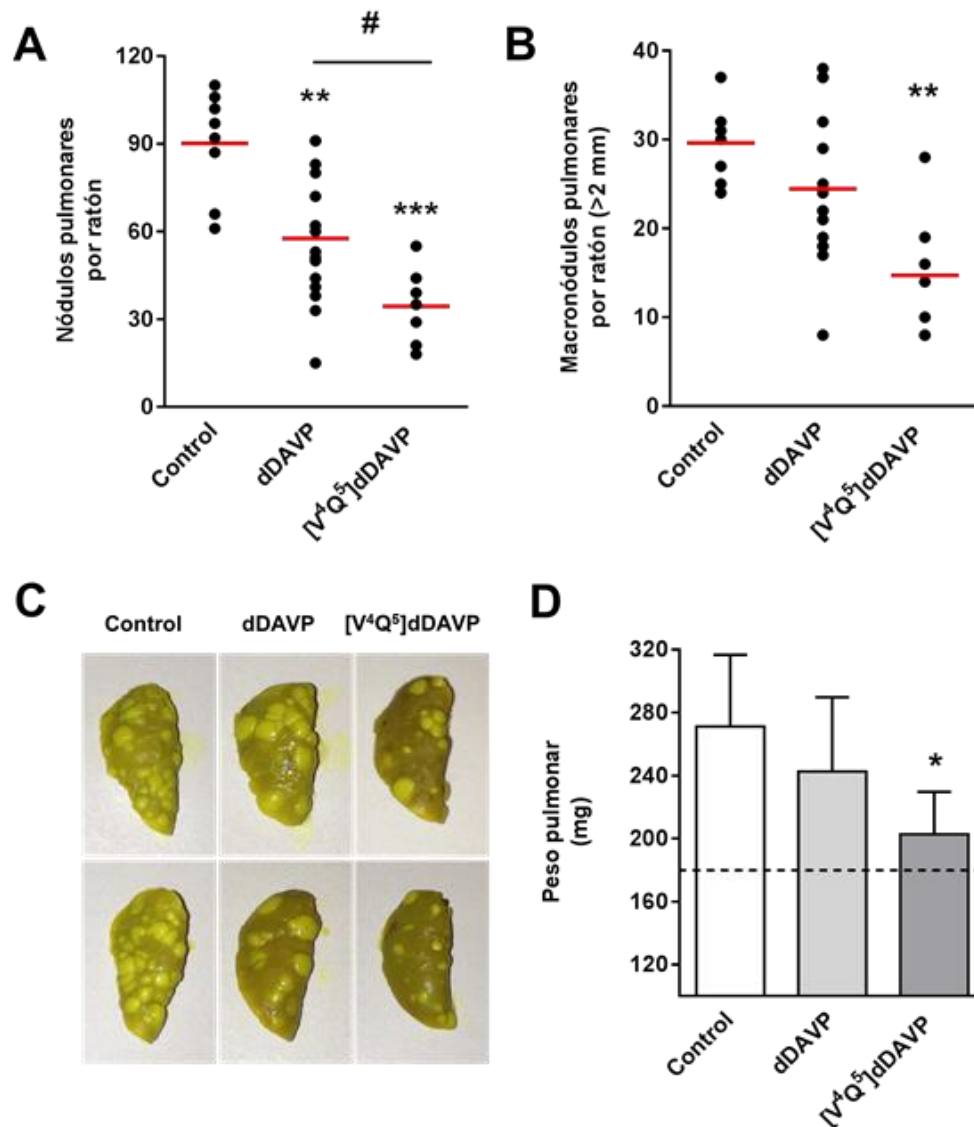


Figura I. 4. Efecto del nuevo análogo [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la colonización pulmonar experimental de células F3II en comparación al compuesto parental dDAVP. Los animales fueron tratados con 2 dosis de dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP (0.3 µg/kg i.v.), a las 0 y 24 horas después de la inyección endovenosa de células tumorales. (A) número de nódulos pulmonares metastásicos por ratón. (B) número de macronódulos pulmonares metastásicos con un diámetro mayor a 2 mm por ratón. (C) fotografías representativas de lóbulos pulmonares de animales pertenecientes a los distintos grupos experimentales. (D) promedio de pesos pulmonares. La línea punteada representa el peso pulmonar promedio de ratones BALB/c sanos reportado por Han *et al.*, 2009. Datos expresados como valores ploteados y promedio (nódulos pulmonares) o promedio ± SD (peso pulmonar). 7-8 animales por grupo experimental. **, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001 versus control. #, P<0.05 dDAVP versus [V⁴Q⁵]dDAVP. ANOVA contrastado con Tukey.

Estos resultados indican que $[V^4Q^5]dDAVP$ inhibe drásticamente la colonización metastásica pulmonar, reduciendo el número y tamaño de las lesiones pulmonares, desplegando una eficacia antitumoral aumentada con respecto al péptido dDAVP.

Efecto de $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre la progresión metastásica espontánea

Además de las características intrínsecas de las células tumorales, se ha propuesto que el microambiente tumoral juega un rol clave en la supervivencia y en la progresión hacia la diseminación metastásica. De hecho, el microambiente podría promover un proceso que de por sí es altamente ineficiente, por medio de la intervención de distintas células del estroma tumoral metastásico incluyendo células microvasculares, fibroblastos activados y células del sistema inmune. Se ha mencionado en la Introducción la participación que posee el tumor primario en el condicionamiento del nicho premetastásico y en el continuo diálogo que establece a distancia con los focos tumorales secundarios [49].

Si bien el modelo de metástasis experimental es una herramienta valiosa para evaluar etapas de la progresión metastásica específicas como es el tránsito sanguíneo y anidación de las células tumorales en el órgano diana, este ensayo falla en reproducir la totalidad de los pasos de la cascada metastásica observados en un escenario clínico.

Teniendo esto en cuenta, para continuar la evaluación de la eficacia antimetastásica de $[V^4Q^5]dDAVP$ en un contexto experimental con mayor relevancia clínica, se desarrolló un protocolo de progresión metastásica espontánea a partir de tumores de cáncer mamario F3II (Figura I. 5).

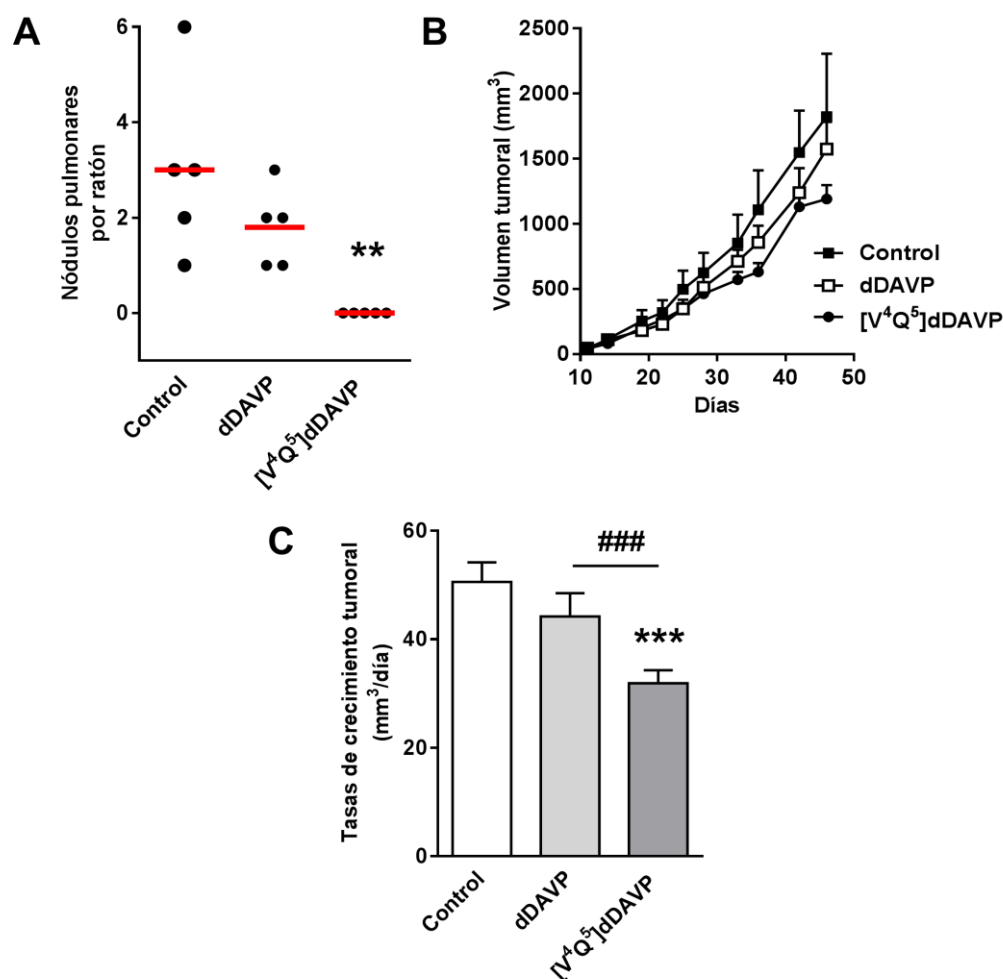


Figura I. 5. Efecto del nuevo análogo [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la progresión tumoral metastásica espontánea en comparación al compuesto parental dDAVP. Para evaluar el efecto sobre la progresión metastásica espontánea de tumores subcutáneos F3II generados en ratones BALB/c, los animales fueron tratados con 3 dosis semanales de 0.3 µg/kg i.v. de dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP durante 7 semanas. (A) en el gráfico se observa el número de nódulos pulmonares metastásicos por ratón al finalizar el protocolo. (B) la curva muestra los volúmenes promedio de los tumores F3II creciendo en los flancos subcutáneos de animales pertenecientes a los distintos grupos experimentales. (C) tasas de crecimiento tumoral promedio de los distintos grupos experimentales a partir del día 11 en adelante. Datos expresados como valores ploteados y promedio o promedio ± SD. 5 animales por grupo experimental. **, P<0.01 versus control; ***, P<0.001 versus control, ###, P<0.001 [V⁴Q⁵]dDAVP versus dDAVP. ANOVA contrastado con Tukey.

Para la generación de los tumores primarios, ratones BALB/c fueron inoculados en el flanco vía subcutánea con células F3II. Luego se monitoreó la progresión del tumor y finalmente la formación de metástasis espontáneas en pulmón. Los animales tratados con los análogos dDAVP o $[V^4Q^5]$ dDAVP recibieron 3 dosis semanales de 0.3 μ g/kg por vía endovenosa durante 6 semanas.

A día 49 del protocolo de los animales fueron sacrificados, y posterior a la extracción y fijación de los pulmones en solución Bouin, se realizó el recuento de metástasis espontáneas a pulmón. Sólo las células con un fenotipo apto para escapar del tumor primario, sobrevivir a los desafíos de la diseminación hemática y finalmente invadir y progresar en el órgano blanco, son capaces de concretar dicha colonización a distancia.

Todos los animales presentes en el grupo control presentaron metástasis pulmonares visibles, con un máximo de 6 nódulos macroscópicos por ratón. Notoriamente, el tratamiento sostenido con dosis endovenosas de $[V^4Q^5]$ dDAVP durante 6 semanas fue capaz de inhibir por completo de formación de metástasis pulmonares espontáneas (Figura I. 5. A). En contraste, el efecto de dDAVP sobre la diseminación tumoral espontánea a pulmón no fue significativa, al menos en las condiciones experimentales ensayadas.

El tratatamiento sostenido de $[V^4Q^5]$ dDAVP vía i.v. durante 6 semanas utilizando dosis clínicamente relevantes, no mostró signos evidentes de toxicidad en ratones BALB/c inmunocompetentes al evaluar ingesta de agua, comida, comportamiento y peso de los animales. Estas observaciones están en línea con lo reportado por Ripoll *et al*, utilizando dosis equivalentes sostenidas del análogo parental dDAVP en el mismo modelo animal [142].

De manera accesoria, se evaluó el efecto de los péptidos sobre el crecimiento de los tumores primarios F3II, responsables de la diseminación espontánea a pulmón. Tanto el tratamiento con dDAVP como con $[V^4Q^5]$ dDAVP tuvieron un impacto limitado sobre los volúmenes tumorales finales, sin alcanzar la significancia estadística ($1,194 \pm 240$, $1,574.8 \pm 466.1$ or $1,822.3 \pm 1,185$ mm³ en los grupos $[V^4Q^5]$ dDAVP, dDAVP o control, respectivamente, Figura I. 5. B). Sin embargo, tras analizar las tasas de crecimiento (días 11-46) mediante regresión lineal, se observó que los tumores pertenecientes a animales tratados con $[V^4Q^5]$ dDAVP crecieron a una tasa significativamente menor comparados con los pertenecientes a grupo dDAVP o control (Figura I. 5. C)

Resumen de resultados - Capítulo I

- Tras evaluar distintas dosis y tiempos de administración postdesafío tumoral, se encontró el esquema mas óptimo de tratamiento con el péptido parental dDAVP, logrando así potenciar su eficacia como agente antimetastásico.
- La administración de dDAVP o su nuevo análogo $[V^4Q^5]dDAVP$ en etapas tempranas resulta clave para obtener el máximo efecto antitumoral.
- No se descartan otros efectos angiostáticos y citostáticos directos que podrían colaborar en el accionar antimetastásico.
- Se concluye que el efecto de los análogos de vasopresina no dependería de una acción hemostática directa. El desempeño de dDAVP como agente antimetastásico no fue afectado por el cotratamiento con el anticoagulante enoxaparina ni pudo reproducirse con otro hemostático como el ácido tranexámico.
- El nuevo análogo peptídico derivatizado de desmopresina $[V^4Q^5]dDAVP$ desplegó un efecto antimetastásico mayor a su análogo parental dDAVP, logrando inhibir en un 60% la colonización experimental pulmonar a una dosis más baja.
- La administración sostenida de $[V^4Q^5]dDAVP$ inhibió por completo la progresión metastásica espontánea de tumores mamarios agresivos.

- El nuevo análogo mostró una buena tolerancia en modelos preclínicos animales y en estudios de toxicidad aguda, ensayando dosis hasta 300 veces las requeridas para los efectos antitumorales.

Capítulo II

Caracterización de los efectos *in vitro* e *in vivo* de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la biología tumoral de cáncer mamario

La vasopresina y sus receptores fueron propuestos como blancos moleculares atractivos para el tratamiento del cáncer mamario hace dos décadas, cuando los productos relacionados con los genes de la familia de la vasopresina fueron detectados mediante inmunohistoquímica como biomarcadores de todos los subtipos de cáncer de mama [181].

[V⁴Q⁵]dDAVP es un agonista selectivo del receptor de vasopresina V2r derivado de la molécula desmopresina. En el Capítulo I observamos que, ha diferencia de dDAVP, el tratamiento con el nuevo análogo sintético [V⁴Q⁵]dDAVP resultó en una inhibición total de la progresión metastásica de tumores subcutáneos. Dicho efecto mejorado de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la diseminación metastásica fue confirmado en un modelo de colonización pulmonar experimental.

Además de su accionar antimetastásico, agonistas selectivos del receptor de vasopresina V2r tales como dDAVP, tienen la capacidad de modular diversos aspectos de la biología tumoral mamaria. Recientemente, nuestro grupo reportó que el tratamiento con dDAVP reduce el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de células de cáncer mamario murino, y que dicha reducción estaría asociada a una inhibición de la vasculatura asociada a tumor. *In vitro*, dDAVP favorece la producción del factor antiangiogénico angiostatina, tras modular el perfil secretorio de proteasas en las células tumorales [142].

Teniendo esto en cuenta, el objetivo del presente Capítulo fue explorar el impacto del nuevo análogo derivado de desmopresina [V⁴Q⁵]dDAVP sobre otros procesos relevantes en la biología del cáncer mamario, incluyendo proliferación, crecimiento clonogénico, adhesión, migración y reorganización del citoesqueleto de actina. Buscando la correlación *in vivo* de los resultados encontrados *in vitro*, se evaluó la capacidad de [V⁴Q⁵]dDAVP de modular la progresión, agresividad y angiogénesis tumoral. Para llevar a cabo dichos estudios se utilizaron dos modelos de cáncer mamario humano clínicamente relevantes; la línea hormono-dependiente MCF-7 y la triple-negativa MDA-MB-231. La angiogénesis *in vitro* fue evaluada sobre cultivos de células humanas microvasculares humanas de pulmón HMVEC-L.

Expresión de V2r en células tumorales y microvasculares

Así como previamente caracterizamos la presencia del blanco molecular en células de carcinoma mamario murino F3II, en la Figura II.1 se observa la detección del V2r en células de carcinoma mamario humano MDA-MB-231 y células endoteliales microvasculares humanas HMVEC-L mediante IF. Tanto las células de cáncer mamario MDA-MB-231, como las microvasculares HMVEC-L, mostraron una intensa marcación fluorescente similar al patrón de expresión observado en las células MCF-7 utilizadas como control positivo [128]. La expresión del V2r en las células HMVEC-L, confirman lo publicado por Kaufmann *et al.*, quienes reportaron la expresión del receptor mediante RT-PCR [182].

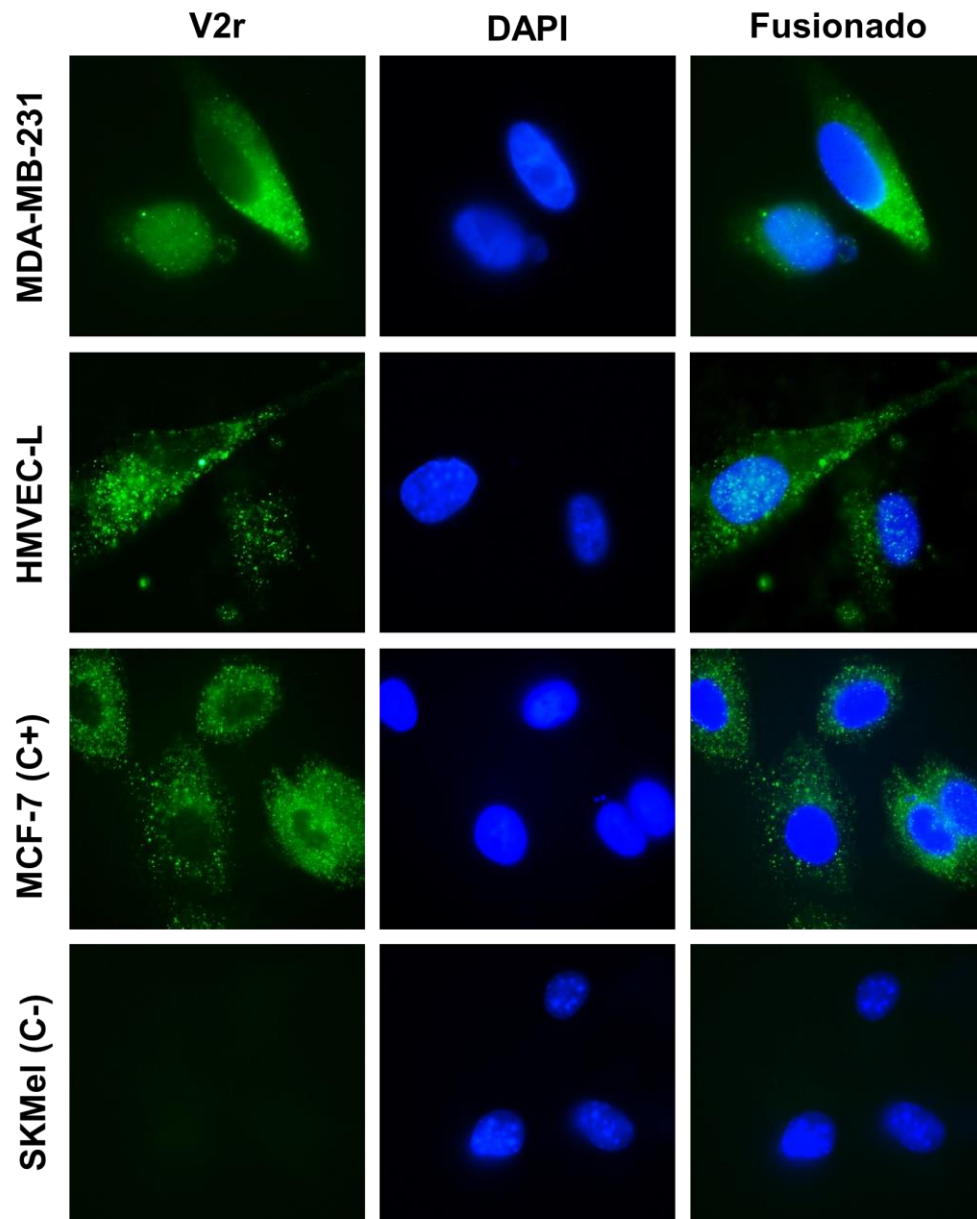


Figura II. 1. Detección del receptor de vasopresina tipo 2 en células de carcinoma mamario MDA-MB-231 y células endoteliales microvasculares humanas HMVEC-L mediante inmunofluorescencia. La presencia del receptor fue determinada empleando un anticuerpo primario dirigido contra V2r y un anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína. Los núcleos fueron marcados con DAPI. La línea de carcinoma mamario humano MCF-7 fue utilizada como control positivo (C+). La línea de melanoma humano SKMel fue usada como control negativo (C-). Aumento 1,000X.

La expresión del V2r en células MDA-MB-231 también fue confirmada mediante la detección del transcripto codificante por RT-PCR. Los primers utilizados fueron obtenidos de bibliografía [128], y están diseñados contra una región interexónica del ADNc del V2r humano (Figura II.2.A). Como controles de expresión se utilizó ARN extraído de células MCF-7 (control positivo) y de células de melanoma humano SKMel (control negativo). La integridad del ARN fue ensayada amplificando una región de 600 bp para β -actina. Como puede observarse en la Figura II.2.B, la línea MDA-MB-231 fue nuevamente indentificada como positiva para la expresión del receptor de vasopresina V2r, confirmando de esta manera que $[V^4Q^5]$ dDAVP podría ser reconocida por células de cáncer mamario humano MCF-7 y MDA-MB-231 e inducir una potencial respuesta tumoral.

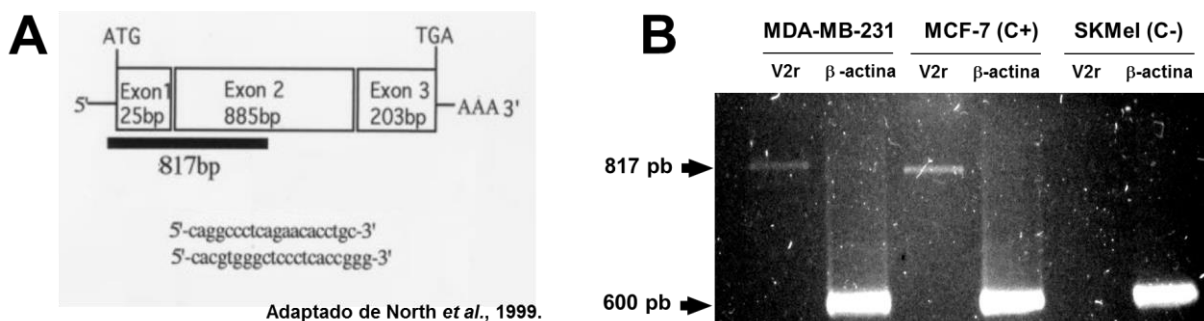


Figura II. 2. Detección del transcripto codificante para el receptor de vasopresina tipo 2 (V2r) en células de carcinoma mamario humano mediante RT-PCR. (A) diseño de primers interexónicos utilizados en la RT-PCR para detectar V2r (North *et al.*, 1999). (B) productos de tamaño esperado obtenidos de la RT-PCR (817 pb; V2r y 600 pb; β -actina) visualizados en gel de agarosa 2% con bromuro de etidio. β -actina fue utilizado como control de carga. La línea de carcinoma mamario humano MCF-7 fue utilizada como control positivo (C+). La línea de melanoma humano SKMel fue usada como control negativo (C-).

Efecto de $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre la vía AMPc/PKA

Tras la unión con el receptor V2r presente en tejido renal y endotelial, dDAVP induce mecanismos fisiológicos de antidiuresis y hemostasis, respectivamente. Ambas respuestas biológicas están asociadas a una activación de la adenilato ciclasa vía proteína G estimuladora, aumento de niveles de AMPc intracelular y actividad de PKA [183]. Dichas respuestas pueden ser bloqueadas tanto por antagonistas selectivos de V2r tal como SR121463B, o por inhibidores de la PKA como Rp-8CPT-cAMPS [182, 184]. Sin embargo, poco se sabe sobre la ruta de señalización río abajo del V2r en células transformadas o tumorales.

Con el fin de comenzar a dilucidar cuales son los mecanismos celulares desencadenados tras la estimulación del V2r mediante el nuevo análogo peptídico $[V^4Q^5]dDAVP$, se analizaron los niveles de AMPc y de activación de la PKA en células de carcinoma mamario humano incubadas entre 30 minutos y 1 hora con $[V^4Q^5]dDAVP$ en una concentración de 1,000 nM. Como fue reportado a comienzos del primer Capítulo del presente trabajo, al igual que en trabajos publicados por nuestro grupo [143, 152, 157], dicha concentración de análogos de vasopresina es capaz de modular el crecimiento *in vitro* de cultivos celulares tumorales de distintos cánceres, incluyendo carcinoma mamario.

Como se observa en la Figura II.3.A, la incubación durante 1 hora con el análogo peptídico $[V^4Q^5]dDAVP$ en células tumorales MCF-7 indujo un aumento del 90% del AMPc intracelular comparado con células tumorales incubadas con el vehículo salino.

El efecto de $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre la actividad de PKA en células tumorales fue determinado por la incorporación de ortofosfato marcado con

[^{32}P] al sustrato histona H1 a partir de [^{32}P] γ -ATP. Si bien a los 30 minutos de tratamiento con [V^4Q^5]dDAVP se comienza a evidenciar un aumento no significativo en la actividad de PKA, luego de transcurrida una hora de incubación el péptido logró un aumento estadísticamente significativo del 40% en el nivel de activación de la enzima comparado con el control. Paralelamente, como control positivo de activación se utilizó el análogo permeable de AMPc y activador de PKA, 8-Br-AMPc, el cual tras una hora de incubación, logró un 75% de aumento en la actividad quinasa de la PKA (Figura II.3.B).

La elevación de los niveles de AMPc inhibe la proliferación y la expresión del fenotipo transformado en diversos tipos de cáncer, incluyendo al mamario [185]. Naviglio *et al* reportaron que el tratamiento de células de cáncer mamario humano MDA-MB-231 con el agente elevador de AMPc forskolina inhibe el crecimiento tumoral tras el arresto del ciclo celular mediante un descenso en la proteína reguladora y estimuladora del ciclo celular ciclina D1. Adicionalmente estos efectos antimitogénicos fueron bloqueados usando el inhibidor de PKA KT-5720 [138]. Resultados similares fueron obtenidos mediante el uso de 8-Br-AMPc, en donde la incubación con células de cáncer mamario humano MCF-7 indujo arresto del ciclo celular en la fase G_1 mediante un incremento sostenido en los niveles de la proteína reguladora inhibidora del ciclo celular p27^{kip1} [185].

Con el objetivo de explorar la asociación entre la estimulación de la ruta de señalización AMPc/PKA vía V2r y la modulación del crecimiento celular, se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular revelados por el método del MTT, en donde células MCF-7 creciendo en fase exponencial fueron tratadas con el activador de PKA 8-Br-AMPc durante 72 horas, combinado o no a [V^4Q^5]dDAVP (1,000 nM).

Como se observa en la Figura II .3. C, la capacidad de aumentar la actividad de PKA del análogo 8-Br-AMPC fue asociado a un efecto antiproliferativo sobre células MCF-7, en línea con lo reportado por Santore *et al* [185]. Más aún, su efecto sobre la proliferación celular fue estudiado en combinación con $[V^4Q^5]dDAVP$ (1,000 nM) mostrando un claro efecto cooperativo sobre la inhibición del crecimiento celular tumoral.

Estos primeros hallazgos muestran que la activación del V2r mediante $[V^4Q^5]dDAVP$, logra elevar drásticamente los niveles de AMPc y la actividad de PKA 1 hora postestimulación, y que dicha activación del eje adenilato ciclasa/AMPc/PKA estaría asociado a un efecto antiproliferativo.

Efecto citostático de $[V^4Q^5]dDAVP$ mediado por V2r

Para analizar con mayor profundidad la capacidad de $[V^4Q^5]dDAVP$ de modular el crecimiento celular tumoral, se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular en donde células MCF-7 creciendo en fase exponencial fueron tratadas con $[V^4Q^5]dDAVP$ explorando un rango de concentraciones desde 100 hasta 1,500 nM. Para evaluar el impacto de las modificaciones racionales introducidas en $[V^4Q^5]dDAVP$ a partir de la estructura de dDAVP, la eficacia antitumoral del nuevo análogo se contrastó con el desempeño del análogo parental. Además de evaluar el efecto de las drogas en la línea celular hormono-dependiente y poco agresiva MCF-7, se utilizará la línea de cáncer mamario humano triple negativa y altamente agresiva MDA-MB-231 con el objetivo de explorar si los distintos fenotipos celulares se asocian a respuestas tumorales diferenciales.

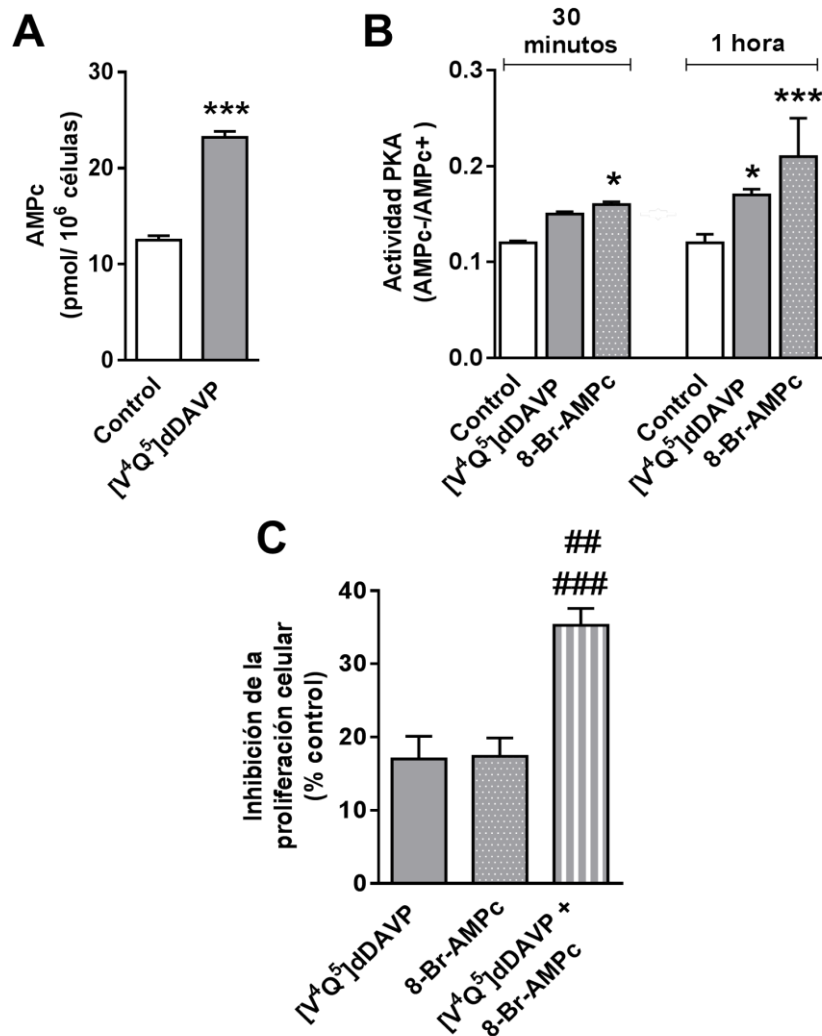


Figura II. 3. [V⁴Q⁵]dDAVP aumenta los niveles de AMPc y la activación de PKA en células de carcinoma mamario humano. (A) concentración de AMPc en células MCF-7 luego de 1 hora de tratamiento con [V⁴Q⁵]dDAVP (B) actividad de la enzima PKA en células de cáncer mamario humano tratadas con [V⁴Q⁵]dDAVP (1,000 nM) o el análogo permeable de AMPc y activador de la PKA, 8-Br-AMPc (500 nM). (C) asociación entre la estimulación del eje AMPc/PKA con mecanismos antiproliferativos. Se evaluó el efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP solo o en combinación con 8-Br-AMPc sobre células MCF-7 en crecimiento exponencial tras 72 horas de incubación revelado por el método metabólico del MTT. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM. Resultados representativos de 2 ensayos independientes. *, $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ versus control. ## $P < 0.01$ [V⁴Q⁵]dDAVP + 8-Br-AMPc versus 8-Br-AMPc. ### $P < 0.001$ [V⁴Q⁵]dDAVP + 8-Br-AMPc versus [V⁴Q⁵]dDAVP. Test de *t* en la cuantificación de AMPc, y ANOVA contrastado con Tukey para el resto (en la determinación de actividad de PKA se utilizó ANOVA a dos vías).

Luego de incubaciones durante 72 horas, ambos péptidos lograron reducciones leves en la proliferación de cultivos MCF-7 (Figura II. 4. A). A concentraciones superiores que 500 nM, el tratamiento con [V⁴Q⁵]dDAVP desplegó un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular comparado con el péptido parental dDAVP, reduciendo la proliferación hasta un 26%. Estos resultados están en línea con estudios previamente publicados, en donde distintos análogos peptídicos de dDAVP, incluyendo [V⁴Q⁵]dDAVP, fueron testeados empleando cultivos celulares MCF-7 [157].

Los efectos sobre la proliferación también fueron evaluados sobre células de carcinoma mamario MDA-MB-231, obteniendo un perfil antiproliferativo similar al logrado sobre el modelo MCF-7 (Figura II. 4. A). Solo a una concentración de 1,500 nM el análogo [V⁴Q⁵]dDAVP muestra un mejor efecto antiproliferativo que dDAVP, desplegando una inhibición de la proliferación celular del 30%, en comparación a una reducción del 18%, respectivamente.

El tolvaptan es un antagonista selectivo no peptídico del receptor de vasopresina V2r. Dicho antagonista posee una afinidad muy superior al receptor V2r en comparación a los ligandos peptídicos derivados de vasopresina (K_i tolvaptan: 0.43 nM *versus* K_i dDAVP: 23.3 nM) [186]. Como se observa en la Figura II. 4. B, la capacidad moduladora sobre el crecimiento de células tumorales de [V⁴Q⁵]dDAVP a alta concentración fue completamente bloqueada mediante la coincubación del antagonista selectivo del V2r tolvaptan. Esta pérdida de efecto implicaría que la reducción del crecimiento celular *in vitro* resultaría principalmente de la activación del V2r posterior a la incubación con [V⁴Q⁵]dDAVP.

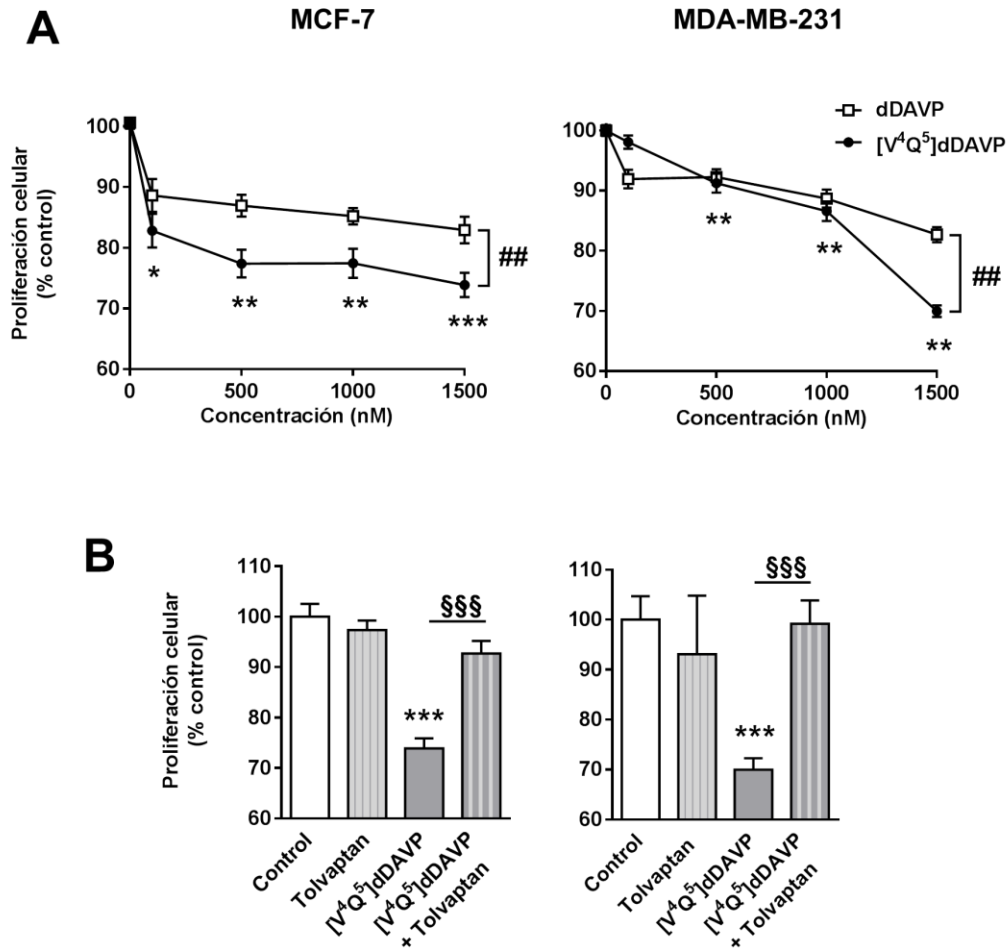


Figura II. 4. Efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP mediado por el V2r sobre la proliferación de células de carcinoma mamario humano. (A) efecto antiproliferativo de dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP (100-1,500 nM) sobre células MCF-7 y MDA-MB-231 en crecimiento exponencial tras 72 horas de incubación revelado por el método metabólico del MTT. (B) bloqueo del efecto antiproliferativo de [V⁴Q⁵]dDAVP (1,500 nM) con el antagonista selectivo del V2r tolvaaptan (1,500 nM). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM. Resultados representativos de al menos 3 ensayos independientes. *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001 versus control. ##, P<0.01; dDAVP versus [V⁴Q⁵]dDAVP. §§§, P<0.001 [V⁴Q⁵]dDAVP con tolvaaptan versus [V⁴Q⁵]dDAVP. ANOVA contrastado con Tukey.

Efecto de $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre el crecimiento clonogénico de células tumorales

A continuación se evaluó la capacidad de $[V^4Q^5]dDAVP$ de modular la formación y el crecimiento de colonias de células MCF-7 y MDA-MB-231 en 2 dimensiones. El ensayo de crecimiento clonogénico fue descrito en detalle al comienzo del Capítulo I. Las células tumorales fueron sembradas a baja densidad e incubadas durante 7 días en concentraciones crecientes de los compuestos peptídicos con renovación cada 72 horas. En cultivos de células MDA-MB-231 (Figura II. 5. C), las colonias presentaban una morfología difusa, poco compacta, característica de un fenotipo mesenquimal y altamente migratorio. En este grupo experimental, más de 50 células tumorales agrupadas fueron consideradas como una colonia. En cambio los cultivos clonogénicos de células MCF-7 presentaron una morfología compacta y epitelial. En este último modelo experimental el criterio de cuantificación de colonias fue de más de 20 células tumorales (Figura II. 5. C).

Como se observa en la Figura II. 5. A, tanto en la línea celular MCF-7 como en MDA-MB-231, dDAVP y $[V^4Q^5]dDAVP$ inhibieron drásticamente el crecimiento clonogénico de las células tumorales, reduciendo hasta en un 75% el número de colonias formadas. Particularmente en MDA-MB-231, $[V^4Q^5]dDAVP$ a concentraciones de 1,000 y 1,500 nM, desplegó un mayor poder inhibitorio sobre la formación de colonias al compararlo con dDAVP. Este desempeño mejorado se ve reflejado en los valores de IC_{50} calculados mediante regresión lineal (IC_{50} dDAVP; 1,440 nM *versus* IC_{50} $[V^4Q^5]dDAVP$; 1,130 nM) (Figura II. 5. B).

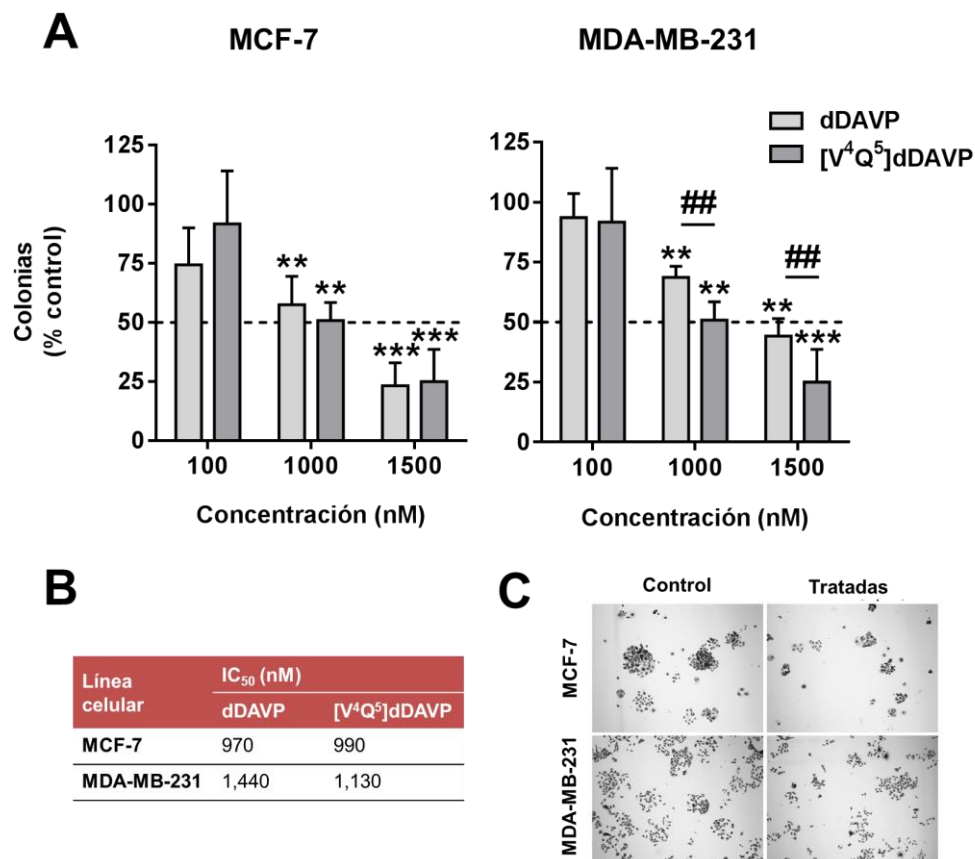


Figura II. 5. Efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre cultivos clonogénicos de células de carcinoma mamario humano. (A) inhibición de dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la formación de colonias. Células MCF-7 o MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 24 pocillos e incubadas durante 7 días en concentraciones crecientes de los compuestos peptídicos (100-1,500 nM). La línea punteada representa el 50% de la inhibición. (B) valores de IC₅₀ calculados mediante regresión lineal ($R^2 > 0.9$ y $P < 0.05$ en todas las regresiones). (C) imágenes representativas de colonias control o incubadas durante 7 días con dDAVP a una concentración de 1,000 nM (tratadas), fijadas con formalina y teñidas con cristal violeta. Aumento 40X. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM. Resultados representativos de al menos 3 ensayos independientes. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ versus control. ##, $P < 0.01$ dDAVP versus [V⁴Q⁵]dDAVP. ANOVA contrastado con Tukey.

Efecto de $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre la formación y crecimiento de colonias tumorales tridimensionales

Si bien los modelos *in vitro* en dos dimensiones representan una herramienta robusta en el estudio de la biología tumoral celular y molecular debido a su relación practicidad/correlación *in vivo*, estos presentan distintas limitaciones. Dichos modelos se basan en el crecimiento celular sobre sustratos planos, causando como consecuencia la pérdida de la organización espacial/tisular y una desregulación del metabolismo [187].

Atendiendo a estas limitaciones, se han desarrollado modelos *in vitro* de crecimiento tridimensional tales como el de esferoides celulares tumorales, en donde las células forman agregados compactos en 3D al ser cultivados en superficies de baja adherencia o en extractos de matriz extracelular [187, 188]. Estas estructuras en 3D reflejan de manera más certera la expresión génica, sensibilidad a distintos fármacos, gradientes hipóxicos, de pH y metabolismo diferencial de glucosa al compararlos con modelos *in vitro* en dos dimensiones [188].

Tomando esto en cuenta, se evaluó si $[V^4Q^5]dDAVP$ tiene la capacidad de modular la formación y crecimiento de esferoides de células MDA-MB-231. Para abordar ese objetivo se emplearon dos ensayos de crecimiento en 3D; un ensayo de esferoides múltiples en EMB y otro de crecimiento de esferoides aislados sobre agar (Figura II. 6).

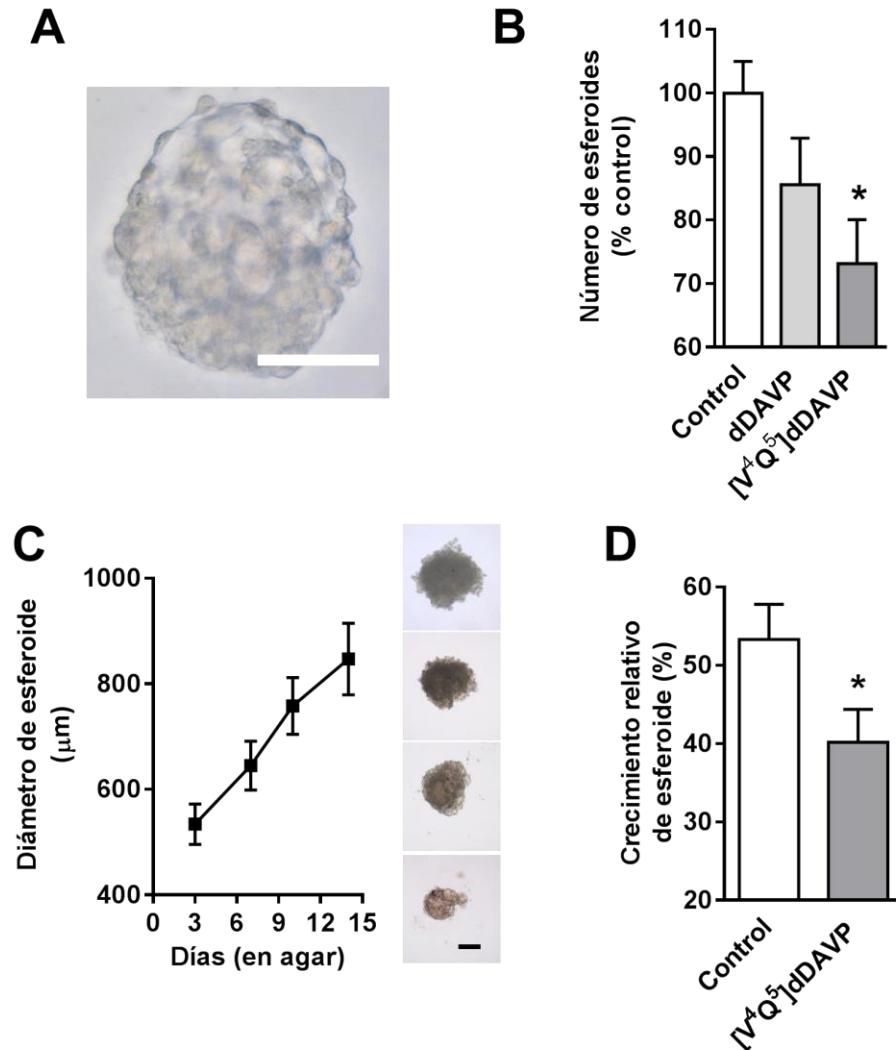


Figura II. 6. Efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la formación y crecimiento de colonias tridimensionales de células MDA-MB-231. (A) imagen representativa de esferoide multicelular en extracto de membrana basal Matrigel™ tras 14 días de crecimiento en medio de cultivo completo. (B) número de esferoides de células MDA-MB-231 por campo tras 14 de incubación con vehículo salino (control), dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP (1,000 nM). El valor de corte para la cuantificación de los esferoides formados fue >50 μm. (C) la curva muestra el crecimiento de esferoides desarrollados durante 6 días en pocillos recubiertos de Matrigel™, trasplantados de manera individual a pocillos recubiertos en agar. El diámetro de los esferoides fue registrado cada 3 días a partir de su traspaso a agar. (D) el crecimiento relativo de los esferoides creciendo durante 9 días en medio completo con [V⁴Q⁵]dDAVP (1,000 nM) fue obtenido tras comparar el diámetro final e inicial de cada esferoide y calcular un crecimiento porcentual. Datos expresados como promedio ± SEM. Barra de referencia; 100 μm. *, P<0.05; *versus* control. ANOVA contrastado con Tukey (ensayo de esferoides múltiples) y test de *t* (ensayo de esferoides individuales).

En el primer ensayo se evaluó el efecto de $[V^4Q^5]dDAVP$ y $dDAVP$ sobre la capacidad de células MDA-MB-231 de proliferar y formar esferoides multicelulares en una matriz tridimensional. Con este objetivo, células MDA-MB-231 se sembraron a baja densidad en una mezcla conteniendo EMB y fueron tratadas durante 14 días con $[V^4Q^5]dDAVP$ (1,000 nM).

La cuantificación de esferoides formados a día 14 reveló una inhibición de aproximadamente 30% en la formación de colonias 3D por parte de $[V^4Q^5]dDAVP$. El tratamiento con el péptido $dDAVP$ mostró una tendencia inhibitoria no significativa sobre la formación de colonias tumorales en EMB (Figura II. 6. B). Con el objetivo de analizar no sólo el número de esferoides formados, sino también el crecimiento de los mismos, se abordó el segundo modelo experimental basado en colonias en 3D.

El ensayo de crecimiento de esferoides aislados sobre agar se utilizó con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento de $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre esferoides completamente formados desarrollados durante 6 días en pocillos recubiertos de Matrigel™, que luego fueron trasplantados de manera individual a pocillos recubiertos en agar 1% para recrear condiciones de baja adherencia. Este ensayo de esferoides aislados permite independizarse de la alta variabilidad de los diámetros en el ensayo de esferoides múltiples (rango 50-300 μm), y evaluar el crecimiento de los esferoides de manera individual. El crecimiento de los esferoides tratados con $[V^4Q^5]dDAVP$ (1,000 nM) fue obtenido tras relativizar el diámetro final con respecto al inicial de cada esferoide y calcular un crecimiento porcentual. En la Figura II. 6. D se puede observar que el tratamiento con el análogo $[V^4Q^5]dDAVP$ durante 9 días redujo el tamaño de esferoides establecidos creciendo en condiciones de baja adherencia en comparación a esferoides incubados con medio completo en ausencia de drogas.

En conjunto, estos resultados obtenidos utilizando modelos tridimensionales de cultivo celular demuestran que el tratamiento sostenido con $[V^4Q^5]dDAVP$ modula la formación y crecimiento de esferoides tumorales, y podrían afectar etapas tempranas del establecimiento y progresión de micrometástasis.

Efecto de $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre la distribución del ciclo celular

Teniendo en cuenta la capacidad de $[V^4Q^5]dDAVP$ de activar la vía AC/AMPc/PKA y reducir el crecimiento celular, y las evidencias bibliográficas mencionadas previamente sobre el impacto en la regulación del ciclo celular de distintos agentes elevadores del AMPc, se evaluó el efecto sobre la progresión del ciclo celular en células MDA-MB-231 tratadas con el péptido de interés. La distribución del ciclo celular se realizó mediante tinción de ADN con yoduro de propidio y citometría de flujo. Cultivos celulares de MDA-MB-231 deprivados de SFB durante 48 horas fueron incubados con $[V^4Q^5]dDAVP$ a una concentración final de 1,000 nM y 1 hora después se agregó SFB al medio de cultivo con la droga. Por medio del análisis de la distribución del ciclo celular se pudo observar un arresto parcial en la fase G_0/G_1 de células MDA-MB-231 tratadas durante 25 horas con $[V^4Q^5]dDAVP$ (Figura II. 7).

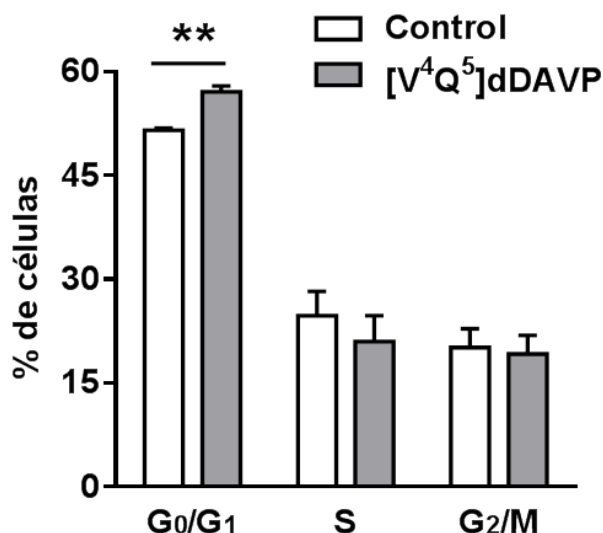


Figura II. 7. Efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la distribución del ciclo celular en células de carcinoma mamario humano. El estudio del ciclo celular de células MDA-MB-231 tratadas con [V⁴Q⁵]dDAVP (1,000 nM) durante 24 horas fue determinado mediante tinción del ADN con ioduro de propidio y cuantificado por citometría de flujo. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM. Resultados representativos de al menos 3 ensayos independientes. **, $P < 0.01$ versus control. Test de *t*.

Efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la adhesión a sustrato de células tumorales

El fenómeno de adhesión celular pone en juego mecanismos moleculares que involucran la unión entre proteínas de membrana específicas, ligandos extracelulares y el citoesqueleto de actina. Como se mencionó previamente en la Introducción, la CadE es una glicoproteína de membrana con un rol primordial en la adhesión celular, especialmente en células tumorales con fenotipos epiteliales tales como MCF-7 [189]. La CadE, a través de la proteína adaptadora β -catenina, se une fuertemente al citoesqueleto de actina en la región cortical del espacio intracelular. Resultados preliminares obtenidos en colaboración con la Dra. Mónica

Vazquez-Levin y la Lic. María Besso (IBYME) indicaron que el tratamiento *in vitro* de células MCF-7 con dDAVP reduciría los niveles de proteína y ARNm codificante para CadE. También se observó que la incubación con el péptido induciría cambios morfológicos del citoesqueleto de actina y una relocalización intracelular de CadE y β -catenina [190].

Motivados por estos resultados preliminares en donde $[V^4Q^5]$ dDAVP tendría la capacidad de modular el complejo adherente vía CadE y el citoesqueleto de actina, se evaluó si el tratamiento con $[V^4Q^5]$ dDAVP es capaz de interferir con la adhesión de células MCF-7 y MDA-MB-231 sobre sustratos plásticos tras la estimulación con SFB.

Como se observa en la Figura II. 8 , el tratamiento de células MCF-7 y MDA-MB-231 con los péptidos durante 1 hora previo al estímulo adhesivo con SFB, inhibió la adhesión celular entre un 30 y un 42% dependiendo de la concentración de droga utilizada. Ambos análogos peptídicos desplegaron un perfil inhibitorio semejante. Dicho efecto antiadhesivo solo es observado si las células son pretratadas durante 1 hora por los análogos peptídicos, ya que si el tratamiento se realiza durante 1 hora comenzando al mismo tiempo que se realiza el estímulo, los efectos antiadhesivos desaparecen.

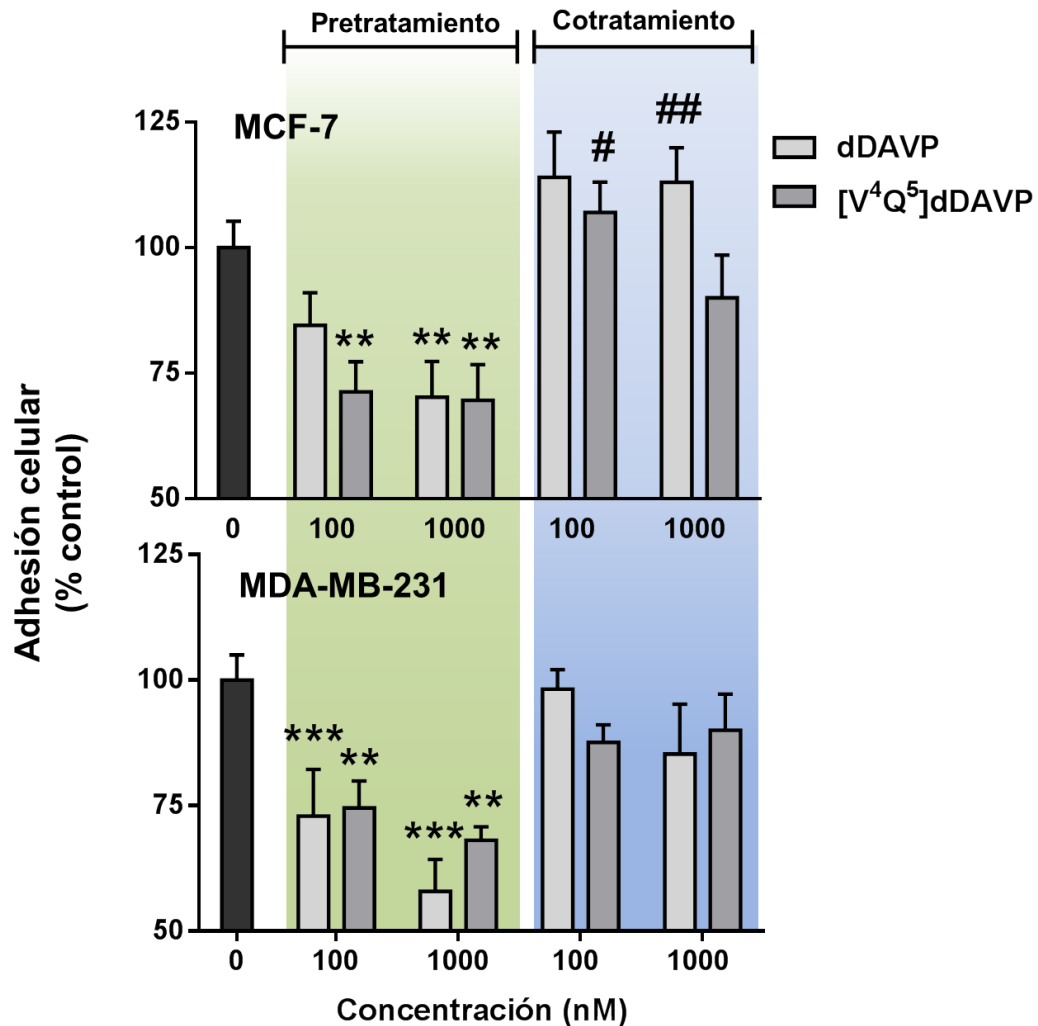


Figura II. 8. Efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la adhesión a sustrato de células de carcinoma mamario humano. Modulación de dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la adhesión de células MCF-7 y MDA-MB-231. Las células tumorales fueron incubadas con distintas concentraciones de análogos peptídicos 1 hora antes (pretratamiento) o al mismo tiempo (cotratamiento) del estímulo de adhesión (SFB). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM. Resultados representativos de al menos 2 ensayos independientes. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ versus control. #, $P < 0.01$; ##, $P < 0.05$ cotratamiento con dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP junto al estímulo de adherencia versus pretratamiento con dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP antes del estímulo. ANOVA contrastado con Tukey.

Efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la migración celular

Continuando con la caracterización de los efectos *in vitro* de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre células de cáncer mamario humano se evaluó la capacidad de [V⁴Q⁵]dDAVP y su análogo parental dDAVP de modular un aspecto primordial en la biología tumoral; la migración celular. Dicho proceso es de suma importancia para la progresión de un tumor establecido, dado que, ante una serie de estímulos específicos la migración le permite a las células malignas escapar del foco tumoral primario, invadir tejido circundante tras degradar la matriz extracelular, para luego consolidar la colonización de un órgano distante y formar un foco tumoral secundario.

Con el objetivo de evaluar el efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la migración celular, se llevaron adelante ensayos de migración en herida y migración en TranswellTM.

En el primer ensayo, las células censan el espacio libre y migran hacia el interior de la herida realizada, reconstituyendo la integridad de la monocapa celular [191]. La incubación durante 16-24 horas (dependiendo de la línea celular) con [V⁴Q⁵]dDAVP o dDAVP redujo significativamente la capacidad migratoria de manera dosis-dependiente, tanto de células MCF-7 como de células altamente invasivas MDA-MB-231 (Figura II. 9. A). En células MCF-7, [V⁴Q⁵]dDAVP (1,000 nM) redujo hasta un 80% la motilidad celular tumoral, mientras que su análogo parental dDAVP la inhibió en un 56%. Tanto a baja concentración (solo en MCF-7), como a alta concentración (en MCF-7 y MDA-MB-231), el nuevo análogo [V⁴Q⁵]dDAVP desplegó una eficacia antitumoral exacerbada tras analizar la migración celular en comparación con dDAVP.

En el ensayo de migración por Transwell™ las células tumorales, luego de ser cultivadas en condiciones de privación de suero, son sembradas en el compartimiento superior de un inserto plástico y deben migrar a través de una membrana porosa guiados por un estímulo quimiotractante; en este caso SFB [192]. Como se observa en la Figura II. 9. B, la incubación por 16-24 horas con los distintos péptidos impactó significativamente sobre la capacidad quimiotáctica de células MCF-7 y MDA-MB-231, mostrando una reducción en el número de células que lograron atravesar la membrana del inserto entre un rango de 24-44% y 16-37%, respectivamente, dependiendo de la droga y la concentración usada.

Si bien el efecto inhibitorio de ambos tratamientos sobre MDA-MB-231 fue notorio, este modelo celular mostró una menor sensibilidad a las drogas comparado al modelo MCF-7 tanto en los ensayos de migración en herida como en Transwell™. Sin embargo, en dicho modelo, [V⁴Q⁵]dDAVP nuevamente mostró una eficacia antitumoral exacerbada a concentraciones altas comparado contra su análogo parental dDAVP.

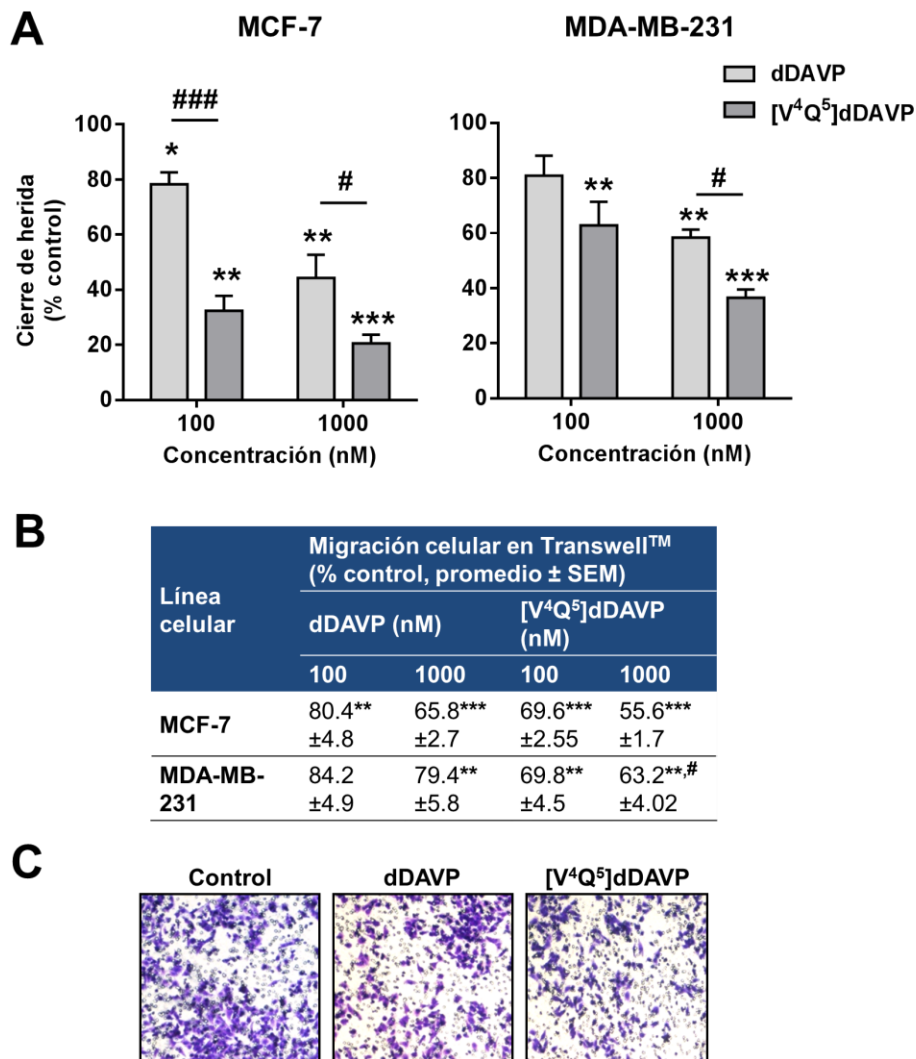


Figura II. 9. Efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la migración de células de carcinoma mamario humano. (A) efecto de dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP (100 y 1,000 nM) sobre la migración celular de MCF-7 y MDA-MB-231 empleando ensayos de cierre de herida a 16 horas. El área de herida cubierta por las células incubadas con vehículo salino (control) fue considerada como 100 %. (B) efectos sobre la quimiotaxis celular evaluados por medio del ensayo de Transwell™ durante 16 horas empleando SFB como quimiotractante. El número de células tumorales incubadas con vehículo salino que lograron migrar a través del Transwell™ fue considerado como 100%. (C) fotos representativas de células MDA-MB-231 que lograron migrar a la cámara inferior del inserto tras 16 horas de incubación con el vehículo salino (control), dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP (1,000 nM). Datos expresados como promedio ± SEM. Resultados son la suma de 2-3 ensayos independientes. *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001 *versus* control. #, P<0.01; ###, P<0.001 dDAVP *versus* [V⁴Q⁵]dDAVP. ANOVA contrastado con Tukey.

Efecto de $[V^4Q^5]$ dDAVP sobre el citoesqueleto de actina

Debido a que la adhesión y migración celular están reguladas por los cambios espacio-temporales del citoesqueleto de actina y está ampliamente aceptado el rol del eje AC/AMPc/PKA como un regulador clave de este proceso [191, 193], se evaluó si la inhibición de la adhesión y migración celular provocada por el tratamiento con $[V^4Q^5]$ dDAVP correlaciona con la modulación de la reorganización del citoesqueleto de actina.

Experimentalmente está demostrado que EGF, PDGF e IGF son capaces de inducir lamelipodios ricos en actina, ondulaciones de membrana y una rápida formación de filamentos de actina intracelulares [194]. Utilizando EGF como estimulador de la formación de filamentos de actina, células de carcinoma mamario humano fueron privadas de suero, tratadas con $[V^4Q^5]$ dDAVP durante 1 hora y luego estimuladas con el factor de crecimiento durante 15 minutos. Dichas células fueron fijadas y luego teñidas utilizando la toxina faloidina conjugada con el fluorocromo AlexaFluor 555. Dicha toxina presenta gran afinidad por la actina, lográndose un marcado específico de este componente del citoesqueleto permitiendo su visualización mediante el uso de microscopia fluorescente. En la Figura II. 10 se observa que la incubación durante 1 hora de las células tumorales, tanto con $[V^4Q^5]$ dDAVP como con dDAVP, interfiere con la dinámica del citoesqueleto de actina, impidiendo la formación de filamentos y favoreciendo la acumulación de actina cortical incluso luego del estímulo con EGF. En células tumorales incubadas con vehículo salino, se observó una notoria formación de haces de actina filamentosa y niveles bajos de actina cortical.

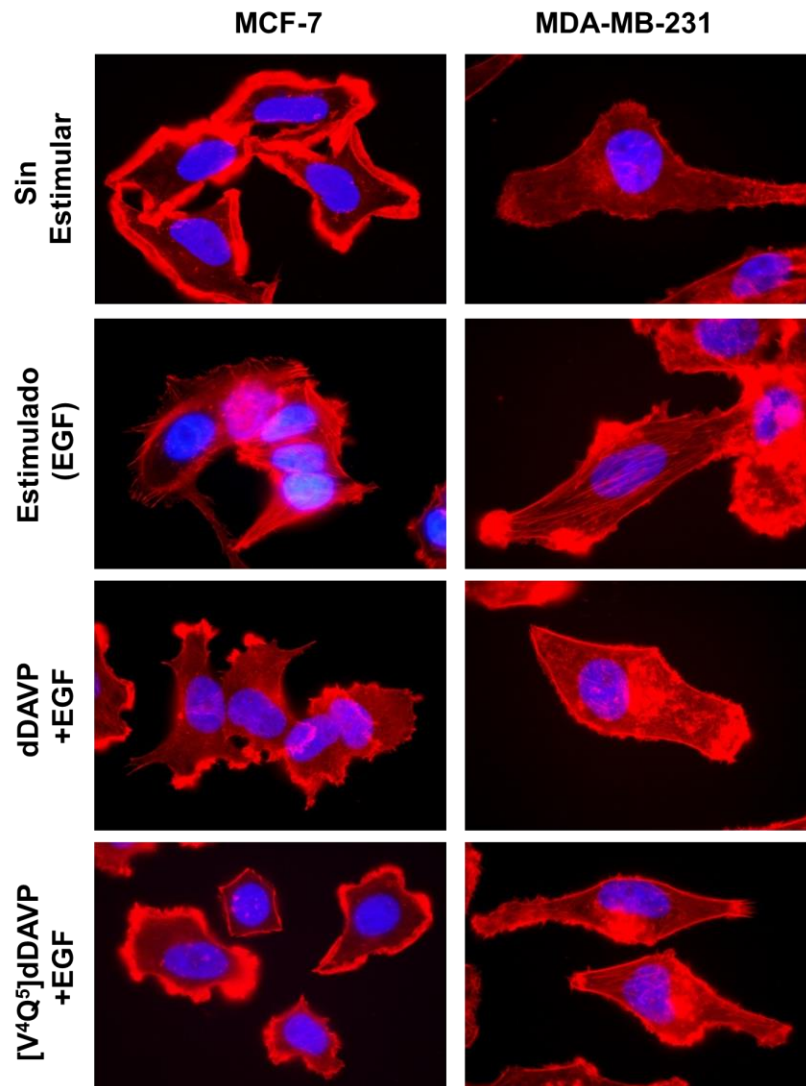


Figura II. 10. Efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre el citoesqueleto de actina en células de cáncer mamario humano. Fotografías representativas de células MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas durante 1 hora con dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP (1,000 nM) y luego tratadas por 15 minutos con el factor de crecimiento epidermal. Las células fueron fijadas y teñidas con AlexaFluor 555 conjugado a faloidina para permitir visualizar los cambios en el citoesqueleto de actina. Aumento 1,000X.

Efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*

Como describimos en detalle en la Introducción, el crecimiento de una masa neoplásica requiere el establecimiento de un lecho vascular que le permita a las células tumorales nutrirse, tener acceso al oxígeno y por el que pueda llevarse a cabo la remoción de sus productos de desecho. Las células tumorales que no adquieren la propiedad de inducir angiogénesis forman tumores incapaces de crecer más allá de unos pocos milímetros, debido a los condicionamientos impuestos por la difusión de nutrientes y oxígeno. Así, la adquisición de la habilidad de inducir nuevos vasos, establece un salto en la malignidad y abre una vía de escape a las células tumorales hacia órganos distantes [195]. Como consecuencia, la modulación del proceso angiogénico se ha convertido en una de las estrategias terapéuticas más exploradas con el objetivo de limitar la progresión tumoral.

Recientemente hemos publicado que el análogo parental dDAVP es capaz de reducir la vascularización de tumores de cáncer mamario agresivos F3II, por medio de un mecanismo que involucraría la generación aumentada del efector antiangiogénico angiostatina por medio de la modulación del sistema proteolítico en las células tumorales [142]. En este sentido, el accionar antiangiogénico observado *in vivo* de los análogos peptídicos dependería, al menos en parte, de la presencia de células tumorales y la modulación de su diálogo con el endotelio vascular.

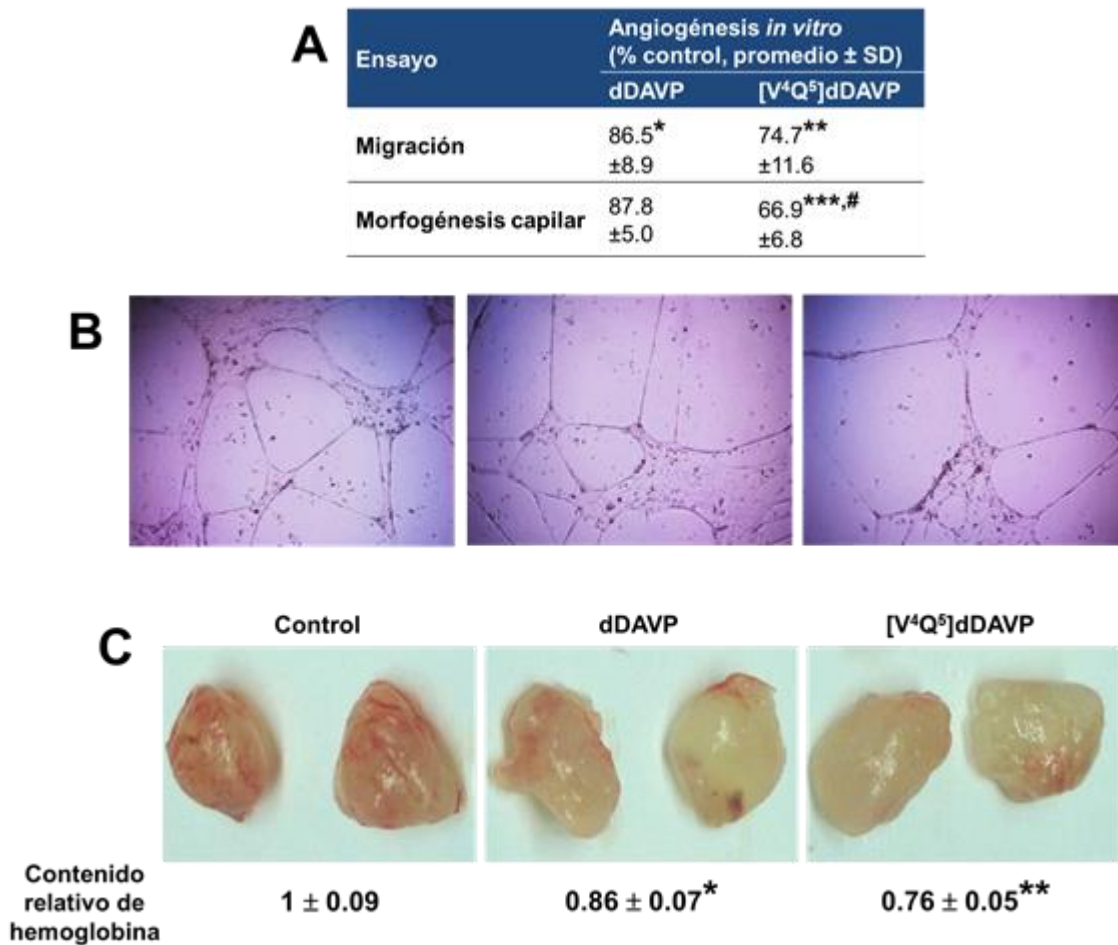


Figura II. 11. Efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*. (A) cuantificación de la migración celular y la morfogénesis capilar de células HMVEC-L incubadas con dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP (1,000 nM). (C) imágenes representativas de la formación de estructuras vasculares de células HMVEC-L pertenecientes al grupo control (izquierda), dDAVP (centro) o [V⁴Q⁵]dDAVP (derecha). Aumento 100X. (C) la angiogénesis inducida por células MDA-MB-231 en ratones atímicos fue evaluada usando un ensayo de implante de MatrigelTM modificado. Se muestran imágenes representativas de los implantes extraídos de los animales tras el tratamiento con vehículo salino (control), dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP. El contenido de hemoglobina en los implantes recuperados de ratones tratados es considerado un indicador directo del grado de vascularización y es cuantificado tras medir la absorbancia a 540 nm. La absorbancia promedio del grupo control es considerada como valor relativo “1”. Datos expresados como promedio $\pm$ SD. Resultados representativos de 2-3 ensayos independientes. 5 animales por grupo experimental. *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001 *versus* control. #, P<0.05; dDAVP *versus* [V⁴Q⁵]dDAVP. ANOVA contrastado con Tukey.

Kaufmann *et al.* demostró la presencia del receptor V2r al menos en pasajes *in vitro* bajos de HMVEC-L [182]. A comienzos de este capítulo, se confirmó la expresión de V2r por parte de las células microvasculares humanas mediante IF.

Con el objetivo de estudiar potenciales efectos antiangiogénicos de $[V^4Q^5]dDAVP$, se analizó si existe un accionar directo de los análogos de vasopresina sobre células endoteliales microvasculares humanas HMVEC-L V2r-positivas y su capacidad migratoria y morfogénica capilar (Figura II .11. A).

En el primer ensayo se evaluó si es factible modular la capacidad migratoria de células microvasculares a través de una membrana porosa siguiendo un estímulo químico. Como ya fue descrito previamente en los ensayos de quimiotaxis de células tumorales, esta evaluación del proceso migratorio fue realizada mediante TranswellsTM. En este ensayo, el tratamiento con $[V^4Q^5]dDAVP$ durante 24 horas redujo la migración quimiotáctica en un 24% comparado con el grupo tratado con vehículo salino. Por otro lado, el análogo dDAVP logró una moderada inhibición de la angiogénesis del 13% (Figura II .11. A).

Por otro lado, en el ensayo de morfogénesis capilar se evaluó la capacidad de los péptidos de alterar la formación de cordones vasculares *in vitro* por las células microvasculares, las cuales son sembradas sobre un *coating* de MatrigelTM (Figura II .11. B). En este protocolo, las células no solo migran sobre el sustrato, sino que se vinculan con otras células de su estirpe, y se organizan para formar una red de cordones vasculares primitivos. Durante el proceso de angiogénesis *in vivo*, estos cordones son los precursores de vasos estructuralmente completos y funcionales. Como se indica en la Figura II .11. B, tras 24 horas de incubación, $[V^4Q^5]dDAVP$, a

una concentración de 1,000 nM, inhibió en un 33% la morfogénesis capilar. Bajo estas condiciones experimentales, el análogo dDAVP no indujo cambios estadísticamente significativos sobre la formación de las estructuras tubulares, como ya fue reportado [142].

Por medio de estos modelos experimentales se demuestra que existe un efecto directo de los análogos de vasopresina en las células microvasculares, al menos sobre la migración y morfogénesis capilar, el cual es completamente independiente de la presencia de células tumorales, y su producción proteolítica de angioestatina a partir de PGNO.

Continuando con la exploración de los efectos sobre el proceso angiogénico, exploramos los potenciales efectos moduladores de $[V^4Q^5]$ dDAVP sobre la angiogénesis inducida por tumor, utilizando un modelo de implantación temprana. En este ensayo se inocularon células MDA-MB-231 como inductores de la respuesta vascular, en una mezcla de D-MEM, heparina y MatrigelTM vía s.c. en el flanco de ratones atímicos. Los animales fueron sacrificados a los 14 días postinyección y el contenido de hemoglobina fue cuantificado y fue considerado como un indicador directo del grado de vascularización. El lote de animales tratados con los análogos sintéticos dDAVP o $[V^4Q^5]$ dDAVP recibió una dosis de 0.3 µg/kg por vía endovenosa, media hora antes de la inoculación del MatrigelTM con las células tumorales y 3 tratamientos por semana hasta finalizar el protocolo (Figura II .11. C).

Luego del sacrificio de los animales a día 14, los implantes de MatrigelTM pertenecientes al grupo control mostraban una coloración rojiza intensa, asociada a una alta carga vascular inducida por las células tumorales en comparación con los implantes pertenecientes a los grupos $[V^4Q^5]$ dDAVP y dDAVP, los cuales mostraban una coloración menos

intensa. La cuantificación de hemoglobina, mostró que el tratamiento con $[V^4Q^5]$ dDAVP durante 2 semanas redujo la respuesta angiogénica temprana inducida por células tumorales MDA-MB-231 en un 24% comparado con el grupo control. Por otro lado, el análogo dDAVP logró una moderada inhibición de la angiogénesis del 14% (Figura II .11. C). No se observaron diferencias significativas en el peso de los implantes de MatrigelTM pertenecientes a los distintos grupos experimentales (98 ± 13.3 , 116.3 ± 17.3 y 101.1 ± 20 mg, promedio $\pm$ SD, $P > 0.05$)

Efecto de $[V^4Q^5]$ dDAVP sobre el crecimiento de xenotransplantes de cáncer mamario humano

Como se desarrolló en la Introducción, el cáncer mamario triple negativo se caracteriza por la falta de expresión de los receptores ER y PR, al igual que por la baja expresión del HER-2/neu. En los últimos años ha habido mejoras substanciales en otros subtipos de cáncer mamario, incluyendo tumores ER o HER/neu positivos, atribuidas a la incorporación de terapias moleculares dirigidas tales como agentes hormonales o los anticuerpos monoclonales trastuzumab/pertuzumab. Sin embargo, pocas terapias dirigidas han mostrado beneficios terapéuticos claros en el abordaje del CMTN, y los tratamientos de cabecera están limitados a cirugía y quimioterapia [79]. En este escenario, péptidos con actividad citostática y blancos moleculares específicos tales como $[V^4Q^5]$ dDAVP resultan extremadamente interesantes para su exploración preclínica.

Hasta aquí hemos observado la capacidad de modulación *in vitro* de $[V^4Q^5]$ dDAVP sobre el crecimiento, adhesión y migración de células de carcinoma mamario humano, tanto en el modelo hormono-dependiente poco

agresivo MCF-7, así como también en la línea triple negativa y altamente agresiva MDA-MB-231.

Con el objetivo de explorar si los resultados hasta aquí descriptos, pueden ser correlacionados con un escenario *in vivo*, se evaluó el efecto del tratamiento con $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre la progresión y angiogénesis de xenotransplantes de carcinoma mamario triple negativos MDA-MB-231. Los tumores fueron generados mediante la inoculación de 5×10^6 células en EMB en el flanco de ratones atímicos BALB/c vía s.c. El tratamiento con los péptidos consistió en 3 dosis semanales de $[V^4Q^5]dDAVP$ o dDAVP de 0.3 $\mu\text{g/kg}$ i.v. Al finalizar el protocolo, los animales fueron sacrificados y los tumores fueron extirpados y procesados para posterior evaluación histopatológica.

En la Figura II. 12. A se observan las curvas de crecimiento tumoral para los distintos grupos experimentales. Aproximadamente a día 14 se detectaron los primeros prendimientos tumorales y comenzaron los tratamientos. A partir del día 21 los volúmenes tumorales de los animales tratados con los análogos peptídicos comenzaron a diferenciarse con respecto a los volúmenes de los controles.

A día 41, se observó que el tratamiento sostenido de $[V^4Q^5]dDAVP$ logró una reducción estadísticamente significativa de 40% del volumen tumoral final comparado con el grupo control. La diferencia en la carga tumoral se pudo correlacionar con las tasas de crecimiento de los xenotransplantes pertenecientes a los distintos grupos experimentales analizadas entre los días 14 y 41 del protocolo. Los tumores pertenecientes a animales tratados vía endovenosa con $[V^4Q^5]dDAVP$ crecieron a una tasa significativamente menor que los tumores tratados tanto con vehículo salino como con el análogo parental dDAVP (Figura II. 12. B).

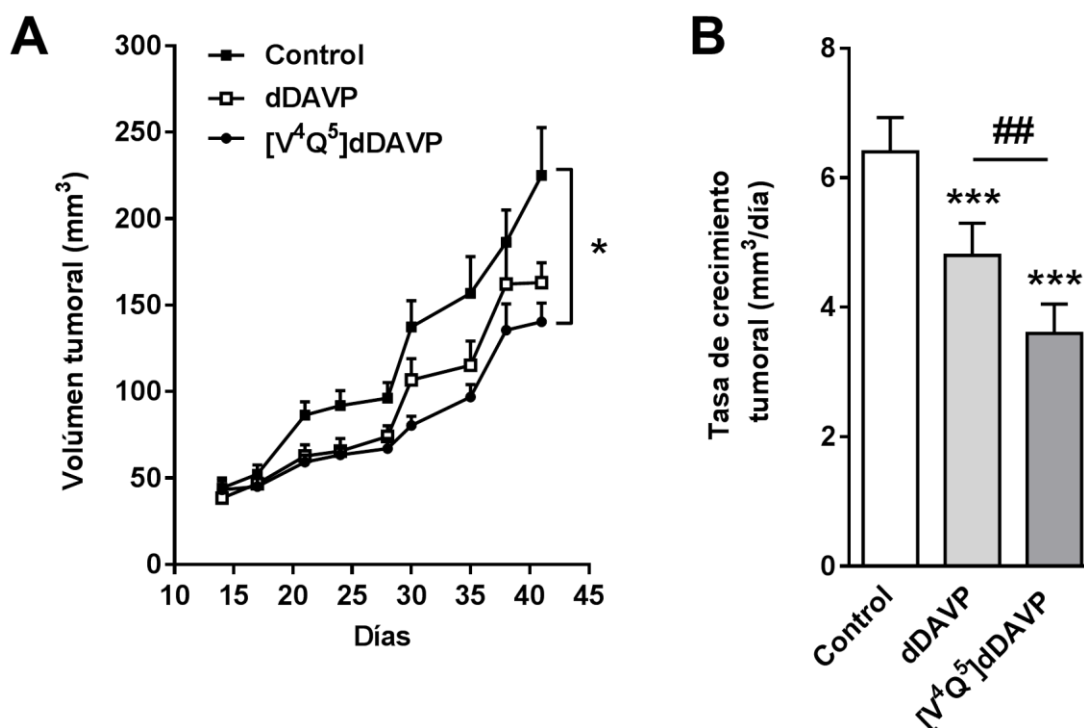


Figura II. 12. Efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre el crecimiento de xenotransplantes de cáncer mamario. (A) células MDA-MB-231 fueron inoculadas en el flanco de ratones atímicos BALB/c *nude* y 14 días después los animales fueron tratados con dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP tres veces por semana (0.3 µg/kg i.v.). La curva muestra los volúmenes promedio de los xenotransplantes creciendo en los flancos subcutáneos de animales pertenecientes a los distintos grupos experimentales. (B) tasas de crecimiento tumoral entre los días 14 y 41 calculadas mediante regresión lineal ($R^2 > 0.9$ y $P < 0.0001$ en todas las regresiones). Datos expresados como promedio $\pm$ SD o SEM. 8-9 animales por grupo experimental. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ versus control. ##, $P < 0.01$ dDAVP versus [V⁴Q⁵]dDAVP. ANOVA contrastado con Tukey.

El tratamiento sostenido de [V⁴Q⁵]dDAVP vía i.v. durante 4 semanas utilizando dosis clínicamente relevantes, no mostró signos evidentes de toxicidad en ratones atímicos al evaluar ingesta de agua, comida, el comportamiento general y peso de los animales (datos no mostrados). Estas observaciones están en línea con lo descrito al final del Capítulo I en ratones BALB/c inmunocompetentes.

Efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la agresividad y angiogénesis tumoral de xenotransplantes de cáncer mamario humano

Cuando un tumor subcutáneo progresa, puede crecer invadiendo el espacio subcutáneo y la dermis, causando una necrosis epidérmica y una ulceración visible en la cara externa del tumor [143]. Como se observa en la Figura II. 13. A, en el grupo control los xenotransplantes crecieron invadiendo la subcutis y la dermis, causando una ulceración y necrosis visible. En contraste, la mayor parte de los animales tratados con [V⁴Q⁵]dDAVP o dDAVP mostraron una preservación de las capas superficiales de la piel, indicando una inhibición de la infiltración y una modulación de la agresividad tumoral.

Estos resultados fueron confirmados mediante estudios histopatológicos. Tras finalizar el protocolo, además de evaluar mediante inmunohistoquímica la expresión de V2r, los tumores fueron fijados y teñidos mediante H&E para permitir evaluar el grado de diferenciación, de infiltración, de necrosis y de vascularización (Figura II. 13. B). La evaluación de los tumores fue conducida por la Dra. Alejandra M. Scursoni, especialista en anatomía patológica. El informe histopatológico describió a todos los tumores analizados como carcinomas ductales invasivos pobremente diferenciados. Los tumores control se caracterizaban por poseer bordes infiltrativos, ulceración superficial y regiones de necrosis tumoral. Sin embargo en los tumores tratados con los distintos péptidos, era evidente una ausencia de necrosis y los márgenes de los mismos presentaban bordes expansivos.

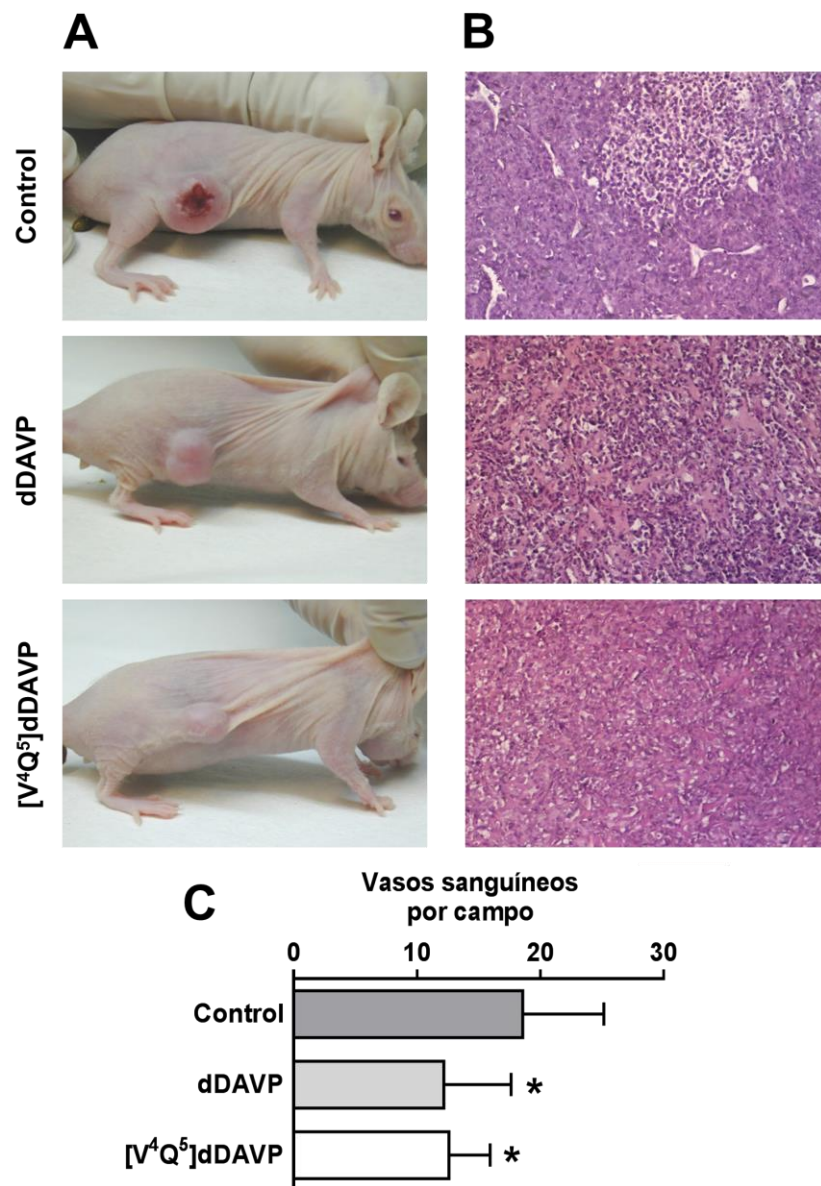


Figura II. 13. Efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la infiltración cutánea y vascularización de xenotransplantes de cáncer mamario. (A) fotografías representativas de xenotransplantes MDA-MB-231 creciendo en el flanco subcutáneo de ratones atímicos tratados con vehículo salino (control), dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP tres veces por semana (0.3 µg/kg i.v.). (B) imágenes representativas de muestras de tejido tumoral teñidas mediante H&E pertenecientes a los distintos grupos experimentales. (C) cuantificación de la densidad microvascular intratumoral. Datos expresados como promedio ± SD. 8-9 animales por grupo experimental. *, P<0.05 *versus* control. ANOVA contrastado con Tukey.

Como también se observa en la Figura II. 13. B, xenotransplantes MDA-MB-231 tratados con $[V^4Q^5]dDAVP$ o $dDAVP$ mostraron una menor vascularización tumoral. Los animales tratados con solución salina (control) presentaron zonas peri- e intratumorales de alta densidad vascular, con vasos sanguíneos de gran calibre y de morfología irregular. La cuantificación de la densidad vascular intratumoral (Figura II. 13. C) reveló una reducción del 30% en el número de vasos sanguíneos en animales tratados con los distintos análogos peptídicos. Estos resultados confirman las propiedades antiangiogénicas de $[V^4Q^5]dDAVP$ previamente descritas usando el modelo de implantación tumoral temprana. A diferencia de dicho modelo experimental, la evaluación de la carga angiogénica en este protocolo de progresión de xenotransplantes MDA-MB-231 se realiza luego de 40 días de progresión y 30 días de tratamiento, sobre tumores de gran tamaño completamente establecidos.

Expresión de V2r en xenotransplantes de cáncer mamario

Está ampliamente reportado en bibliografía, que la interacción de las células tumorales con los distintos integrantes del microambiente tumoral puede alterar drásticamente sus perfiles de expresión de proteínas y receptores de membrana en comparación a los obtenidos en sistemas de cultivo *in vitro* [196].

Para reconfirmar la presencia del blanco molecular en las células tumorales creciendo *in vivo*, una vez finalizado el protocolo, se evaluó la expresión de V2r mediante inmunohistoquímica empleando un anticuerpo primario contra el receptor V2r humano y un secundario conjugado a peroxidasa. En la Figura II. 14. A y B, se observan microfotografías a

distintos aumentos de tumores subcutáneos MDA-MB-231 creciendo en ratones tratados con vehículo salino (control). En dichos xenotransplantes, las células tumorales mostraron una marcación intensa, mayoritariamente de membrana, indicando una fuerte expresión del V2r. Notoriamente, tumores tratados trisemanalmente durante 4 semanas con $[V^4Q^5]dDAVP$, mostraron una expresión disminuída del receptor V2r en su membrana plasmática con un patrón de marcación difuso y discontinuo (Figura II. 14. C y D.) Descensos equivalentes en la intensidad de expresión del receptor fueron observados en animales tratados de manera sostenida con el péptido dDAVP (microfotografías no mostradas). Como control de expresión positivo de V2r, se utilizaron tumores MCF-7 generados de manera equivalente en ratones atímicos BALB/c *nude* (Figura II. 14. E y F.) . En estos tumores las células neoplásicas desplegaron un típico patrón de marcación membranoso, continuo e intenso. Como controles adicionales de expresión del receptor de vasopresina tipo 2, se incorporaron imágenes de cortes histológicos procesados mediante la misma técnica histológica pertenecientes a tumores de cáncer mamario humano V2r-positivo y negativo (Figura II. 14. G y H, respectivamente). Dichas imágenes fueron obtenidas en el Servicio de Patología del Sanatorio Mater Dei.

Como se mencionó previamente, tumores MDA-MB-231 pertenecientes a animales tratados sostenidamente con $[V^4Q^5]dDAVP$, desplegaron un marcado descenso en la intensidad de expresión del V2r comparados con tumores control. Vale aclarar que los animales pertenecientes al grupo $[V^4Q^5]dDAVP$, fueron tratados con el análogo peptídico dentro de las 24 horas previas al sacrificio y a la fijación de las piezas tumorales.

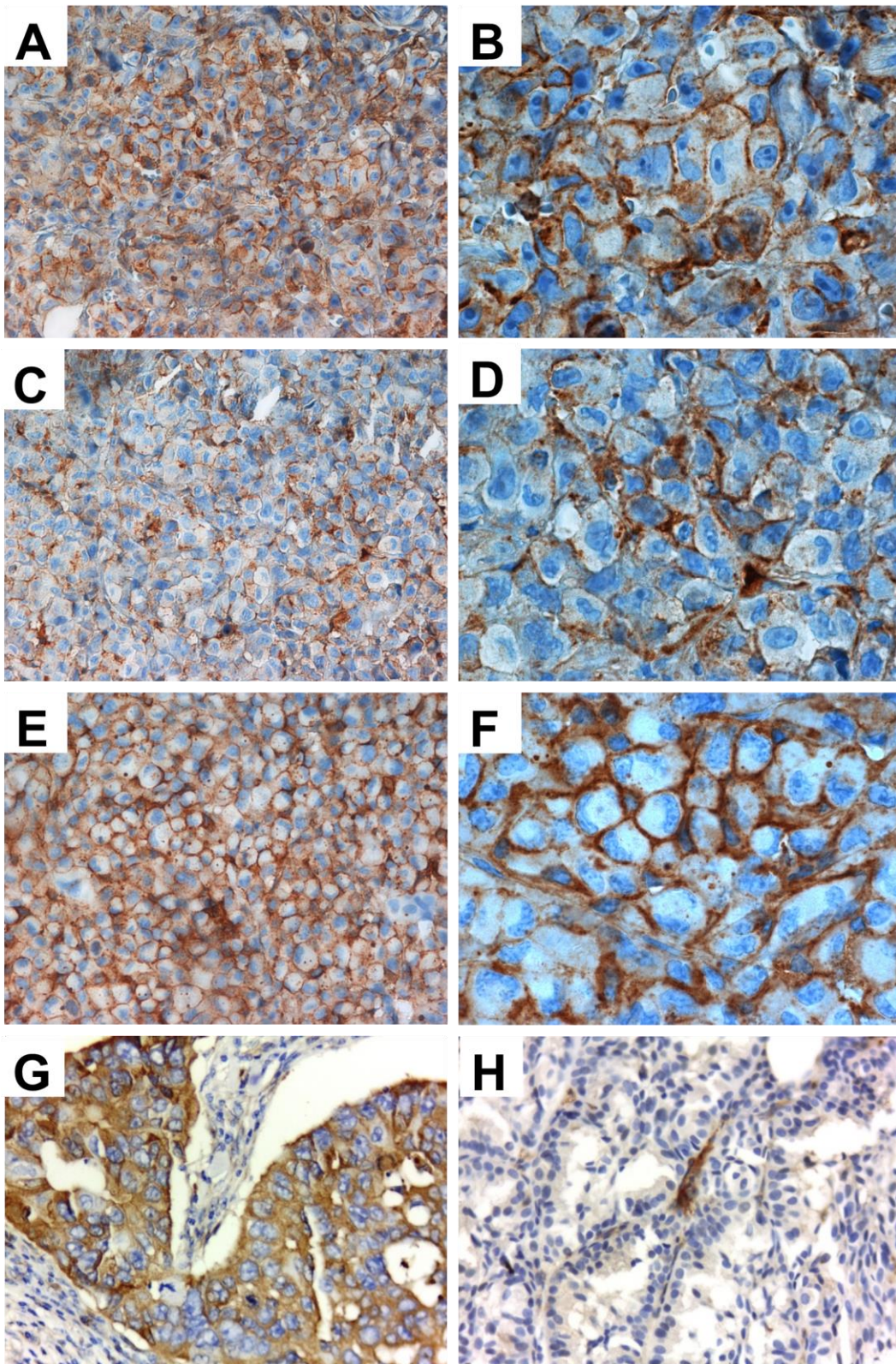


Figura II. 14. Detección del receptor de vasopresina tipo 2 (V2r) en xenotransplantes MDA-MB-231. La presencia del receptor V2r en los tumores MDA-MB-231 creciendo en ratones atímicos fue determinada por medio de IHQ empleando un anticuerpo primario contra el receptor V2r humano y un secundario conjugado a peroxidasa. Se realizó una tinción nuclear de contraste con hematoxilina. (A) y (B) imágenes de xenotransplantes MDA-MB-231 pertenecientes a animales tratados con vehículo salino (control). Aumento 400X y 1,000X respectivamente. (C) y (D) imágenes de xenotransplantes MDA-MB-231 pertenecientes a animales tratados con $[V^4Q^5]$ dDAVP empleando una dosis de 0.3 μ g/kg i.v., trisemanal durante 4 semanas. Aumento 400X y 1,000X respectivamente. (E) y (F) xenotransplante de carcinoma mamario humano MCF-7 utilizado como control positivo. Aumento 400X y 1,000X respectivamente. (G) y (H) tumores de cáncer mamario humano V2r- positivo y negativo, respectivamente. Aumento 400X.

Con el objetivo de correlacionar lo observado en los xenotransplantes con lo reportado en bibliografía, se evaluó si la estimulación de células MDA-MB-231 V2r-positivas creciendo *in vitro* con $[V^4Q^5]$ dDAVP (1,000 nM) durante 1 hora, induce cambios en el perfil de expresión del V2r. La detección del receptor en las células tumorales fue realizado mediante IF como se describió previamente.

Como se observa en la Figura II. 15, la incubación con el ligando $[V^4Q^5]$ dDAVP a alta concentración indujo un notable descenso en la intensidad de marca fluorescente en membrana y citoplasma de células MDA-MB-231, en comparación a células incubadas con el vehículo salino. Resultados equivalentes fueron observados sobre cultivos de células MCF-7 (Datos no mostrados).

Si bien estos hallazgos indicarían que la exposición crónica a ligandos como $[V^4Q^5]$ dDAVP modularía la expresión en la superficie de las células tumorales y el tráfico intracelular de V2r, no se pueden descartar otros mecanismos de regulación.

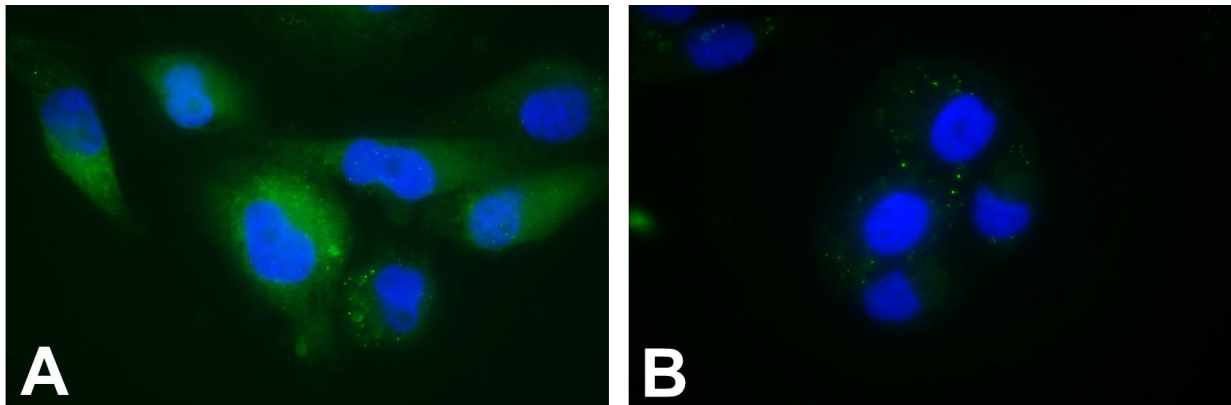


Figura II. 15. Efecto de la incubación con [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la expresión del receptor de vasopresina V2r en células MDA-MB-231. La presencia del receptor V2r en las células tumorales fue determinada mediante inmunofluorescencia empleando un anticuerpo primario dirigido contra V2r y un anticuerpo secundario conjugado a FITC. Los núcleos fueron marcados con DAPI. (A) imágenes representativas de células MDA-MB-231 control. (B) células MDA-MB-231 incubadas durante 1 hora con [V⁴Q⁵]dDAVP (1,000 nM). Aumento 1,000X.

Resumen de resultados - Capítulo II

- El tratamiento *in vitro* con el nuevo péptido sintético [V⁴Q⁵]dDAVP redujo la proliferación de células de cáncer mamario humano V2r-positivas.
- Dicho efecto citostático pudo ser completamente revertido mediante el bloqueo con un antagonista selectivo del V2r, indicando su participación en la señalización antiproliferativa.
- La capacidad de [V⁴Q⁵]dDAVP de modular el crecimiento de células tumorales *in vitro* fue corroborado en cultivos clonogénicos y en 3D.
- La actividad antimitogénica se asoció a un arresto del ciclo celular y a señalización mediada por aumentos en los niveles de AMPc y en la actividad de PKA.
- La incubación de células tumorales mamarias con [V⁴Q⁵]dDAVP resultó en una capacidad adherente y migratoria reducida vinculada a una modulación del citoesqueleto de actina.
- [V⁴Q⁵]dDAVP redujo significativamente la migración y morfogénesis capilar de células microvasculares *in vitro* y la inducción angiogénica temprana mediada por células tumorales *in vivo*.
- El tratamiento sostenido utilizando dosis clínicamente relevantes de [V⁴Q⁵]dDAVP en ratones atímicos portadores de xenotransplantes de cáncer mamario humano inhibió el crecimiento tumoral, modulando su agresividad y vasculatura asociada.
- Tanto en escenarios *in vitro* como *in vivo*, [V⁴Q⁵]dDAVP desplegó una eficacia antitumoral aumentada con respecto al péptido parental dDAVP sobre distintos modelos preclínicos relevantes de carcinoma mamario humano.

Capítulo III

Efectos antitumorales de $[V^4Q^5]$ dDAVP en combinación con quimioterapia sobre xenotransplantes de cáncer mamario humano

El cáncer mamario triple negativo representa un claro desafío clínico debido a su baja tasa de respuesta a terapia endócrina y terapias dirigidas. Las estrategias terapéuticas de primera línea actuales incluyen la combinación de diversos agentes quimioterápicos, incluyendo al intercalante de ADN doxorubicina, el alquilante de ADN ciclofosfamida y a la droga citoesquelética paclitaxel. [197].

A pesar del progreso evidente sobre la mortalidad global, la eficacia de la quimioterapia parece haber alcanzado una meseta en el escenario adyuvante [198]. La combinación de agentes quimioterápicos tradicionales con péptidos novedosos tales como $[V^4Q^5]$ dDAVP, caracterizados por su alta selectividad, capacidad biomoduladora y baja toxicidad, resulta un desafío atractivo.

La evaluación preclínica de $[V^4Q^5]$ dDAVP hasta aquí realizada reveló un marcado efecto sobre la diseminación metastásica en un modelo hormono-independiente altamente agresivo, y una interesante actividad antitumoral y antiangiogénica sobre tumores de cáncer mamario triple negativos.

Previamente en mi tesina de licenciatura reporté por primera vez los beneficios terapéuticos de la combinación de $[V^4Q^5]$ dDAVP con el quimioterápico carmustina, un agente alquilante utilizado como tratamiento de tercera línea en pacientes con cáncer mamario. Dicho régimen de tratamiento combinado resultó en una inhibición cooperativa sobre el

crecimiento y progresión de tumores mamarios murinos F3II en ratones singénicos [161].

En el presente capítulo se buscó explorar a nivel preclínico, protocolos de tratamiento en cáncer mamario humano triple-negativo MDA-MB-231 basados en la combinación del nuevo análogo $[V^4Q^5]dDAVP$ con la droga citotóxica y antimetabólica paclitaxel. Estos estudios preclínicos se abordaron con la intención de caracterizar y extender las posibles aplicaciones concretas de $[V^4Q^5]dDAVP$ en oncología. Se supone que un compuesto citotóxico o citostático verá mejorado su efecto antineoplásico al actuar en combinación con un agente modulador del comportamiento biológico tumoral con propiedades antimetastásicas y antiangiogénicas.

Efecto antiproliferativo de $[V^4Q^5]dDAVP$ combinado a paclitaxel

Previo a evaluar los potenciales efectos cooperativos de $[V^4Q^5]dDAVP$ en combinación a quimioterapia, se estudió la sensibilidad de la línea celular MDA-MB-231 al quimioterápico paclitaxel. Se analizó la dosis-respuesta de la droga por medio de ensayos de proliferación celular a 72 horas utilizando un rango de concentraciones de 0.5 hasta 20 nM. Luego de revelar el ensayo, se observó un efecto citotóxico concentración-dependiente de paclitaxel sobre el crecimiento en fase exponencial de células MDA-MB-231 obteniendo un valor IC_{50} de 11.5 nM (Figura III. 1. A).

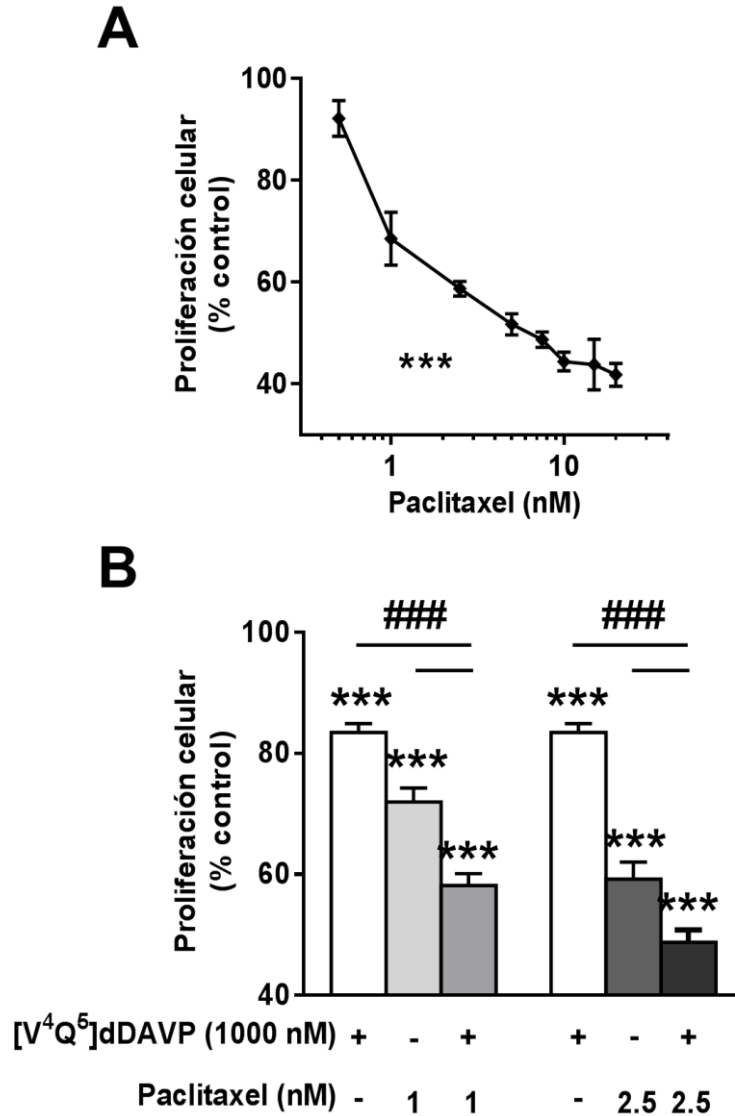


Figura III. 1. Efecto antiproliferativo de [V⁴Q⁵]dDAVP combinado a paclitaxel sobre células de carcinoma mamario humano. (A) efecto citotóxico concentración-dependiente del quimioterápico paclitaxel sobre el crecimiento en fase exponencial de células MDA-MB-231 ($IC_{50} = 11.5$ nM). A partir de 1 nM todas las concentraciones inducen una disminución de la proliferación. (B) inhibición de la proliferación de células MDA-MB-231 incubadas durante 72 horas con [V⁴Q⁵]dDAVP (1,000 nM) combinado o no a concentraciones sub- IC_{50} de paclitaxel (1 y 2.5 nM). Los valores se expresan como promedio $\pm$ SEM. ***, $P < 0.001$ versus control, ###, $P < 0.001$ [V⁴Q⁵]dDAVP combinado con paclitaxel versus tratamientos individuales. ANOVA contrastado con Tukey.

Para comenzar a evaluar si la combinación de $[V^4Q^5]dDAVP$ con drogas citotóxicas aporta beneficios terapéuticos adicionales con respecto a los tratamientos individuales, se incubaron las células MDA-MB-231 con $[V^4Q^5]dDAVP$ junto a concentraciones sub- IC_{50} de paclitaxel. Mientras que los tratamientos con $[V^4Q^5]dDAVP$ (1,000 nM) o paclitaxel (1 nM) inhibieron la proliferación en un 17 y 28% respectivamente, la reducción del crecimiento obtenida en células coincubadas con ambas drogas fue del 42%. Estos ensayos revelaron un claro efecto cooperativo, en donde ambas terapias combinadas fueron significativamente superiores contrastadas con los tratamientos individuales (Figura III. 1. B).

Modulación de $[V^4Q^5]dDAVP$ en combinación con paclitaxel sobre la formación de colonias en 2D

A continuación se evaluó la combinación de drogas sobre cultivos celulares a baja densidad mediante el ensayo de crecimiento clonogénico en 2D. Como se observa en la Figura III. 2. A, concentraciones equivalentes a las empleadas en los ensayos de proliferación celular desplegaron efectos antitumorales más notorios en este modelo experimental. Nuevamente se evidenció un claro efecto cooperativo sobre el crecimiento *in vitro* de células tumorales, en donde se observa una inhibición del 65% en la formación de colonias en cultivos tratados durante 7 días con $[V^4Q^5]dDAVP$ combinado con paclitaxel comparado contra el grupo control. Ambos tratamientos individuales lograron reducir significativamente el número de colonias formadas en valores cercanos al 40%.

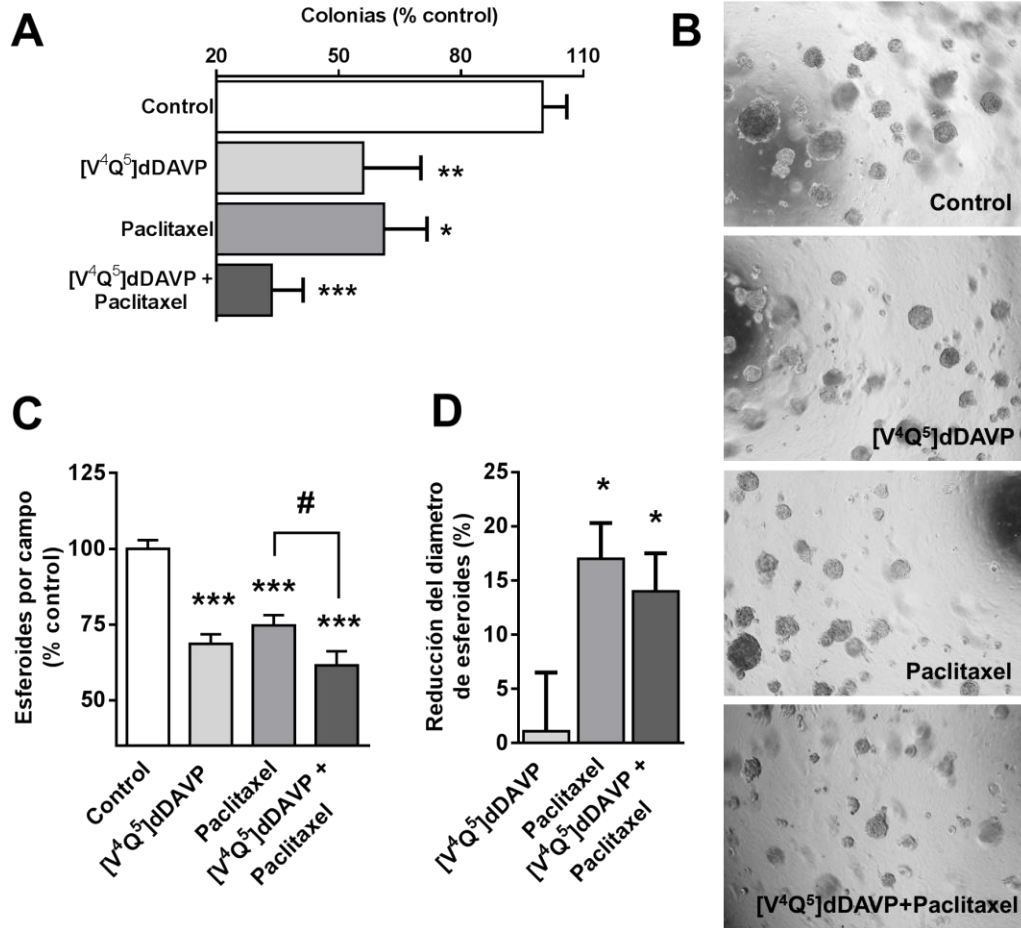


Figura III. 2. Modulación de [V⁴Q⁵]dDAVP en combinación con paclitaxel sobre la formación de colonias y el crecimiento tridimensional de células de cáncer mamario humano. (A) efecto combinatorio de [V⁴Q⁵]dDAVP (1,000 nM) y paclitaxel (1 nM) sobre cultivos clonogénicos de células MDA-MB-231. Luego de 7 días de incubación, las colonias son fijadas, teñidas y cuantificadas utilizando microscopía óptica. (B), (C) y (D) efecto sobre la formación y crecimiento de esferoides de células MDA-MB-231 embebidos en Matrigel™. Luego de 14 días de tratamiento con [V⁴Q⁵]dDAVP (1,000 nM) combinado o no a paclitaxel (1 nM), los cultivos tridimensionales son fotografiados a alta resolución (B) y se cuantifica el número (C) y diámetro (D) de los esferoides. Aumento 40X. Los valores se expresan como promedio ± SEM. * P< 0.05, ** P< 0.01 y ***P< 0.001 versus control. #P< 0.05 [V⁴Q⁵]dDAVP combinado con paclitaxel versus paclitaxel. ANOVA contrastado con Tukey.

Efecto de [V⁴Q⁵]dDAVP en combinación con paclitaxel sobre el crecimiento de colonias 3D

Previo a estudiar los efectos cooperativos en modelos animales preclínicos, se buscó evaluar el efecto combinatorio del análogo peptídico y paclitaxel en un modelo de crecimiento *in vitro* con mayor correlación a escenarios *in vivo*. Con este objetivo se utilizó un ensayo de esferoides tumorales en EMB (detallado en Materiales y Métodos). Células MDA-MB-231 fueron sembradas en MatrigelTM a baja densidad junto a D-MEM suplementado con SFB, en presencia o ausencia de las distintas combinaciones de drogas durante 14 días.

La cuantificación del número de colonias tridimensionales reveló que los tratamientos con [V⁴Q⁵]dDAVP, paclitaxel o ambos combinados inhibieron significativamente la formación de esferoides multicelulares en 31, 25 y 39% respectivamente, comparado contra el grupo control. Si bien el efecto sobre el número de colonias 3D en el grupo con tratamiento combinado es mayor a ambas monoterapias, solo alcanza la significación estadística en el caso de la monoterapia basada en taxano (Figura III. 2. B).

Adicionalmente, también se cuantificó el diámetro de los esferoides formados en el EMB. El tratamiento con paclitaxel, tanto como monoterapia o en combinación con [V⁴Q⁵]dDAVP logró la reducción significativa del tamaño de las colonias 3D en las condiciones experimentales ensayadas (Figura III. 2. C).

Efecto de $[V^4Q^5]$ dDAVP sumado a paclitaxel sobre la progresión de xenotransplantes de cáncer mamario humano

Se generaron xenotransplantes de cáncer mamario humano MDA-MB-231 en ratones atímicos BALB/c (detallado en Materiales y Métodos) para explorar los efectos cooperativos *in vivo* del nuevo análogo peptídico $[V^4Q^5]$ dDAVP en combinación a quimioterapia basada en paclitaxel. El tratamiento consistió en 3 dosis semanales de $[V^4Q^5]$ dDAVP de 0.3 µg/kg i.v. combinadas o no a dosis semanales subóptimas de paclitaxel de 10 mg/kg i.p. durante 6 semanas. Dicha dosis de paclitaxel fue seleccionada según lo reportado en bibliografía para inducir efectos discretos o limitados sobre el crecimiento tumoral y así notar el potencial beneficio terapéutico tras la combinación con $[V^4Q^5]$ dDAVP [199-201].

En la Figura III. 3. A se observan las curvas de crecimiento tumoral para los distintos grupos experimentales. Aproximadamente a día 14 se detectaron los primeros prendimientos tumorales, dando comienzo a los distintos tratamientos. Los tumores subcutáneos de referencia pertenecientes al grupo control evidenciaron una mayor latencia en comparación al protocolo descrito al final del Capítulo II.

A partir del día 40 los volúmenes tumorales de los animales tratados con vehículo salino (control) comenzaron a diferenciarse con respecto a los volúmenes reportados en los grupos tratados con $[V^4Q^5]$ dDAVP, solo o combinado a quimioterapia.

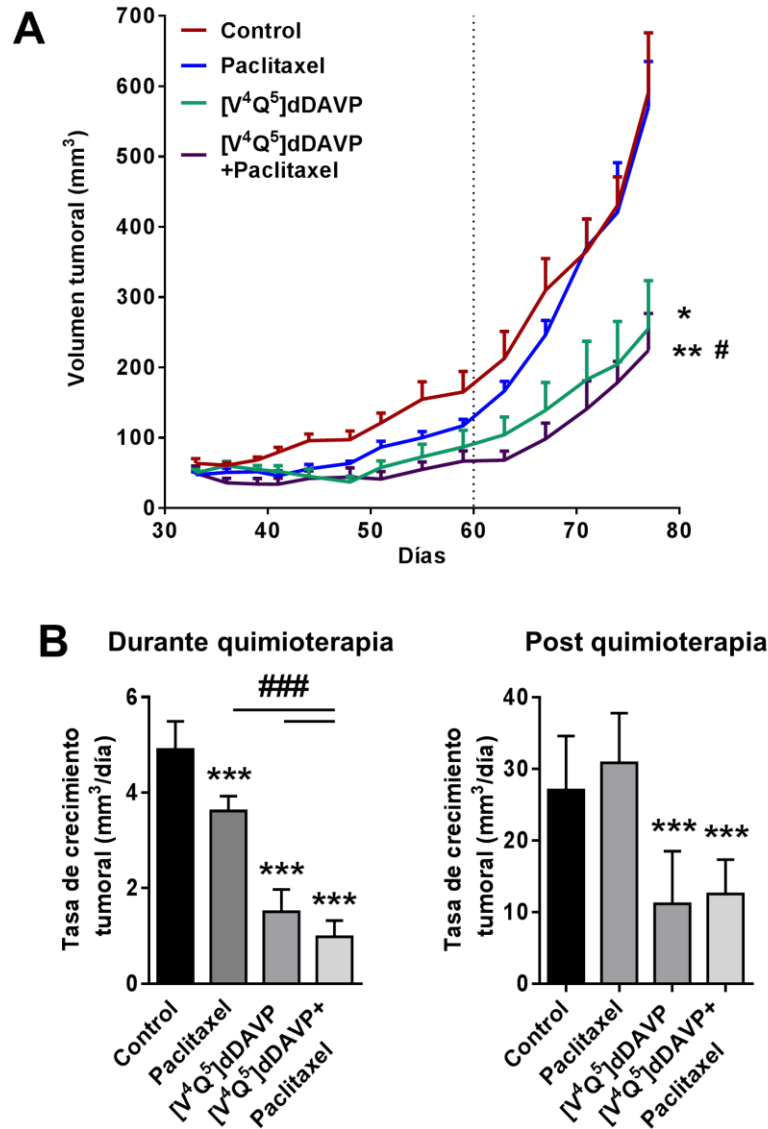


Figura III. 3. Efecto sobre la progresión tumoral de [V⁴Q⁵]dDAVP combinado a paclitaxel sobre xenotransplantes de cáncer mamario humano. Células MDA-MB-231 fueron inoculadas en el flanco de ratones atímicos BALB/c *nude* y 14 días después los animales fueron tratados con [V⁴Q⁵]dDAVP tres veces por semana (0.3 µg/kg i.v.) hasta el fin del protocolo, combinado o no a dosis semanales de 10 mg/kg i.p. de paclitaxel durante 6 semanas. (A) curvas de crecimiento tumoral de los distintos grupos experimentales. La línea punteada a día 60 indica finalización del tratamiento con paclitaxel en los grupos experimentales correspondientes. (B) tasas de crecimiento tumoral de los diferentes grupos experimentales entre los días 33-63 (tratamiento combinado con quimioterapia), y 63-77 (tratamientos sostenidos de [V⁴Q⁵]dDAVP). *P<0.05; **P<0.01 y ***P<0.001 versus control. #P<0.05 [V⁴Q⁵]dDAVP combinado a paclitaxel versus paclitaxel; ###P<0.001 [V⁴Q⁵]dDAVP combinado a paclitaxel versus tratamientos individuales. ANOVA contrastado con Tukey.

A día 77, se observó que el tratamiento sostenido con $[V^4Q^5]dDAVP$, tanto como monoterapia o en combinación a paclitaxel logró una reducción estadísticamente significativa de aproximadamente 60% del volumen tumoral final comparado con el grupo control.

En contraste, el tratamiento con dosis subóptimas de paclitaxel durante 6 semanas no tuvo impacto en la carga tumoral final evaluada 4 semanas posterior al cese del régimen de tratamiento con taxano. Estos resultados están en línea con lo reportado en bibliografía, donde dosis entre 10 y 25 mg/kg fueron evaluadas sobre la progresión de distintos carcinomas creciendo en ratones atímicos. Mientras que las altas dosis se asociaron a una drástica inhibición del crecimiento tumoral y una alta morbilidad en los animales tratados, las dosis cercanas a 10 mg/kg no desplegaron propiedades antitumorales ni signos claros de toxicidad [199, 200].

Como se observa en la curva de crecimiento tumoral, la adición de paclitaxel al tratamiento sostenido de $[V^4Q^5]dDAVP$, no aportó mayores beneficios terapéuticos, al menos sobre el volumen final de los xenotransplantes.

Sin embargo, si se analizan las tasas de crecimiento durante la administración de la quimioterapia, los resultados obtenidos indicaron un efecto cooperativo durante el período de administración entre el análogo peptídico y el paclitaxel sobre la la velocidad a la cual los tumores progresan (Figura III. 3. B). Adicionalmente, inmediatamente luego de los 6 ciclos de quimioterapia (día 59), los tumores tratados con $[V^4Q^5]dDAVP$ en combinación a paclitaxel fueron los únicos en desplegar un volumen promedio significativamente menor en comparación al grupo control ($P<0.05$).

Una vez finalizado el régimen de administración de paclitaxel, se observó que el tratamiento responsable de limitar las tasas de crecimiento es únicamente el tratamiento sostenido con $[V^4Q^5]dDAVP$ (Figura III. 3. C).

Modulación de la infiltración tumoral

Una semana posterior a la última administración de quimioterapia, se evidenció ulceración, invasión y necrosis en la mayoría de los xenotransplantes pertenecientes al grupo tratado con paclitaxel como monoterapia. Como se observa en la Figura III. 4, los animales tratados con vehículo salino o $[V^4Q^5]dDAVP$ mostraron una preservación de las capas superficiales de la piel. Sorprendentemente, la administración de $[V^4Q^5]dDAVP$ en el grupo combinando terapia peptídica y taxano, logró revertir el fenotipo necrótico y ulcerante de los tumores tratados con terapia citotóxica.

La capacidad de los análogos de vasopresina de modular la agresividad de los implantes tumorales, está en línea con lo descrito al final del capítulo II y en publicaciones previas del grupo [143, 161].



Figura III. 4. Xenotransplantes subcutáneos de cáncer mamario humano MDA-MB-231 creciendo en ratones atímicos. Las fotografías fueron tomadas a día 80 y muestran tumores subcutáneos de células de cáncer mamario triple-negativo MDA-MB-231 representativos de los distintos grupos experimentales.

Efecto sobre la sobrevida de ratones atímicos portadores de xenotransplantes de cáncer mamario

Con el objetivo de evaluar sobrevida, los animales fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron un volumen de 1,000 mm³ o luego de 4 meses de protocolo, según reportado en bibliografía [172, 173]. Como se indica en las curvas de sobrevida estimadas mediante Kaplan-meier (Figura III. 5), a día 80 se sacrificaron los primeros ratones con tumores mayores a 1,000 mm³ pertenecientes al grupo control y paclitaxel. Los animales de los grupos experimentales control, paclitaxel, [V⁴Q⁵]dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP combinado a paclitaxel desplegaron valores de sobrevida media de 85, 87, 100 y 104 días, respectivamente, siendo los últimos dos los que alcanzaron

una diferencia estadísticamente significativa contra el grupo control. Transcurridos 120 días desde el desafío tumoral, solo un animal presentaba un xenotransplante con un volumen inferior a $1,000 \text{ mm}^3$ perteneciente al grupo $[V^4Q^5]dDAVP$ combinado a paclitaxel.

El tratatamiento sostenido de $[V^4Q^5]dDAVP$ vía i.v. durante 11-15 semanas utilizando dosis clínicamente relevantes, no mostró signos evidentes de toxicidad en ratones atímicos (datos no mostrados). Si bien es la primera vez que un protocolo de tratamiento se extiende durante tanto tiempo, estas observaciones están en línea con lo descrito al final de los Capítulos I y II en ratones BALB/c inmunocompetentes e inmunocomprometidos, respectivamente.

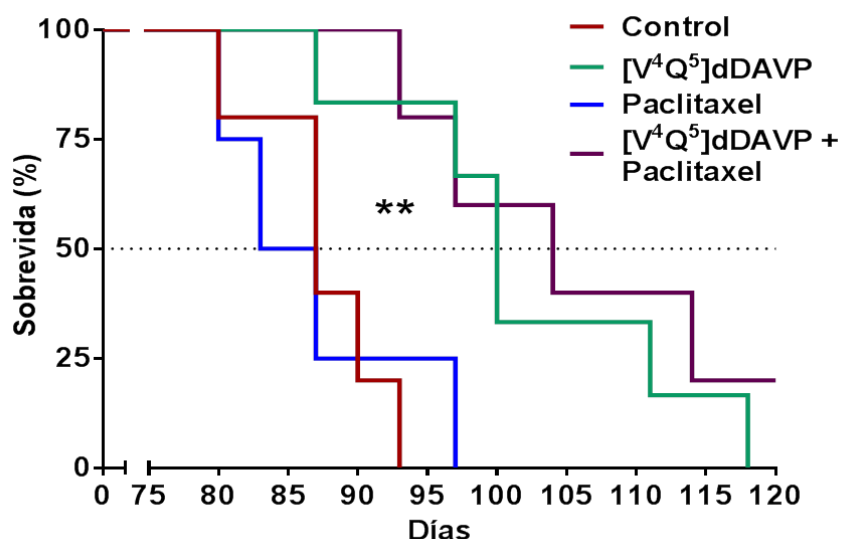


Figura III. 5. Efecto de $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre la supervivencia de ratones inmunodeprimidos portadores de xenotransplantes MDA-MB-231. Supervivencia de los animales en los distintos grupos experimentales visualizada mediante el estimativo Kaplan-meier. Los ratones fueron sacrificados una vez que los tumores progresaron hasta alcanzar un volumen de $1,000 \text{ mm}^3$ o una vez transcurridos 120 días desde el desafío tumoral. ****P<0.01 $[V^4Q^5]dDAVP$ o $[V^4Q^5]dDAVP$ combinado a paclitaxel *versus* control.** Log-rank test (Mantel Cox), $X^2 > 7.2$.

Resumen de resultados - Capítulo III

- Se han explorado por primera vez los efectos antitumorales de [V⁴Q⁵]dDAVP en combinación a quimioterapia sobre células de cáncer mamario humano.
- [V⁴Q⁵]dDAVP combinado a paclitaxel desplegó un efecto inhibitorio cooperativo sobre la proliferación de células MDA-MB-231 creciendo a alta densidad y un rotundo efecto aditivo sobre la formación de colonias en 2D.
- La asociación con quimioterapia basada en paclitaxel mostró una disminución de la tasa de crecimiento tumoral y la ulceración causada por tratamiento citotóxico.
- El tratamiento sostenido con [V⁴Q⁵]dDAVP, combinado o no a dosis subóptimas de paclitaxel, produjo una disminución del 60% de la carga tumoral y un aumento en la sobrevida media.
- La dosis de paclitaxel utilizada tuvo un impacto leve y transitorio sobre el crecimiento tumoral y la sobrevida de los animales.

Discusión

Acciones directas de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre el crecimiento y la motilidad celular

Hace aproximadamente 20 años, North *et al.*, propusieron por primera vez a los genes relacionados a la vasopresina y sus receptores como blancos interesantes para el tratamiento del cáncer mamario, luego que su presencia fuera detectada mediante inmunohistoquímica en todos los subtipos de cáncer de mama [181]. Dado que la expresión de vasopresina se encontró en todos los casos analizados de carcinomas mamarios *in situ* preinvasivos, y no así en tejido mamario normal o en hiperplasias atípicas, se ha considerado que la expresión de dicha hormona podría representar parte de la transformación oncogénica temprana en tejido mamario. La vasopresina, estimula la proliferación celular al ser secretada de forma autócrina por las células tumorales mamarias. Los efectos promitogénicos de dicha hormona estarían mediados principalmente por el receptor V1r [131]. En contraste, el V2r, también miembro de la familia de receptores de vasopresina, se asocia a efectos antiproliferativos y a mecanismos de control de crecimiento celular [132, 133].

Como se ha descripto previamente, a diferencia de la hormona vasopresina que tiene la capacidad de unirse a toda la familia de receptores de vasopresina, dDAVP es un agonista selectivo del receptor V2r. Según lo reportado en bibliografía, dicho agonista peptídico desplegaría un efecto dual antimetastásico y antiangiogénico al actuar sobre los receptores presentes en la microvasculatura y las células tumorales, interrumpiendo las interacciones cooperativas entre el tumor y el endotelio durante la progresión tumoral [102]. Debido a su interesante actividad antitumoral [142, 144, 146, 147], así como también su actividad hemostática [115], péptidos

como dDAVP son consideradas moléculas líderes sumamente interesantes para el desarrollo de nuevas drogas con actividad antitumoral aumentada. En el presente trabajo, se caracterizó y comparó la efectividad antitumoral preclínica del nuevo análogo $[V^4Q^5]$ dDAVP con su péptido parental dDAVP. $[V^4Q^5]$ dDAVP, se obtuvo a partir del diseño y síntesis de un panel de péptidos derivatizados portando distintas modificaciones en el ciclo conformacional de la molécula [157].

Como fue descripto en el Capítulo II de Resultados, la incubación de células cancerosas mamarias V2r-positivas creciendo en etapa exponencial con $[V^4Q^5]$ dDAVP resultó en una inhibición moderada de la proliferación celular, tanto en células cancerosas mamarias hormono-dependientes como células agresivas triple-negativas. El bloqueo químico de V2r mediante el uso de tolvaptan revirtió completamente el efecto antiproliferativo de $[V^4Q^5]$ dDAVP en ambas líneas celulares, indicando que la reducción del crecimiento celular *in vitro* resultaría principalmente de la activación del V2r . Estos resultados están en línea con lo reportado por Keegan *et al.*, en donde los efectos citostáticos de dDAVP sobre células de carcinoma mamario humano fueron bloqueados usando satavaptan, otro antagonista selectivo de V2r [130].

La capacidad de $[V^4Q^5]$ dDAVP de modular el crecimiento *in vitro* de células tumorales fue confirmado en un modelo clonogénico en dos dimensiones, y en modelos de cultivos tridimensionales de esferoides. Desplegando un IC_{50} de 1,130 nM, $[V^4Q^5]$ dDAVP inhibió drásticamente el crecimiento de cultivos a baja densidad, reduciendo hasta un 75% la formación de colonias, desplegando una actividad citostática exacerbada en comparación a dDAVP. Si bien los efectos sobre los modelos de cultivo 3D no fueron tan rotundos, $[V^4Q^5]$ dDAVP logró una reducción significativa en el

establecimiento y crecimiento de esferoides de células de CMTN MDA-MB-231. Estos resultados podrían indicar que el tratamiento sostenido con $[V^4Q^5]dDAVP$ modularía la formación de colonias tumorales, y podrían afectar etapas tempranas del establecimiento de células tumorales residuales, y su posterior progresión a micrometástasis.

La acción antiproliferativa de $[V^4Q^5]dDAVP$ se asoció a un arresto del ciclo celular y a vías de señalización vinculadas a la activación de V2r, incluyendo un aumento en los niveles intracelulares de AMPc y un aumento en la actividad quinasa de PKA. Se conoce que la estimulación del receptor V2r, tanto en células del endotelio vascular como en algunas células transformadas, genera una activación de la AC y la PKA. La activación de la AC, la cual se encuentra anclada a la cara interna de la membrana celular, se produce por la interacción con la subunidad α_s de la proteína G asociada al receptor [130]. La PKA es una enzima extremadamente promiscua con respecto a sus sustratos moleculares. Actúa sobre la membrana plasmática, el citoplasma, las mitocondrias, el núcleo y sobre toda la red citoesquelética, incluyendo microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos de actina. La desregulación de su actividad, sea por inactivación o sobreestimulación, altera profundamente la proliferación y los fenómenos de migración e invasión de células normales y transformadas [202, 203].

Muchos autores han descripto al eje AC/AMPc/PKA como una vía de señalización antiproliferativa [136-138, 204]. Se ha demostrado que aumentos en los niveles de AMPc intracelular inhiben la proliferación celular al bloquear las señales entre dos proteínas oncogénicas claves para el desarrollo tumoral denominadas Ras y Raf-1. Concentraciones elevadas de AMPc inducen una fosforilación mediada por PKA de Raf, así inhibiendo su

activación y bloqueando la cascada mitogénica [205]. Adicionalmente Naviglio *et al.* reportaron que agentes que inducen aumentos en los niveles intracelulares de AMPc en células de cáncer mamario revierten los efectos proliferativos de la leptina, una hormona que actúa como factor mitogénico y de supervivencia en muchas estirpes celulares tumorales. La reversión de este efecto está caracterizada, entre otras cosas, por descensos en las concentraciones de las proteínas moduladoras del ciclo celular ciclina D1 y A, y la proteína antiapoptótica Bcl-2. Al modular negativamente estas proteínas las células se arrestan en la fase G₁ y se induce la apoptosis. Adicionalmente estos efectos antimitogénicos fueron bloqueados usando el inhibidor de PKA KT-5720 [138]. En paralelo, Cassoni *et al.* demostraron que la oxitocina, un neuropéptido de casi idéntica composición aminoacídica que la vasopresina, inhibe la proliferación de células de carcinoma mamario humano MDA-MB-231 vía AC y PKA. Consecuentemente, dicho efecto antimitogénico fue completamente abolido mediante la incubación con inhibidores de PKA [134, 135].

En función a toda esta evidencia se podría postular que la acción antiproliferativa de los análogos de vasopresina, al menos sobre los modelos de carcinoma mamario estudiados, estaría mediada por el sistema AC/AMPc/PKA, que ha demostrado tener la capacidad de bloquear múltiples cascadas promitogénicas, arrestar el ciclo celular e inducir apoptosis. Debido a las múltiples asociaciones que se han encontrado entre la señalización mediada por AMPc en células malignas y la muerte celular programada, es mandatorio estudiar si particularmente [V⁴Q⁵]dDAVP tiene la capacidad de modular eventos relacionados a la apoptosis y sus proteínas asociadas.

Se debe aclarar que, si bien existe un gran número de trabajos reportando el rol antimitogénico de la activación de la AC y la PKA, la señalización vía AMPc es sumamente ubicua y dicotómica, y su resultado depende, entre otros factores, del contexto fisiológico, tejido y compartimiento celular donde se dispara la respuesta, y el tipo de ligando que la dispara [137]. En esta regulación espacio-temporal se ponen en juego otras moléculas efectoras del AMPc tales como los factores de intercambio nucleotídicos Epac1/2, y las proteínas de andamiaje AKAPs. Adicionalmente, los niveles intracelulares de AMPc son regulados por procesos de degradación y extrusión mediados por PDEs y MRPs, respectivamente. En cáncer mamario se ha reportado un aumento en la expresión y actividad de PDEs, así como también una sobreexpresión de la MRP-5 [110]. De manera interesante, la inhibición química combinada de PDE y MRP, y la consecuente acumulación de AMPc intracelular, puede maximizar el arresto del ciclo celular e inducir la diferenciación en células tumorales incubadas con agonistas de otros receptores de la familia GPCR [206]. Se propone continuar los estudios sobre la señalización celular involucrando los distintos efectores de AMPc y PKA para dilucidar con mayor grado de detalle las vías involucradas en los efectos antimitogénicos de los análogos de vasopresina sobre células de carcinoma mamario. Sería particularmente interesante estudiar la combinación de los péptidos [V⁴Q⁵]dDAVP y dDAVP junto a distintos inhibidores de PDEs y/o MRPs, y evaluar su impacto sobre las células cancerosas.

Por otro lado se evaluó el impacto de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la adhesión y la migración celular. Dichos fenómenos biológicos ponen en juego mecanismos moleculares específicos que involucran la unión entre proteínas de membrana, ligandos presentes en el espacio extracelular y el citoesqueleto de actina. El tratamiento *in vitro* con los distintos análogos

peptídicos redujo notablemente la capacidad adhesiva y migratoria de células tumorales mamarias. La incubación de células tumorales con $[V^4Q^5]dDAVP$ usando concentraciones altas logró inhibir hasta un 80% la motilidad celular, desplegando un mayor efecto inhibitorio que su péptido parental dDAVP.

Dado que la migración celular está estrechamente regulada por los cambios espacio-temporales del citoesqueleto de actina y está ampliamente aceptado la participación del eje AC/AMPC/PKA como un sistema regulador de este proceso [191, 193], se evaluó si la inhibición de la motilidad celular provocada por la incubación con $[V^4Q^5]dDAVP$ se vincula con cambios en el citoesqueleto de actina. Los efectos antimigratorios y antiadhesivos pudieron ser correlacionados con una modulación de la dinámica del citoesqueleto de actina. Tanto el tratamiento con $[V^4Q^5]dDAVP$ como con dDAVP, resultó en una acumulación cortical de actina y una inhibición en la formación de haces de actina filamentosa tras la estimulación con EGF.

Se ha reportado que el tratamiento con distintos agentes elevadores de AMPC es capaz de inhibir la migración e invasión de células tumorales al limitar la formación de protusiones de membrana y reducir el recambio de uniones focales. Utilizando activadores selectivos de Epac y PKA se observó que efectos inhibitorios sobre la maquinaria migratoria estarían asociados a PKA, mientras que Epac potenciaría la motilidad celular [207]. Distintas moléculas claves para la migración e invasión como las integrantes de la familia Rho de pequeñas GTPasas, los monómeros de actina y las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs), entre otras, son sustratos de la PKA [202]. La proteína Rho, que gobierna los procesos dinámicos de los microfilamentos, puede ser fosforilada por PKA en la Ser188 cerca a su C-terminal y perder completamente su actividad moduladora sobre el

citoesqueleto. Algo similar ocurre con la actina en su forma monomérica que al ser fosforilada por la PKA reduce su capacidad de polimerizarse [202]. La regulación de PKA sobre las PTPs y su relevancia en procesos de migración e invasión en células transformadas merecen un análisis más profundo. Las PTPs son en parte, responsables de mantener el balance de tirosinas fosforiladas y desfosforiladas en un gran número de proteínas involucradas en rutas de señalización. Mediante este mecanismo se modulan virtualmente todos los aspectos de la fisiología celular incluyendo proliferación, adhesión y motilidad [208]. Su sobreexpresión ha sido estudiada recientemente en diversos cánceres altamente invasivos y se ha relacionado con una alta incidencia de formación de metástasis en ganglios linfáticos [209]. La expresión anormal de dos subtipos de PTPs denominadas PRL-1 y 3 en células tumorales ováricas indujo un aumento en la migración *in vitro* y un incremento en la formación de tumores metastásicos en modelos animales *in vivo* [210]. Por otra parte se ha reportado en células MCF-7 que su fosforilación selectiva y posterior inactivación induce un descenso en la proliferación y migración celular y una mayor vulnerabilidad a tratamientos con antagonistas de receptores hormonales [211]. La PKA puede inactivar distintas PTPs por fosforilación directa o por activación de inhibidores selectivos de PTPs [202, 212]. Esto significa que la sobreactivación de PKA causada por estimulación con los análogos de vasopresina y la consecuente inactivación de distintas proteínas de tipo tirosina fosfatasas en la célula tumoral podría estar modulando su agresividad, limitando su capacidad migratoria.

Efectos de [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la angiogénesis y progresión tumoral

La angiogénesis es un proceso complejo en el que están involucrados numerosos elementos promotores e inhibidores del desarrollo vascular. En todo este proceso, el sistema proteolítico juega un papel primordial, ya que la degradación de la matriz no solo permite el avance migratorio de las células endoteliales, sino que libera numerosos factores moduladores de la angiogénesis anclados o contenidos en la MEC. Los sistemas fibrinolítico y proteolítico pueden regular la angiogénesis tumoral, sean inducidos desde el endotelio o desde el mismo tumor. Muchos inhibidores angiogénicos son fragmentos proteolíticos de moléculas más grandes. Entre los inhibidores más potentes se cuentan la angiostatina, la endostatina, la serpina y la antitrombina [195]. Drogas capaces de modular biológicamente la disponibilidad de factores antiangiogénicos pueden resultar en herramientas terapéuticas eficaces para el tratamiento de tumores residuales.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad del nuevo análogo [V⁴Q⁵]dDAVP de modular la angiogénesis *in vivo* inducida por células de carcinoma mamario humano MDA-MB-231 en ratones inmunocomprometidos. El tratamiento con dosis i.v. de [V⁴Q⁵]dDAVP (0.3 µg/kg) durante dos semanas redujo significativamente la respuesta vascular temprana asociada a tumor.

Recientemente, reportamos que la administración i.v. de dDAVP disminuye drásticamente la vascularización de tumores de cáncer mamario

murino F3II subcutáneos e inhibe la respuesta angiogénica temprana alrededor de implantes tumorales intradérmicos. Los resultados indicarían que dDAVP reduce la angiogénesis tumoral induciendo la producción de angiostatina, un poderoso efector antiangiogénico resultado de la proteólisis del plasminógeno mediada por células tumorales. Este aumento en la producción de angiostatina se correlaciona con un incremento en la secreción de distintas MMPs y de uPA por parte de las células tumorales incubadas con dDAVP [142].

De manera interesante, se ha reportado una producción aumentada de angiostatina en células de cáncer mamario humano tratadas con [V⁴Q⁵]dDAVP en comparación a células tratadas con el péptido parental dDAVP o con solución salina (grupo control) [162]. Sin embargo, no se pueden descartar otros posibles mecanismos que expliquen la acción antiangiogénica de dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP.

La administración sistémica de dDAVP induce una liberación rápida de FVW mediante la estimulación del V2r presente en la microvasculatura. El FVW es una gran glicoproteína multimérica plasmática que despliega un rol central en la homeostasis. Este factor actúa como proteína transportadora del FVIII y media la adhesión plaquetaria a las células endoteliales [182, 213]. Starke *et al.* reportaron que la inhibición de la expresión de FVW mediante siRNA resultaba en un aumento en la angiogénesis *in vitro* asociado a una mayor respuesta angiogénica vía VEGFR y una disminución de la liberación de Ang-2. Adicionalmente, ratones FVW-deficientes desplegaron un aumento en la densidad de vasos sanguíneos maduros, sugiriendo un rol potencial del FVW en la angiogénesis y en la normalización de la vasculatura. De hecho, es común que pacientes diagnosticados con la enfermedad de von Willebrand

(desorden congénito de sangrado caracterizado por deficiencia o disfunción del FVW) presenten angiodisplasia. Sus lesiones están caracterizadas por redes vasculares de paredes finas y frágiles con arquitectura irregular, permeabilidad aumentada y susceptibilidad a rupturas [214].

Adicionalmente, se ha reportado que la elevación de AMPc en células cancerosas agresivas mediante forskolina, dibutilil AMPc o agonistas de distintos GPCRs inhibe la mímica vasculogénica (MV). La MV involucra la habilidad de las células tumorales para expresar genes de estirpe endotelial y epitelial, y para formar redes tubulares ricas en MEC que imitan los patrones de redes vasculogénicas embrionarias. Esta modulación está dada por la activación de la vía Epac/Rap-1 independiente de PKA y la consecuente inactivación de la vía PI3K/Akt [215].

El hecho que en el presente trabajo la incubación de células microvasculares endoteliales HMVEC-L V2r-positivas con los análogos peptídicos haya resultado en la modulación de la migración y morfogénesis capilar *in vitro*, no permite descartar un impacto directo de $[V^4Q^5]$ dDAVP o dDAVP sobre el endotelio. Se ha demostrado que agentes activadores de la PKA tales como la forskolina y dibutilil AMPc modulan negativamente la migración de células del endotelio vascular *in vitro* y la angiogénesis *in vivo*. En contraste, inhibidores de PKA revierten estos efectos antimigratorios y antiangiogénicos [216]. Además, existe evidencia contundente que la activación de PKA en células endoteliales inhibe la activación de Rac, un importante miembro de la familia Rho GTPasas encargada de la formación de protusiones de membrana necesarias para el desplazamiento celular [202]. Si las células del endotelio vascular pierden su capacidad migratoria el proceso angiogénico no puede desarrollarse correctamente. De esta

manera se genera un tumor menos agresivo, pobremente irrigado y con acceso limitado a oxígeno y nutrientes.

Folkman y Kalluri propusieron un paradigma sumamente interesante con respecto al abordaje de la terapia dirigida a la vasculatura tumoral. La progresión angiogénica que permite que un tumor *in situ* se convierta en un tumor agresivo e invasivo potencialmente letal para el paciente, depende crucialmente de un balance entre los factores proangiogénicos liberados por las células malignas (VEGF, bFGF, PDGF, etc.) y la defensa antiangiogénica endógena desplegada por el huésped (endostatina, angiostatina, trombospondina-1, etc.). Si la defensa del huésped es sobrepasada por los factores secretados por el tumor, la transición hacia la malignidad se dispara. En contraste, si la defensa del huésped logra contrarrestar el estímulo angiogénico, el tumor no progresa. Esto depende tanto de la carga genética del tumor, como del microambiente tumoral. En línea con este modelo, se ha reportado que existe una baja incidencia de tumores sólidos en pacientes con Síndrome de Down, quienes presentan elevados niveles de endostatina circulante, resultado de una copia extra del cromosoma 21. Por otro lado, existe una alta incidencia de cáncer de próstata en pacientes con un polimorfismo específico en el gen codificante para endostatina. Si bien drogas como bevacizumab retrasan la progresión tumoral al interrumpir la señalización y la secreción de factores proangiogénicos, una estrategia adicional viable es estimular la defensa antiangiogénica del paciente y proveerlo de inhibidores naturales de la angiogénesis como parte de la terapia antitumoral [217].

En este sentido, la administración sistémica sostenida de [V⁴Q⁵]dDAVP podría resultar en una herramienta terapéutica sumamente interesante favoreciendo la producción de factores antiangiogénicos

endógenos mediada por las células tumorales o modulando el proceso angiogénico de manera directa sobre el endotelio.

Hasta aquí se ha discutido el impacto del tratamiento con el nuevo análogo peptídico $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre eventos clave en la biología tumoral, tales como el crecimiento celular, la adhesión y migración, y la angiogénesis. A continuación, trataremos la eficacia antitumoral de $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre xenotransplantes mamarios humanos MDA-MB-231 en ratones inmunocomprometidos BALB/c *nude*. El modelo experimental MDA-MB-231 pertenece a al tipo tumoral de CMTN que se asocia a alternativas terapéuticas limitadas y a un mal pronóstico debido a su alta tasa de recurrencia tanto locorregional como a distancia [79]. El tratamiento de $[V^4Q^5]dDAVP$ o $dDAVP$ consistió en dosis i.v. de 0.3 $\mu\text{g/kg}$ en un esquema trisemanal durante 4 semanas. Tras analizar las tasas de crecimiento de los xenotransplantes en desarrollo de los distintos grupos experimentales se observó que el tratamiento con $[V^4Q^5]dDAVP$ redujo 40% la velocidad con la cual el tumor primario progresa comparado con el grupo control. Dicha modulación sobre el crecimiento de los implantes tumorales se vio reflejada en el volumen final tumoral en donde $[V^4Q^5]dDAVP$ desplegó un efecto inhibitorio semejante. Ambos tratamientos también fueron capaces de limitar la ulceración tumoral protegiendo las capas superficiales de la piel de los animales portadores de xenotransplantes. Estos resultados confirman las evidencias previas que los análogos de vasopresina pueden modular la agresividad del tumor y retardar la necrosis epidérmica y la ulceración visible sobre el implante tumoral [143].

Esta capacidad de $[V^4Q^5]dDAVP$ de modular la progresión cancerosa podría estar relacionada a múltiples efectos de la droga al actuar de manera selectiva en los $V2r$ expresados tanto por células tumorales como endotelio.

Como fue descripto a comienzos del Capítulo II, la activación agonista del V2r en las células malignas podría desencadenar mecanismos citostáticos y antimigratorios, modulando su crecimiento e invasividad. Por otro lado, la progresión de los tumores podría verse regulada mediante una reducción de la vasculatura asociada a tumor. Esto sería respaldado por el hecho que en el presente trabajo el tratamiento con $[V^4Q^5]dDAVP$ o $dDAVP$ redujo significativamente la angiogenesis tumoral al evaluar la densidad vascular intra- y peritumoral de cortes histológicos de tumores MDA-MB-231. Como se discutió previamente, el efecto de $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre la angiogenesis tumoral podría darse por distintos mecanismos de modulación, incluyendo el efecto directo del análogo sobre células microvasculares, la acción del FVW liberado a nivel sistémico por el endotelio y la producción de factores antiangiogénicos como angiostatina en respuesta a un incremento de la actividad proteolítica de las células tumorales.

Además del accionar directo que poseen sobre el tejido endotelial vascular, se ha reportado que tanto el FVW como la angiostatina pueden interaccionar específicamente con células tumorales. A través del motivo tripeptídico Arg-Gly-Asp presente en su secuencia, FVW es capaz de unirse a la integrina $\alpha_v\beta_3$ presente en la superficie de células cancerosas. Luego de evaluar la fragmentación de ADN *in vitro*, se determinó que la incubación con FVW induce la apoptosis en distintas líneas celulares tumorales, incluyendo melanoma y carcinoma pulmonar y mamario [145, 218, 219]. Por otro lado se ha descripto la capacidad de la angiostatina de ser internalizada por las células tumorales y unirse al menos a dos proteínas mitocondriales; la malato deshidrogenasa y la ATP sintasa. Entre otros efectos, el tratamiento con angiostatina promueve la apoptosis celular, aumenta la producción de otras proteínas reguladoras del proceso angiogénico tales

como TSP-1 y regula el reclutamiento de células estromales protumorigénicas [73].

Una vez finalizado el protocolo de progresión tumoral se observó que tumores pertenecientes a animales tratados durante 4 semanas con $[V^4Q^5]dDAVP$, mostraron una expresión disminuída del receptor V2r en su membrana plasmática comparado con el grupo control, desplegando un patrón de marcación difuso y discontinuo. Se ha reportado previamente que dDAVP puede inducir taquifilaxis si es administrada diariamente vía i.v. de manera sostenida [115]. Es por eso que durante esquemas de tratamiento prolongados se evitó la administración diaria de los péptidos y se optó por tratamientos trisemanales. Se debe considerar que las piezas tumorales analizadas fueron extraídas y fijadas para IHQ dentro de las 24 horas posteriores a la última administración sistémica de $[V^4Q^5]dDAVP$. Sería interesante estudiar el patrón de expresión de V2r en los tumores luego de 48-72 horas desde el último tratamiento y evaluar si los niveles de V2r son restituidos y son comparables a los observados en los tumores control.

El descenso de marcación de V2r en respuesta al desafío con $[V^4Q^5]dDAVP$ fue también observado *in vitro* mediante inmunofluorescencia. La reducción de la expresión del V2r, estaría asociada a una internalización del receptor mediada por la unión con arrestinas luego de la estimulación con el ligando. Sin embargo la interacción del complejo receptor-ligando con arrestinas no induciría un cese en la señal intracelular disparada. La señalización vía AMPc puede ser terminada por la unión con un complejo soluble heterotrimérico denominado retrómero o por la interacción con Alix, una proteína que aumenta la tasa de degradación lisosomal del V2r. Está reportado que la incubación durante 1 hora de células V2r y Alix positivas con vasopresina, resulta en un aumento del 700% en los productos de

degradación del V2r [112, 113]. Esto podría explicar parcialmente el descenso de marcación observado en células tumorales tras la incubación con $[V^4Q^5]dDAVP$.

Impacto de $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre la diseminación metastásica

Dándole continuidad a trabajos previamente publicados por nuestro grupo [143, 146, 147], durante el Capítulo I se exploró el uso de dDAVP como agente antimetastásico evaluando la eficacia de distintos esquemas de tratamiento. Para abordar dicho objetivo se utilizó un ensayo de colonización pulmonar experimental con células de carcinoma mamario murino hormono-independiente F3II. Se demostró que el análogo parental dDAVP es un efectivo compuesto antimetastásico si es aplicado durante etapas tempranas de la diseminación tumoral. Como era de esperarse, los animales pertenecientes al grupo control presentaron múltiples nódulos metastásicos en regiones subpleurales e intrapulmonares, mientras que los animales tratados con dDAVP desplegaron escasas metástasis periféricas. Adicionalmente, el efecto antimetastásico de dDAVP alcanzó un *plateau* utilizando dosis clínicamente relevantes entre 1-2 $\mu\text{g/kg}$.

Tras determinar el esquema más óptimo de tratamiento utilizando la droga parental dDAVP, se evaluó el efecto antimetastásico del nuevo análogo $[V^4Q^5]dDAVP$ en una dosis de 0.3 $\mu\text{g/kg}$ vía i.v. utilizando el mismo modelo experimental de colonización pulmonar. Dicha dosis corresponde a una dosis subóptima del análogo parental dDAVP. Luego de contabilizar los

nódulos pulmonares se observó que mientras dDAVP logró una inhibición en el rango del 30-40% comparado contra el control, el nuevo análogo $[V^4Q^5]$ dDAVP logró mejorar el desempeño de su análogo parental y reducir la colonización un 62%. Para lograr una inhibición en el número de nódulos metastásicos experimentales de esa magnitud se debe administrar una dosis hasta 3 veces mayor si se usa su análogo dDAVP. De manera adicional $[V^4Q^5]$ dDAVP fue el único en lograr una disminución significativa en el peso de los pulmones colonizados.

Para continuar la evaluación de la eficacia antimetastásica de $[V^4Q^5]$ dDAVP se utilizó un protocolo de progresión metastásica espontánea a partir de tumores de cáncer mamario F3II. El tratamiento sostenido con dosis intravenosas de $[V^4Q^5]$ dDAVP durante 6 semanas inhibió por completo la formación de metástasis pulmonares espontáneas. Accesoriamente, los tumores F3II pertenecientes a animales tratados con $[V^4Q^5]$ dDAVP crecieron a una tasa significativamente menor comparados con los pertenecientes a grupo dDAVP o control. A pesar de que el análogo dDAVP logró una marcada reducción en la cantidad de nódulos pulmonares, este descenso no fue estadísticamente significativo.

La diseminación metastásica es un proceso complejo que requiere el cumplimiento exitoso de una serie de pasos secuenciales y que le permitirán a las células tumorales establecerse a distancia del foco primario y desarrollarse en el nuevo sitio. La progresión hacia un fenotipo metastásico implica la adquisición de ciertas “habilidades” tales como la capacidad de migración e invasión del tejido que las rodea, la sobrevivencia en la circulación, la colonización exitosa y crecimiento en el nuevo órgano y la inducción angiogénica para el acceso a oxígeno y nutrientes.

Como fue discutido previamente, la intervención agonista del V2r presente en las células tumorales mediante el tratamiento con $[V^4Q^5]dDAVP$ y dDAVP podría interferir con múltiples pasos de la cascada metastásica, afectando, entre otras cosas, su motilidad, su habilidad de inducción angiogénica y su capacidad de establecerse y formar colonias en el órgano diana.

Sin embargo, estas propiedades intrínsecas de las células tumorales no son las únicas determinantes del éxito o fracaso de la diseminación y el establecimiento de una célula tumoral en el órgano blanco. La intercomunicación mantenida por el tumor y las células que componen el microambiente tumoral puede tener un gran impacto sobre la progresión tumoral. El sistema proteolítico y fibrinolítico pueden regular el crecimiento tumoral, la diferenciación, la invasión, la angiogénesis tumoral, la protección en la circulación y el escape inmunológico [16].

La acción procoagulante que poseen muchas variantes tumorales se ha establecido desde hace décadas. Así, la inhibición de la formación del coágulo de fibrina se ha considerado como una estrategia posible contra la progresión maligna. En este sentido, agentes anticoagulantes y antitrombóticos como la heparina y antagonistas de la vitamina K entre otros, han mostrado acciones antimetastásicas en varios modelos experimentales [41].

A lo largo de este trabajo fueron descriptas en diversas ocasiones la actividad sobre el endotelio vascular de dDAVP; el análogo parental del cual se diseña y sintetiza $[V^4Q^5]dDAVP$. La dDAVP posee una acción fibrinolítica potente mediante la liberación al plasma sanguíneo de tPA, al mismo tiempo que ejerce un efecto hemostático debido a la inducción de FVIII y FVW por parte de las células endoteliales. Dado su homología

estructural y su secuencia aminoacídica se propone que el nuevo análogo [V⁴Q⁵]dDAVP induciría efectos semejantes.

Clásicamente, el FVW ha sido descrito como una molécula efectora de la hemostasis. Sin embargo, estudios recientes han relacionado a dicha proteína con un rol mucho más complejo implicando la regulación de la angiogénesis [214], metástasis y apoptosis en las células tumorales [145, 218, 219]. Como demostraron Terraube y colaboradores, el FVW actuaría protegiendo al huésped contra la diseminación tumoral induciendo la muerte de células metastásicas en la microvasculatura del órgano blanco al limitar su adherencia con el endotelio. Además, el FVW induce la apoptosis de células agresivas de carcinoma principalmente en los vasos sanguíneos del pulmón [145, 218].

Recientemente, se reportó que células agresivas de cáncer mamario y pulmonar que expresan niveles altos de la enzima desintegrina y metaloproteasa 28 (ADAM-28), son resistentes a la apoptosis inducida por el FVW en el nicho micrometastásico. ADAM-28 se une y degrada al FVW, así favoreciendo la sobrevivencia de las células metastásicas en el microambiente del tejido colonizado. En línea con estos hallazgos, la inhibición de la expresión de ADAM-28 en un modelo murino de diseminación tumoral pulmonar resultó en la reducción del número de metástasis, aumento en la apoptosis de células arrestadas en pulmón y un descenso en la degradación del FVW [219]. En conjunto, estas evidencias muestran que la liberación de FVW resultado de la estimulación del V2r en el endotelio vascular, cumpliría un rol crucial en la resistencia a las metástasis.

Por otra parte la liberación de tPA al torrente sanguíneo inducida por la administración de los análogos de vasopresina, podrían contrabalancear

el estado de hipercoagulación inducido por la patología neoplásica, incrementando la vulnerabilidad de las células tumorales en circulación al sistema inmune y a fuerzas físicas hemodinámicas [18, 144].

Sin embargo, otros mecanismos de acción sobre el hospedador podrían estar contribuyendo a las propiedades antitumorales de los análogos de vasopresina. Los compuestos podrían modificar la adhesión de las células tumorales alterando la expresión de P-selectina sobre las células endoteliales [121] o las plaquetas [220]. $[V^4Q^5]$ dDAVP también podría alterar la hemodinámica del flujo sanguíneo, inducir la citostasis o inclusive la lisis de las células metastásicas a través de la producción de óxido nítrico de la vasculatura [115, 221-224].

Si bien postulamos que la acción antimetastásica de dDAVP y $[V^4Q^5]$ dDAVP estaría mediada, entre otros mecanismos, por distintos efectores que clásicamente se han vinculado a la hemostasia, la asociación entre sus efectos sobre la diseminación tumoral y la hemostasis *per se* es poco probable. El efecto antimetastásico desplegado por dDAVP no pudo ser reproducido por otro agente hemostático como el ácido tranexámico y tampoco fue afectado por el tratamiento concomitante con el anticoagulante enoxaparina. El ácido tranexámico es un inhibidor potente y competitivo de la activación del plasminógeno y, a altas concentraciones, es un inhibidor no competitivo de la plasmina. De manera indirecta, su uso retarda la disolución fisiológica de los coágulos sanguíneos [98]. Se ha utilizado durante años para el manejo peri- y postoperatorio de desórdenes de sangrado y su administración es una práctica segura durante la remoción quirúrgica de tumores en pacientes oncológicos [99]. Por otro lado, la enoxaparina es un poderoso anticoagulante que interfiere con la transformación de fibrinógeno a fibrina, inhibiendo la formación de los coágulos de fibrina, evento tardío en

la cascada de la coagulación [225]. En conjunto, estos resultados indican que el mecanismo de acción de dDAVP, y probablemente su análogo $[V^4Q^5]$ dDAVP, no estarían directamente relacionados con efectores de la coagulación involucrados al final de la cascada coagulatoria.

La cirugía oncológica conlleva un gran riesgo de trombosis de vena profunda y embolización pulmonar. Interesantemente, la enoxaparina es una droga segura y efectiva para prevenir el tromboembolismo venoso en pacientes sometidos a cirugía relacionada al cáncer [225]. En este contexto la combinación perioperatoria de dDAVP o potencialmente $[V^4Q^5]$ dDAVP con enoxaparina podría resultar en mayores beneficios terapéuticos.

Actividad antitumoral de $[V^4Q^5]$ dDAVP en comparación a su análogo parental dDAVP

En resumen, comparado al péptido parental dDAVP, el nuevo análogo $[V^4Q^5]$ dDAVP mostró un efecto inhibitorio significativamente mayor sobre la proliferación y motilidad de células de cáncer mamario, la formación de colonias, así como también sobre el crecimiento tumoral de xenotransplantes MDA-MB-231 y tumores F3II. Además, $[V^4Q^5]$ dDAVP desplegó una eficacia antimetastásica mejorada con respecto a dDAVP en modelos experimentales y espontáneos de colonización pulmonar.

El V2r es un receptor perteneciente a la familia de los GPCRs con 7 hélices transmembranas unidas por 3 bucles intracelulares y 3 bucles extracelulares. Su disposición espacial tridimensional presenta una cavidad profunda en el centro de su cara extracelular con motivos hidrofóbicos [155,

156]. Manning *et al.* hipotetizaron que el aumento de hidrofobicidad en la posición aminoacídica 4 mejoraría la interacción entre V2r y los ligandos relacionados a vasopresina [165]. En otro trabajo, Manning y colaboradores también reportaron que el análogo 4-valina-dDAVP desplegaba una afinidad 1,000% superior por el V2r humano en comparación con dDAVP, con valores K_i de 2.2 y 23.3 nM, respectivamente [158]. Recientemente, se demostró que, a diferencia de dDAVP, la administración del péptido 4-valina-dDAVP fue capaz de rescatar la función de una variante mutada del V2r humano en un contexto patológico, deplegando un aumento en la potencia agonista y la producción intracelular de AMPc sin interaccionar inespecíficamente con otros miembros de la familia de receptores de vasopresina [226].

Con el objetivo de mejorar la estabilidad de la molécula, también se introdujo una modificación conservativa en la posición 5, reemplazando la asparragina por glutamina, basándose en la susceptibilidad distintiva al proceso de deaminación. A pesar de que ambos AAs son susceptibles a la deaminación, a nivel peptídico dicha reacción ocurre a una tasa sustancialmente más lenta en la glutamina en comparación a la asparragina [166, 167].

Estas modificaciones racionales podrían favorecer la afinidad ligando-receptor al promover interacciones hidrofóbicas entre el ciclo conformacional de la región N-terminal de $[V^4Q^5]dDAVP$ y los AAs localizados en la cavidad del V2r. Un incremento en la afinidad entre $[V^4Q^5]dDAVP$ y los receptores V2r presentes en células tumorales y endoteliales podría resultar en un aumento en la producción de AMPc intracelular, en la generación de factores antiangiogénicos y en la liberación sistémica de factores hemostáticos como el FVW y el tPA. Eso podría

explicar el incremento en la actividad biológica del análogo peptídico y su eficacia antitumoral exacerbada.

Se ha reportado extensamente en la literatura la presencia de receptores neuropeptídicos en la superficie de células tumorales, entre los que se incluye los receptores de vasopresina [127, 129, 227]. En particular, se ha establecido la presencia de receptores de vasopresina de todos los tipos (V1r, V2r y V3r) en líneas tumorales de cáncer de mama y de pulmón de células pequeñas [130]. El análisis por RT-PCR y *Western Blot* de la línea tumoral MCF-7 mostró que estas células pueden expresar todos los subtipos del receptor de vasopresina así como también variantes anormales [128]. Debido a estas evidencias es que no se debe descartar la posibilidad que las sustituciones racionales introducidas en las posiciones 4 y 5 que dan origen a la molécula [V⁴Q⁵]dDAVP mejoren el efecto biológico de su análogo parental dDAVP al tener la capacidad de interactuar con mayor afinidad con posibles receptores V2r anormales expresados en las células de carcinoma mamario utilizadas en el presente trabajo.

Profundizar los estudios farmacológicos evaluando la actividad, interacción/afinidad con el receptor y estabilidad del péptido [V⁴Q⁵]dDAVP es clave para corroborar estas hipótesis.

Potencial aplicación adjuvante de $[V^4Q^5]$ dDAVP en un contexto quirúrgico o en combinación con drogas citotóxicas

Si bien la remoción quirúrgica del tumor primario representa generalmente el primer, y más importante paso hacia el control de la enfermedad oncológica, en las últimas décadas se han reportado sus múltiples efectos deletéreos a largo plazo [228]. En primer lugar, la cirugía incrementa la liberación de células malignas a la circulación linfática y sanguínea debido a la manipulación del tumor y su vasculatura [229]. En segundo lugar, la intervención quirúrgica, y el daño tisular asociado, induce una respuesta proinflamatoria local asociada a un aumento de la proliferación de células cancerosas y su resistencia a apoptosis, al igual que su movilidad y capacidad invasiva [90, 230].

Además, la cirugía suprime drásticamente la inmunidad mediada por células. En pacientes oncológicos sometidos a cirugía se reportó un aumento en la secreción de hormonas inmunosupresoras como el cortisol, y un descenso en el número y actividad de células CTL, NK y Th1, al igual que distintas citoquinas asociadas (por ejemplo IL-12 y IFN- γ) [231, 232]. Por último, y no menos importante, los niveles de factores vinculados con la respuesta vascular se ven drásticamente modificados por la cirugía. Se ha reportado que la remoción del tumor primario causa un descenso en moléculas antiangiogénicas como endostatina y angiostatina, así como también un incremento en factores proangiogénicos, encendiendo el *switch* angiogénico en metástasis latentes preexistentes [233].

Todos estos factores de riesgo compartidos en la cirugía oncológica se darían de manera simultánea durante el período operatorio. Específicamente, la liberación de células malignas a la circulación, el aumento de la proliferación y migración celular, incremento de la angiogénesis, secreción de factores de crecimiento e inmunosupresión, podrían actuar sinérgicamente vulnerando al paciente a la progresión metastática. Teniendo esto en cuenta, el período perioperatorio posee un amplio impacto en las tasas de recurrencia, y representa una oportunidad subutilizada para mejorar la prognosis del paciente.

Estos hallazgos refuerzan la necesidad, no sólo de una técnica quirúrgica meticulosa, sino también de aprovechar al período perioperatorio como una oportunidad de tratamiento local o sistémico para proteger al paciente de futuros efectos adversos causados por la remoción del tumor. Debido a las propiedades moduladoras del comportamiento de las células tumorales y la acción sobre factores de la hemostasia, compuestos como dDAVP y particularmente su nuevo análogo mejorado $[V^4Q^5]dDAVP$, son candidatos interesantes para ser estudiados como potenciales agentes adyuvantes en el tratamiento del cáncer mamario, administrados en un contexto perioperatorio.

De hecho, en base a la actividad antitumoral reportada en modelos preclínicos animales y en ensayos veterinarios [142, 144, 146, 147], así como también sus interesantes propiedades hemostáticas [115], un ensayo clínico abierto y prospectivo fase IIa está actualmente en progreso, con el objetivo de evaluar la seguridad y eficacia antitumoral preliminar de la dDAVP durante su uso perioperatorio en pacientes de cáncer mamario (NCT01606072).

El tratamiento de los tumores sólidos requiere principalmente de un abordaje quirúrgico satisfactorio, complementado con ciclos de quimioterapia. Es por este motivo, que en el presente trabajo se evaluó el potencial efecto cooperativo entre $[V^4Q^5]dDAVP$ y el quimioterápico paclitaxel sobre células de CMTN MDA-MB-231.

En primer lugar se evaluó la actividad antitumoral del tratamiento combinado sobre cultivos celulares *in vitro* en 2 y 3 dimensiones. Para dichos ensayos se utilizaron concentraciones sub- IC_{50} del citotóxico paclitaxel combinadas a $[V^4Q^5]dDAVP$ usando una concentración de 1,000 nM. Estos ensayos *in vitro* revelaron un claro efecto cooperativo, en donde las terapias combinadas fueron significativamente superiores contrastadas con los tratamientos individuales. Dichos efectos fueron particularmente más notorios al evaluar la acción cooperativa sobre el crecimiento clonogénico en dos dimensiones de las células cancerosas mamarias. Los resultados indicaron que la intervención agonista del V2r utilizando $[V^4Q^5]dDAVP$ en combinación a quimioterapia podría afectar etapas tempranas del establecimiento y desarrollo de microtumores.

Motivados por estos resultados se evaluó la acción combinada *in vivo* utilizando xenotransplantes de MDA-MB-231 creciendo en ratones inmunocomprometidos BALB/c *nude*. El tratamiento consistió en la administración trisemanal de $[V^4Q^5]dDAVP$ empleando dosis de 0.3 $\mu g/kg$ i.v. combinadas o no a dosis semanales subóptimas de paclitaxel de 10 mg/kg i.p. Mientras que el tratamiento con el quimioterápico se realizó durante 42 días, la administración de $[V^4Q^5]dDAVP$ se prolongó hasta el final del protocolo.

Se observó que el tratamiento con $[V^4Q^5]dDAVP$ administrado trisemanalmente, tanto como monoterapia o combinado a quimioterapia,

logró una reducción de 60% de la carga tumoral final comparado con el grupo control. La adición de paclitaxel al tratamiento sostenido de $[V^4Q^5]dDAVP$, desplegó un efecto cooperativo durante la ventana temporal de su administración o inmediatamente luego de los ciclos de quimioterapia, al evaluar las tasas de crecimiento tumoral o el volumen tumoral, respectivamente. Sin embargo, tras analizar los volúmenes promedio de los xenotransplantes al final del protocolo de crecimiento tumoral, el tratamiento con taxano no mostró diferencia alguna contra el control y no aportó beneficios terapéuticos al ser combinado con $[V^4Q^5]dDAVP$. La efectividad limitada del tratamiento con paclitaxel como monoterapia probablemente se debió a la dosis subóptima utilizada y está en línea con lo reportado en la literatura, donde dosis equivalentes fueron evaluadas en distintos modelos murinos desplegando resultados similares [199-201]. Si bien la dosis de paclitaxel fue seleccionada con el objetivo de poder detectar beneficios terapéuticos al ser combinada con $[V^4Q^5]dDAVP$, a futuro se podrían realizar estudios de escalado de dosis o de ventanas de administración más extensas para definir mejores esquemas de administración combinando el taxano, u otras drogas citotóxicas, con nuestro péptido de estudio.

Tras finalizar los 6 ciclos de tratamiento con quimioterapia, los animales del grupo tratado con paclitaxel desarrollaron xenotransplantes ulcerados y necróticos. Notoriamente, la administración de $[V^4Q^5]dDAVP$ en el grupo combinando terapia peptídica y taxano, logró revertir el fenotipo necrótico y ulcerante de los tumores tratados con quimioterapia. Se ha reportado que el tratamiento de cáncer mamario localmente avanzado con paclitaxel, particularmente en combinación con terapia antiangiogénica basada en bevacizumab, puede causar una rápida ulceración del tumor acompañada de extensas zonas de necrosis y pérdida de capas superficiales de piel. Estas lesiones, además de afectar la calidad de vida

del paciente, pueden ser susceptibles a múltiples infecciones, e incluso inducir hemorragias severas que pueden llegar a comprometer la vida del paciente. A pesar de que las hemorragias fatales a partir del tumor primario son reconocidas como complicaciones críticas en pacientes con cáncer de colon y de pulmón, la posibilidad de hemorragias masivas a partir de una lesión primaria de cáncer mamario no debe ser subestimada [234, 235]. Si bien es altamente probable que los efectos adversos del tratamiento combinado paclitaxel/bevacizumab sean atribuidos principalmente a la terapia antiangiogénica [236, 237], estos hallazgos demuestran que un tumor primario de cáncer mamario con un leve compromiso de la dermis, potencialmente puede progresar hacia una lesión ulcerante, necrótica y hemorrágica. En este contexto, considerando los efectos desplegados sobre tumores mamarios ulcerantes, al igual que la acción hemostática de su péptido parental dDAVP, el potencial uso de $[V^4Q^5]$ dDAVP en tumores localmente avanzados resulta sumamente interesante.

Adicionalmente, con el objetivo de estudiar el efecto de $[V^4Q^5]$ dDAVP combinado a quimioterapia sobre la sobrevida de ratones atímicos portadores de xenotransplantes MDA-MB-231 los animales fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron un volumen de $1,000 \text{ mm}^3$. Los animales de los grupos control, paclitaxel, $[V^4Q^5]$ dDAVP y $[V^4Q^5]$ dDAVP en combinación a quimioterapia desplegaron valores de sobrevida media de 85, 87, 100 y 104 días, siendo los últimos dos los que alcanzaron una diferencia significativa en comparación al grupo control. La administración prolongada de $[V^4Q^5]$ dDAVP, sola o en combinación con paclitaxel no desplegó signos evidentes de toxicidad en los animales estudiados.

Estos resultados no son los primeros en sugerir un efecto cooperativo entre $[V^4Q^5]$ dDAVP y quimioterapia estándar. En el 2009 reportamos los

beneficios terapéuticos de la combinación de $[V^4Q^5]dDAVP$ con el agente alquilante carmustina, utilizado como tratamiento citotóxico de 3era línea en pacientes diagnosticados con carcinoma mamario, entre otros. Dicho tratamiento resultó en una inhibición cooperativa sobre la progresión de tumores mamarios murinos altamente agresivos F3II desarrollados en ratones inmunocompetentes BALB/c [161].

En el presente trabajo, se describió por primera vez la acción combinada de $[V^4Q^5]dDAVP$ junto a paclitaxel sobre el crecimiento tumoral y la sobrevida, particularmente en un modelo preclínico de cáncer mamario triple-negativo.

Hemos mostrado previamente que el accionar de $[V^4Q^5]dDAVP$ está mediado por el V2r y la activación del eje AMPc/PKA. Por otro lado se ha reportado que los efectos citotóxicos del paclitaxel en células de cáncer mamario triple negativo humano están asociados a un aumento de los niveles de AMPc y de la actividad de PKA, y que entre otras respuestas, induce la hiperfosforilación de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Dicho efecto pudo ser bloqueado por el inhibidor de PKA Rp-AMPc indicando que la activación de PKA en respuesta al daño microtubular es un evento clave en la inducción de la apoptosis [238]. En otro estudio se reportó que el análogo permeable de AMPc 8-Cl-AMPc es capaz de aumentar sinérgicamente el efecto antiproliferativo de drogas citotóxicas como el paclitaxel o el cisplatino en numerosas líneas celulares tumorales incluyendo carcinoma pulmonar, ovárico, colorrectal y mamario. Adicionalmente, el 8-Cl-AMPc en combinación con paclitaxel incrementó drásticamente la apoptosis celular en comparación a los tratamientos individuales [239]. Teniendo esto en cuenta, dilucidar los mecanismos moleculares de acción de $[V^4Q^5]dDAVP$ en

combinación a paclitaxel, incluyendo su efecto sobre la apoptosis y la distribución del ciclo celular, resulta altamente interesante.

Como se mencionó en la Introducción, el CMTN representa en la actualidad un claro desafío clínico ya que no existen alternativas terapéuticas moleculares con efectividad comprobada. Si bien en la actualidad se destaca el esfuerzo destinado a evaluar el potencial uso de drogas dirigidas a blancos moleculares específicos [79], la quimioterapia tradicional sigue siendo la única herramienta disponible [197]. Lamentablemente, la eficacia de la misma parece haber alcanzado una meseta en el escenario adyuvante, en parte debido a su alta toxicidad y baja selectividad [198]. Los efectos cooperativos del nuevo análogo $[V^4Q^5]dDAVP$ asociados a terapia citotóxica tradicional ofrecen un panorama alentador para continuar los estudios y evaluar el potencial uso de $[V^4Q^5]dDAVP$ como agente adyuvante a la quimioterapia estándar en el tratamiento de cáncer mamario triple negativo.

Conclusiones y perspectivas

Mundialmente se diagnostican aproximadamente 1.3 millones de nuevos casos de cáncer mamario por año, con una mortalidad cercana al medio millón de pacientes anuales. Dada su alta incidencia en la población femenina, el cáncer de mama representa un serio problema en materia de salud mundial.

Con el avance del entendimiento de la biología tumoral y el desarrollo de terapias moleculares dirigidas ha habido mejoras sustanciales en el tratamiento y la prognosis de pacientes portadores de determinados tipos de tumores mamarios, incluyendo los hormono-dependientes o HER-2/neu positivos. Sin embargo, pocas terapias dirigidas han mostrado beneficios terapéuticos claros en el abordaje del cáncer mamario triple negativo. En estos casos la terapia estándar incluye quimioterapia adyuvante combinada a cirugía o radioterapia. A pesar de haberse logrado una mejora en la eficacia de nuevas estrategias combinando distintas terapias citotóxicas, la efectividad de dichos tratamientos es reducida debido a la falta de selectividad y alta toxicidad asociada. Además de las limitaciones de las terapias citotóxicas, la alta mortalidad en pacientes que portan las variantes más agresivas de cáncer mamario está ligada a la progresión metastásica de la enfermedad.

Para mejorar el pronóstico en pacientes con cáncer mamario avanzado o recurrente existe una necesidad urgente para desarrollar nuevas alternativas terapéuticas selectivas que posean blancos específicos relevantes en la progresión tumoral. Paralelamente, se ha reportado que el *stress* inducido por cirugía y las complicaciones postoperatorias vinculadas al abordaje quirúrgico del cáncer mamario, están fuertemente vinculadas a una mayor recurrencia y diseminación tumoral. Estos hallazgos refuerzan la necesidad, no sólo de una técnica quirúrgica meticulosa, sino también de

aprovechar al período perioperatorio como una oportunidad de tratamiento local o sistémico para proteger al paciente de futuros efectos adversos causados por la remoción del tumor.

Debido a las propiedades moduladoras del comportamiento de las células tumorales, y la acción sobre factores de la hemostasia, compuestos como dDAVP y su nuevo análogo $[V^4Q^5]dDAVP$, son candidatos interesantes para ser estudiados como agentes adyuvantes en el tratamiento de cáncer mamario.

En el presente trabajo los análogos de vasopresina $[V^4Q^5]dDAVP$ y dDAVP lograron desplegar interesantes propiedades antitumorales en distintos modelos agresivos de carcinoma mamario con relevancia clínica sin mostrar signos evidentes de toxicidad. Los distintos tratamientos peptídicos fueron capaces de modular el crecimiento y la migración celular, inhibir la angiogénesis inducida por tumor, reducir la progresión tumoral y limitar drásticamente la colonización metastásica a distancia. En comparación a su péptido parental, el análogo $[V^4Q^5]dDAVP$ mostró ser un mejor agente antineoplásico, posiblemente por una mayor afinidad con el receptor V2r responsable de mediar las acciones antitumorales de dicho compuesto. Adicionalmente, se reportó por primera vez la acción antitumoral cooperativa tras la combinación del nuevo análogo peptídico con quimioterapia estándar basada en taxanos.

Estas observaciones sugieren una potencial aplicación clínica de $[V^4Q^5]dDAVP$ tanto durante la administración de quimioterápicos convencionales como en el acto quirúrgico de extirpación tumoral. Se propone continuar la evaluación preclínica de $[V^4Q^5]dDAVP$ y profundizar los estudios sobre el perfil farmacológico del péptido y los mecanismos de acción responsables por sus efectos antineoplásicos.

[V⁴Q⁵]dDAVP y su péptido parental dDAVP desplegarían un rol dual angiostático y antimetastásico, interrumpiendo las interacciones cooperativas entre las células endoteliales y tumorales durante la progresión tumoral. A modo integrador, en la Figura final se postulan los potenciales mecanismos que mediarían su acción antitumoral.

Célula endotelial

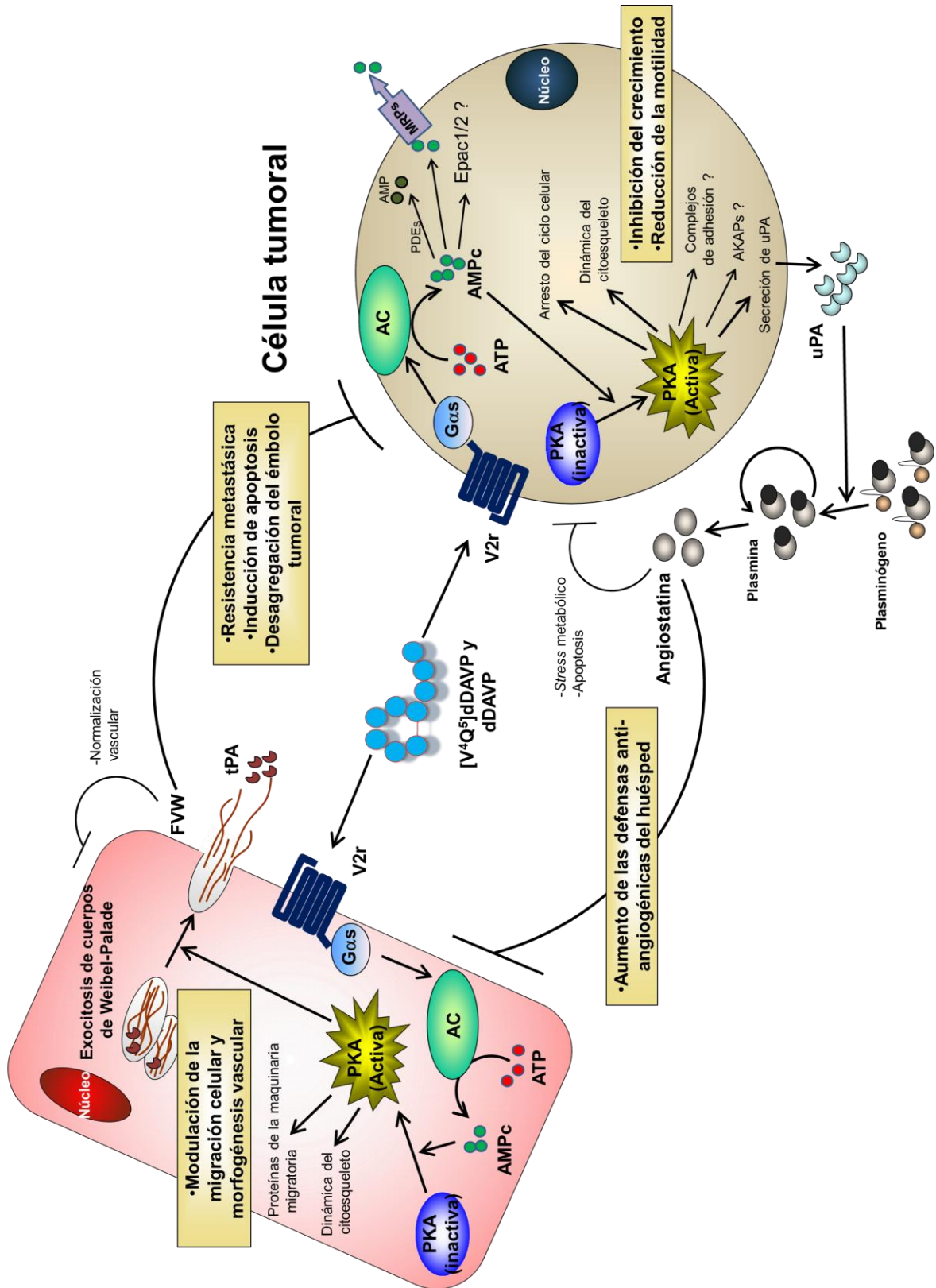


Figura final. Modelo hipotético de los efectos duales y recíprocos de [V⁴Q⁵]dDAVP y dDAVP sobre células tumorales y endoteliales. Los análogos peptídicos estudiados desencadenan vías de señalización asociadas al V2r, causando la activación de la adenilato ciclasa, seguida de una activación AMPc-dependiente de la PKA. El sistema AC/AMPc/PKA estaría vinculado a señales de control del crecimiento y motilidad celular. En un mecanismo mediado por células tumorales, [V⁴Q⁵]dDAVP y dDAVP estimulan la producción de angiostatina, un poderoso efector antiangiogénico. Los compuestos modularían la secreción de uPA, favoreciendo la generación de angiostatina mediante el clivaje proteolítico a partir del plasminógeno. Simultáneamente, los análogos de vasopresina activan la liberación endotelial del FVW (junto a otros factores hemostáticos) mediante la exocitosis de los cuerpos de Weibel-Palade. El FVW desempeña un rol protector contra la diseminación metastásica, induciendo la apoptosis de células malignas arrestadas en la microvasculatura del órgano blanco.

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a los Dres. Daniel Alonso y Daniel Gomez por darme la oportunidad de unirme y crecer junto a este gran grupo. Durante estos 7 años siempre pude contar con ustedes. Gracias por su forma de trabajar, su apoyo constante, su estímulo y su afecto.

En especial tengo que agradecer a mi codirectora de tesis Giselle. Gracias por guiarme a través de este camino y permitirme crecer junto a vos y al proyecto. Sos un claro ejemplo de honestidad y franqueza. Siempre me diste las herramientas y la libertad para trabajar a gusto, y desde el primer día me trataste con paciencia y calidez humana. Por eso estoy eternamente agradecido.

A Carli, mi gran amiga y compañera dentro y fuera del laboratorio. Sin tus risas este lugar no sería el mismo. A pesar de que te hice llorar (hace más de 15 años), sé que puedo contar con vos siempre que lo necesite. Gracias por tu amistad.

A Valita, ella sabe, pero por las dudas lo escribo. Mi compañera de gordura. Gracias capita por estar siempre dispuesta a darme una mano y por todo el afecto. No hay resentimiento por mis lesiones auditivas.

A Mari, mi compañera de línea. Gracias por soportarme día a día “coca”! Con vos el trabajo se hace mucho más fácil. Es un placer trabajar en el proyecto con vos, y compartir tanto sus éxitos como sus fracasos. Ojalá sigamos teniendo nuestras charlas extra-académicas.

A Nazita, en primer lugar por tu amistad. Valoro tu transparencia y el hecho que siempre quieras mejorar las cosas. Gracias por cantar a dúo conmigo grandes éxitos de la música moderna como “TLQD”.

A Diego, por ser un pibe de fierro. Gracias por tu compañerismo y predisposición al diálogo. Un gran placer que te hayas incorporado a LOM.

A Romi, otro claro ejemplo de personas con las cuales siempre puedes contar. Siempre ayudando. Es un gusto trabajar con vos. Cuando instalaste tu *stand* de información general cambiaste la vida de muchos.

A Hec (YONI), desde que el primer día que te incorporaste al laboratorio te caracterizaste por tu bondad y transparencia. Gracias por hacer de LOM un lugar más ameno para trabajar.

A Maru, a.k.a. “Tía Norma”. Gracias por tu honestidad y tu humor.

A Fer, quien recientemente me paso la “mochila” doctoral. Gracias por esas charlas de mate y tus consejos.

A Hernán, vi-e-ja. Vos sabes lo que te estimo. Te considero como un amigo y un gran compañero de trabajo. Gracias por contagiar con tu entusiasmo y empuje.

A Pablo, a pesar de que nuestras charlas suelen ser tritemáticas (MMA/motos/consolas) valoro esos mates y momentos compartidos.

A Marian, por tus consejos y apoyo. Siempre que necesité una mano estuviste para ayudarme.

A los que recién se incorporan. Gracias Ro, Silvi y Cin, por sus aportes de entusiasmo y buena onda al grupo.

A Georgi, por vivir conmigo esta etapa y haberme dado tu afecto incondicional a lo largo de estos 5 años. Gracias por tener ese corazón tan grande y tan noble. Agradezco poder compartir mis días con vos. No me imagino poder haber logrado la escritura de esta tesis sino hubiese contado con tu apoyo.

A mi familia, por darme todo el cariño que una persona puede pedir. Gracias a su apoyo incondicional es que me encuentro finalizando esta etapa, repleto de buenos recuerdos y con un fuerte sentimiento de realización. A vos viejo que me diste todo, me enorgullece tenerte como padre. A vos mamá, mi gran compañera, solo vos sabés cuanto te quiero. A vos hermano, que a lo largo de los años resultaste ser un gran amigo y una persona invaluable con quien sé que puedo contar en cualquier circunstancia.

El resto de mis familiares también ocupan un importante lugar en mi vida. A las tías “chapita” Bocha y Graciela. A mis primos y primas Belén, Gon, Mare y Agus, gracias por crecer conmigo y estar siempre. Leanchus vos también son más que un primo para mí, fuiste y serás mi compañero de Rock`n Rollen Nenen. A los más chiquititos también; al escuadrón de demolición Manu y Fran, y a las reinas Male y Morita.

A los Cardama y los Merle, por aceptarme en sus familias desde el primer día. Karin y Claudio, gracias por su afecto y apoyo. Las hermanitas que nunca tuve, Nani y Juli. Ustedes saben como las quiero capas. A sus novios, Fede y Gashto, gracias por todos los momentos compartidos y por haberse transformado en mis hermanos de elección.

Cualquiera que me conozca sabe lo importante que son ellos para mí. A mis amigos, con quienes compartí muchos de los mejores momentos de mi vida. Crecí, reí y aprendí junto a ellos. A mi gran amigo de toda la vida Sebastián. Sos el primer recuerdo que tengo sobre la amistad. A maxi, una amistad incondicional. Sea como sea estás, aunque llegués siempre tarde. A los integrantes del C.S.D.G. y S., Fer, Bonja, Maxi, Choco, Oski, Tincho, Pablo, Seba y Tiagui. A los monos, Sebi, Tomi, Jorge y Pablo. A la gloriosa ABC. Yamil, Bruno, Vasco, Fede, Ari, Nahui y Martín. A Ale, Eze y Ragu. A mis amigas del cole y de la facu, Lu, Flor y Kari. Todos estuvieron siempre que los necesité y espero seguir creciendo y envejeciendo con ustedes.

No me olvido de los que partieron sin antes dejar su huella. Siguen estando tan presentes como el día que se fueron y sé que nos cuidan desde arriba. Abuela Elvira, abuelo Juancho, abuela Mamama, Gustavo y Sebi siempre estarán en mi memoria.

Por último y no menos importante, a la Universidad pública y gratuita, y a todos los docentes e investigadores que de alguna manera colaboraron en mi formación.

Gracias a todos y a cada uno de ustedes.

Bibliografía

1. Bal De Kier Joffe E, Puricelli L, Alonso D: **Biología tumoral: claves celulares y moleculares del cáncer**, 1st edn. Buenos Aires: EUDEBA; 2008.
2. Alberts B, Wilson JH, Hunt T: **Molecular biology of the cell**, 5th edn. New York: Garland Science; 2008.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: **GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]**. In. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
4. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation**. *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
5. Holliday C, Rummel S, Hooke JA, Shriver CD, Ellsworth DL, Ellsworth RE: **Genomic instability in the breast microenvironment? A critical evaluation of the evidence**. *Expert review of molecular diagnostics* 2009, **9**(7):667-678.
6. Kalluri R: **Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis**. *Nat Rev Cancer* 2003, **3**(6):422-433.
7. Bhowmick NA, Moses HL: **Tumor-stroma interactions**. *Curr Opin Genet Dev* 2005, **15**(1):97-101.
8. Tlsty TD, Hein PW: **Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals**. *Curr Opin Genet Dev* 2001, **11**(1):54-59.
9. Coussens LM, Werb Z: **Inflammation and cancer**. *Nature* 2002, **420**(6917):860-867.
10. Farrow B, Sugiyama Y, Chen A, Uffort E, Nealon W, Mark Evers B: **Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development**. *Ann Surg* 2004, **239**(6):763-769; discussion 769-771.

11. Li X, Makarov SS: **An essential role of NF-kappaB in the "tumor-like" phenotype of arthritic synoviocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(46):17432-17437.
12. Sacconi A, Schioppa T, Porta C, Biswas SK, Nebuloni M, Vago L, Bottazzi B, Colombo MP, Mantovani A, Sica A: **p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance.** *Cancer Res* 2006, **66**(23):11432-11440.
13. Bubici C, Papa S, Dean K, Franzoso G: **Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance.** *Oncogene* 2006, **25**(51):6731-6748.
14. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR: **Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium.** *Cancer Res* 1999, **59**(19):5002-5011.
15. Ohuchida K, Mizumoto K, Murakami M, Qian LW, Sato N, Nagai E, Matsumoto K, Nakamura T, Tanaka M: **Radiation to stromal fibroblasts increases invasiveness of pancreatic cancer cells through tumor-stromal interactions.** *Cancer Res* 2004, **64**(9):3215-3222.
16. Quail DF, Joyce JA: **Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis.** *Nature medicine* 2013, **19**(11):1423-1437.
17. Wong SY, Hynes RO: **Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide?** *Cell Cycle* 2006, **5**(8):812-817.

18. Gupta GP, Massague J: **Cancer metastasis: building a framework.** *Cell* 2006, **127**(4):679-695.
19. Liotta LA, Kohn EC: **The microenvironment of the tumour-host interface.** *Nature* 2001, **411**(6835):375-379.
20. Li F, Tiede B, Massague J, Kang Y: **Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis.** *Cell research* 2007, **17**(1):3-14.
21. Sceneay J, Smyth MJ, Moller A: **The pre-metastatic niche: finding common ground.** *Cancer metastasis reviews* 2013, **32**(3-4):449-464.
22. Visse R, Nagase H: **Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.** *Circulation research* 2003, **92**(8):827-839.
23. Chrenek MA, Wong P, Weaver VM: **Tumour-stromal interactions. Integrins and cell adhesions as modulators of mammary cell survival and transformation.** *Breast cancer research : BCR* 2001, **3**(4):224-229.
24. Vincent-Salomon A, Thiery JP: **Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development.** *Breast cancer research : BCR* 2003, **5**(2):101-106.
25. Olson MF, Sahai E: **The actin cytoskeleton in cancer cell motility.** *Clinical & experimental metastasis* 2009, **26**(4):273-287.
26. Condeelis J, Segall JE: **Intravital imaging of cell movement in tumours.** *Nature reviews Cancer* 2003, **3**(12):921-930.
27. Webb DJ, Horwitz AF: **New dimensions in cell migration.** *Nature cell biology* 2003, **5**(8):690-692.
28. Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, Graf T, Pollard JW, Segall J, Condeelis J: **A paracrine loop between tumor**

- cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors.** *Cancer research* 2004, **64**(19):7022-7029.
29. Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, Kerjaschki D: **Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis.** *The American journal of pathology* 2002, **161**(3):947-956.
30. Friedl P, Wolf K: **Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms.** *Nature reviews Cancer* 2003, **3**(5):362-374.
31. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV: **Lymphangiogenesis in development and human disease.** *Nature* 2005, **438**(7070):946-953.
32. Wong SY, Haack H, Crowley D, Barry M, Bronson RT, Hynes RO: **Tumor-secreted vascular endothelial growth factor-C is necessary for prostate cancer lymphangiogenesis, but lymphangiogenesis is unnecessary for lymph node metastasis.** *Cancer research* 2005, **65**(21):9789-9798.
33. Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG, Ellwanger U, Garbe C, Mihm MC, Detmar M: **Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival.** *The American journal of pathology* 2003, **162**(6):1951-1960.
34. Maula SM, Luukkaa M, Grenman R, Jackson D, Jalkanen S, Ristamaki R: **Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region.** *Cancer research* 2003, **63**(8):1920-1926.

-
35. Butler TP, Gullino PM: **Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma.** *Cancer research* 1975, **35**(3):512-516.
 36. Weiss L, Ward PM: **Arrest and retention of circulating cancer cells in the lungs of animals with defined metastatic status.** *Cancer research* 1982, **42**(5):1898-1903.
 37. Weiss L, Ward PM, Holmes JC: **Liver-to-lung traffic of cancer cells.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 1983, **32**(1):79-83.
 38. Panis Y, Ribeiro J, Chretien Y, Nordlinger B: **Dormant liver metastases: an experimental study.** *The British journal of surgery* 1992, **79**(3):221-223.
 39. Topal B, Roskams T, Fevery J, Penninckx F: **Aggregated colon cancer cells have a higher metastatic efficiency in the liver compared with nonaggregated cells: an experimental study.** *The Journal of surgical research* 2003, **112**(1):31-37.
 40. Boccaccio C, Medico E: **Cancer and blood coagulation.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2006, **63**(9):1024-1027.
 41. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D: **Clotting mechanisms and cancer: implications in thrombus formation and tumor progression.** *Clinical advances in hematology & oncology : H&O* 2003, **1**(11):673-678.
 42. Gunji Y, Gorelik E: **Role of fibrin coagulation in protection of murine tumor cells from destruction by cytotoxic cells.** *Cancer research* 1988, **48**(18):5216-5221.
 43. Alonso DF, Farias EF, Urtreger A, Ladedá V, Vidal MC, Bal De Kier Joffe E: **Characterization of F3II, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a**

- mouse adenocarcinoma.** *Journal of surgical oncology* 1996, **62**(4):288-297.
44. Yu JL, Rak JW: **Shedding of tissue factor (TF)-containing microparticles rather than alternatively spliced TF is the main source of TF activity released from human cancer cells.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2004, **2**(11):2065-2067.
45. D'Asti E, Garnier D, Lee TH, Montermini L, Meehan B, Rak J: **Oncogenic extracellular vesicles in brain tumor progression.** *Frontiers in physiology* 2012, **3**:294.
46. Croce CM: **Oncogenes and cancer.** *The New England journal of medicine* 2008, **358**(5):502-511.
47. Nguyen DX, Bos PD, Massague J: **Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization.** *Nature reviews Cancer* 2009, **9**(4):274-284.
48. Condeelis J, Weissleder R: **In vivo imaging in cancer.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2010, **2**(12):a003848.
49. Duda DG, Ancukiewicz M, Isakoff SJ, Krop IE, Jain RK: **Seeds and soil: unraveling the role of local tumor stroma in distant metastasis.** *Journal of the National Cancer Institute* 2014, **106**(8).
50. Talmadge JE, Fidler IJ: **AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective.** *Cancer research* 2010, **70**(14):5649-5669.
51. Duda DG, Duyverman AM, Kohno M, Snuderl M, Steller EJ, Fukumura D, Jain RK: **Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(50):21677-21682.
52. Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ: **Breast cancer metastasis: markers and models.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(8):591-602.

-
53. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC: **Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(8):563-572.
 54. Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ: **Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis.** *Nature medicine* 2000, **6**(1):100-102.
 55. Pepper MS: **Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2001, **21**(7):1104-1117.
 56. Geiger JH, Cnudde SE: **What the structure of angiostatin may tell us about its mechanism of action.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2004, **2**(1):23-34.
 57. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
 58. Hori A, Sasada R, Matsutani E, Naito K, Sakura Y, Fujita T, Kozai Y: **Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor.** *Cancer research* 1991, **51**(22):6180-6184.
 59. De Palma M, Naldini L: **Role of haematopoietic cells and endothelial progenitors in tumour angiogenesis.** *Biochimica et biophysica acta* 2006, **1766**(1):159-166.
 60. Aghi M, Cohen KS, Klein RJ, Scadden DT, Chiocca EA: **Tumor stromal-derived factor-1 recruits vascular progenitors to mitotic neovasculature, where microenvironment influences their differentiated phenotypes.** *Cancer research* 2006, **66**(18):9054-9064.

-
61. Hammerling GJ, Ganss R: **Vascular integration of endothelial progenitors during multistep tumor progression.** *Cell Cycle* 2006, **5**(5):509-511.
 62. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J: **Vascular-specific growth factors and blood vessel formation.** *Nature* 2000, **407**(6801):242-248.
 63. Carmeliet P, Jain RK: **Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases.** *Nature reviews Drug discovery* 2011, **10**(6):417-427.
 64. Hall AP: **Review of the pericyte during angiogenesis and its role in cancer and diabetic retinopathy.** *Toxicologic pathology* 2006, **34**(6):763-775.
 65. Bergers G, Benjamin LE: **Tumorigenesis and the angiogenic switch.** *Nature reviews Cancer* 2003, **3**(6):401-410.
 66. Jurasz P, Santos-Martinez MJ, Radomska A, Radomski MW: **Generation of platelet angiostatin mediated by urokinase plasminogen activator: effects on angiogenesis.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2006, **4**(5):1095-1106.
 67. Reijerkerk A, Voest EE, Gebbink MF: **No grip, no growth: the conceptual basis of excessive proteolysis in the treatment of cancer.** *Eur J Cancer* 2000, **36**(13 Spec No):1695-1705.
 68. Folkman J: **Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action.** *Experimental cell research* 2006, **312**(5):594-607.
 69. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG: **Matrix metalloproteinases and metastasis.** *Cancer chemotherapy and pharmacology* 1999, **43** Suppl:S42-51.

-
70. Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Hojrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV: **Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(6):2811-2816.
71. Troyanovsky B, Levchenko T, Mansson G, Matvijenko O, Holmgren L: **Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation.** *The Journal of cell biology* 2001, **152**(6):1247-1254.
72. Wahl ML, Moser TL, Pizzo SV: **Angiostatin and anti-angiogenic therapy in human disease.** *Recent progress in hormone research* 2004, **59**:73-104.
73. Lee TY, Muschal S, Pravda EA, Folkman J, Abdollahi A, Javaherian K: **Angiostatin regulates the expression of antiangiogenic and proapoptotic pathways via targeted inhibition of mitochondrial proteins.** *Blood* 2009, **114**(9):1987-1998.
74. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: **Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2015, **136**(5):E359-386.
75. Banin Hirata BK, Oda JM, Losi Guembarovski R, Ariza CB, de Oliveira CE, Watanabe MA: **Molecular Markers for Breast Cancer: Prediction on Tumor Behavior.** *Disease markers* 2014, **2014**:513158.
76. Baird RD, Caldas C: **Genetic heterogeneity in breast cancer: the road to personalized medicine?** *BMC medicine* 2013, **11**:151.

-
77. Allison KH: **Molecular pathology of breast cancer: what a pathologist needs to know.** *American journal of clinical pathology* 2012, **138**(6):770-780.
78. Dawson SJ, Rueda OM, Aparicio S, Caldas C: **A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications.** *The EMBO journal* 2013, **32**(5):617-628.
79. Bayraktar S, Gluck S: **Molecularly targeted therapies for metastatic triple-negative breast cancer.** *Breast cancer research and treatment* 2013, **138**(1):21-35.
80. Schnitt SJ: **Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy.** *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2010, **23 Suppl 2**:S60-64.
81. Holliday DL, Speirs V: **Choosing the right cell line for breast cancer research.** *Breast cancer research : BCR* 2011, **13**(4):215.
82. Vanneman M, Dranoff G: **Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment.** *Nature reviews Cancer* 2012, **12**(4):237-251.
83. Akram M, Siddiqui SA: **Breast cancer management: past, present and evolving.** *Indian journal of cancer* 2012, **49**(3):277-282.
84. Capelan M, Pugliano L, De Azambuja E, Bozovic I, Saini KS, Sotiriou C, Loi S, Piccart-Gebhart MJ: **Pertuzumab: new hope for patients with HER2-positive breast cancer.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2013, **24**(2):273-282.
85. Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N: **Triple-negative breast cancer--current status and future directions.**

-
- Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2009, **20**(12):1913-1927.
86. Wikman H, Vessella R, Pantel K: **Cancer micrometastasis and tumour dormancy.** *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2008, **116**(7-8):754-770.
87. DeLisser HM, Keirns CC, Clinton EA, Margolis ML: **"The air got to it:" exploring a belief about surgery for lung cancer.** *Journal of the National Medical Association* 2009, **101**(8):765-771.
88. Beecken WD, Engl T, Jonas D, Blaheta RA: **Expression of angiogenesis inhibitors in human bladder cancer may explain rapid metastatic progression after radical cystectomy.** *International journal of molecular medicine* 2009, **23**(2):261-266.
89. Zhao J, Zhao L, Chen W, He L, Li X: **Taspine downregulates VEGF expression and inhibits proliferation of vascular endothelial cells through PI3 kinase and MAP kinase signaling pathways.** *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2008, **62**(6):383-389.
90. van der Bij GJ, Oosterling SJ, Beelen RH, Meijer S, Coffey JC, van Egmond M: **The perioperative period is an underutilized window of therapeutic opportunity in patients with colorectal cancer.** *Annals of surgery* 2009, **249**(5):727-734.
91. Hormbrey E, Han C, Roberts A, McGrouther DA, Harris AL: **The relationship of human wound vascular endothelial growth factor (VEGF) after breast cancer surgery to circulating VEGF and angiogenesis.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2003, **9**(12):4332-4339.

-
92. Tai LH, Zhang J, Auer RC: **Preventing surgery-induced NK cell dysfunction and cancer metastases with influenza vaccination.** *Oncoimmunology* 2013, **2**(11):e26618.
93. Coffey JC, Wang JH, Smith MJ, Bouchier-Hayes D, Cotter TG, Redmond HP: **Excisional surgery for cancer cure: therapy at a cost.** *The Lancet Oncology* 2003, **4**(12):760-768.
94. Brown DC, Purushotham AD, Birnie GD, George WD: **Detection of intraoperative tumor cell dissemination in patients with breast cancer by use of reverse transcription and polymerase chain reaction.** *Surgery* 1995, **117**(1):95-101.
95. Sabbatini R, Federico M, Morselli M, Depenni R, Cagossi K, Luppi M, Torelli G, Silingardi V: **Detection of circulating tumor cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction of maspin in patients with breast cancer undergoing conventional-dose chemotherapy.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2000, **18**(9):1914-1920.
96. Lentschener C, Benhamou D, Mercier FJ, Boyer-Neumann C, Naveau S, Smadja C, Wolf M, Franco D: **Aprotinin reduces blood loss in patients undergoing elective liver resection.** *Anesthesia and analgesia* 1997, **84**(4):875-881.
97. Oertli D, Laffer U, Haberthuer F, Kreuter U, Harder F: **Perioperative and postoperative tranexamic acid reduces the local wound complication rate after surgery for breast cancer.** *The British journal of surgery* 1994, **81**(6):856-859.
98. Mahdy AM, Webster NR: **Perioperative systemic haemostatic agents.** *British journal of anaesthesia* 2004, **93**(6):842-858.
99. Lundin ES, Johansson T, Zachrisson H, Leandersson U, Backman F, Falknas L, Kjolhede P: **Single-dose tranexamic acid in advanced**

- ovarian cancer surgery reduces blood loss and transfusions: double-blind placebo-controlled randomized multicenter study.** *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 2014, **93**(4):335-344.
100. Fennerty A: **Venous thromboembolic disease and cancer.** *Postgraduate medical journal* 2006, **82**(972):642-648.
101. Falanga A, Piccioli A: **Effect of anticoagulant drugs in cancer.** *Current opinion in pulmonary medicine* 2005, **11**(5):403-407.
102. Alonso DF, Ripoll GV, Garona J, Iannucci NB, Gomez DE: **Metastasis: recent discoveries and novel perioperative treatment strategies with particular interest in the hemostatic compound desmopressin.** *Current pharmaceutical biotechnology* 2011, **12**(11):1974-1980.
103. Nakazato Y, Douglas WW: **Vasopressin release from the isolated neurohypophysis induced by a calcium ionophore, X-537A.** *Nature* 1974, **249**(456):479-481.
104. Juul KV, Bichet DG, Nielsen S, Norgaard JP: **The physiological and pathophysiological functions of renal and extrarenal vasopressin V2 receptors.** *American journal of physiology Renal physiology* 2014, **306**(9):F931-940.
105. Richardson DW, Robinson AG: **Desmopressin.** *Annals of internal medicine* 1985, **103**(2):228-239.
106. Fields RL, House SB, Gainer H: **Regulatory domains in the intergenic region of the oxytocin and vasopressin genes that control their hypothalamus-specific expression in vitro.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2003, **23**(21):7801-7809.

-
107. Bockaert J, Pin JP: **Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success.** *The EMBO journal* 1999, **18**(7):1723-1729.
 108. Laycock JF: **Perspectives on Vasopressin.** London: Imperial College Press; 2009.
 109. Hanoune J, Defer N: **Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms.** *Annual review of pharmacology and toxicology* 2001, **41**:145-174.
 110. Fajardo AM, Piazza GA, Tinsley HN: **The role of cyclic nucleotide signaling pathways in cancer: targets for prevention and treatment.** *Cancers* 2014, **6**(1):436-458.
 111. Gold MG, Stengel F, Nygren PJ, Weisbrod CR, Bruce JE, Robinson CV, Barford D, Scott JD: **Architecture and dynamics of an A-kinase anchoring protein 79 (AKAP79) signaling complex.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, **108**(16):6426-6431.
 112. Yi X, Bouley R, Lin HY, Bechoua S, Sun TX, Del Re E, Shioda T, Raychowdhury MK, Lu HA, Abou-Samra AB *et al*: **Alix (AIP1) is a vasopressin receptor (V2R)-interacting protein that increases lysosomal degradation of the V2R.** *American journal of physiology Renal physiology* 2007, **292**(5):F1303-1313.
 113. Feinstein TN, Yui N, Webber MJ, Wehbi VL, Stevenson HP, King JD, Jr., Hallows KR, Brown D, Bouley R, Vilardaga JP: **Noncanonical control of vasopressin receptor type 2 signaling by retromer and arrestin.** *The Journal of biological chemistry* 2013, **288**(39):27849-27860.
 114. Zaoral M, Kole J, Sorm F: **Aminoacids and peptides. Synthesis of 1-deamino-8-D-aminobutyne-vasopressin, and 1-deamino-8-D-**

- arginine vasopressin.** . *Coll Czech Chem Commun* 1967, **32**:1250-1257.
115. Kaufmann JE, Vischer UM: **Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP).** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2003, **1**(4):682-689.
116. Poulsen SB, Kim YH, Frokiaer J, Nielsen S, Christensen BM: **Long-term vasopressin-V2-receptor stimulation induces regulation of aquaporin 4 protein in renal inner medulla and cortex of Brattleboro rats.** *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2013, **28**(8):2058-2065.
117. Wall U, Jern S, Tengborn L, Jern C: **Evidence of a local mechanism for desmopressin-induced tissue-type plasminogen activator release in human forearm.** *Blood* 1998, **91**(2):529-537.
118. Emeis JJ, van den Eijnden-Schrauwen Y, van den Hoogen CM, de Priester W, Westmuckett A, Lupu F: **An endothelial storage granule for tissue-type plasminogen activator.** *The Journal of cell biology* 1997, **139**(1):245-256.
119. Hayoz D, Weber R, Pechere A, Burnier M, Brunner HR: **Heterogeneous vascular response to vasopressin: radial artery versus forearm blood flow.** *Journal of hypertension* 1997, **15**(1):35-41.
120. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF: **GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies.** *The Journal of clinical investigation* 1989, **84**(1):92-99.

-
121. Kanwar S, Woodman RC, Poon MC, Murohara T, Lefer AM, Davenpeck KL, Kubes P: **Desmopressin induces endothelial P-selectin expression and leukocyte rolling in postcapillary venules.** *Blood* 1995, **86**(7):2760-2766.
 122. Pereira A, del Valle Onorato M, Sanz C: **DDAVP enhances the ability of blood monocytes to form rosettes with activated platelets by increasing the expression of P-selectin sialylated ligands on the monocyte surface.** *British journal of haematology* 2003, **120**(5):814-820.
 123. Mannucci PM: **Desmopressin (DDAVP) in the treatment of bleeding disorders: the first 20 years.** *Blood* 1997, **90**(7):2515-2521.
 124. Mannucci PM, Ghirardini A: **Desmopressin: twenty years after.** *Thrombosis and haemostasis* 1997, **78**(2):958.
 125. Vande Walle J, Stockner M, Raes A, Norgaard JP: **Desmopressin 30 years in clinical use: a safety review.** *Current drug safety* 2007, **2**(3):232-238.
 126. Rodeghiero F, Castaman G, Mannucci PM: **Clinical indications for desmopressin (DDAVP) in congenital and acquired von Willebrand disease.** *Blood reviews* 1991, **5**(3):155-161.
 127. Heasley LE: **Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer.** *Oncogene* 2001, **20**(13):1563-1569.
 128. North WG, Fay MJ, Du J: **MCF-7 breast cancer cells express normal forms of all vasopressin receptors plus an abnormal V2R.** *Peptides* 1999, **20**(7):837-842.

-
129. Petit T, Davidson KK, Lawrence RA, von Hoff DD, Izbicka E: **Neuropeptide receptor status in human tumor cell lines.** *Anti-cancer drugs* 2001, **12**(2):133-136.
130. Keegan BP, Akerman BL, Pequeux C, North WG: **Provasopressin expression by breast cancer cells: implications for growth and novel treatment strategies.** *Breast cancer research and treatment* 2006, **95**(3):265-277.
131. North WG, Pang RH, Gao G, Memoli VA, Cole BF: **Native MAG-1 antibody almost destroys human breast cancer xenografts.** *Breast cancer research and treatment* 2011, **127**(3):631-637.
132. Pequeux C, Keegan BP, Hagelstein MT, Geenen V, Legros JJ, North WG: **Oxytocin- and vasopressin-induced growth of human small-cell lung cancer is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway.** *Endocrine-related cancer* 2004, **11**(4):871-885.
133. Taylor AH, Ang VT, Jenkins JS, Silverlight JJ, Coombes RC, Luqmani YA: **Interaction of vasopressin and oxytocin with human breast carcinoma cells.** *Cancer research* 1990, **50**(24):7882-7886.
134. Cassoni P, Sapino A, Fortunati N, Munaron L, Chini B, Bussolati G: **Oxytocin inhibits the proliferation of MDA-MB231 human breast-cancer cells via cyclic adenosine monophosphate and protein kinase A.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 1997, **72**(2):340-344.
135. Cassoni P, Sapino A, Negro F, Bussolati G: **Oxytocin inhibits proliferation of human breast cancer cell lines.** *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 1994, **425**(5):467-472.
136. Carie AE, Sebt SM: **A chemical biology approach identifies a beta-2 adrenergic receptor agonist that causes human tumor**

- regression by blocking the Raf-1/Mek-1/Erk1/2 pathway.** *Oncogene* 2007, **26**(26):3777-3788.
137. Insel PA, Zhang L, Murray F, Yokouchi H, Zambon AC: **Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger.** *Acta Physiol (Oxf)* 2012, **204**(2):277-287.
138. Naviglio S, Di Gesto D, Romano M, Sorrentino A, Illiano F, Sorvillo L, Abbruzzese A, Marra M, Caraglia M, Chiosi E *et al*: **Leptin enhances growth inhibition by cAMP elevating agents through apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells.** *Cancer biology & therapy* 2009, **8**(12):1183-1190.
139. Castoria G, Migliaccio A, D'Amato L, Di Stasio R, Ciociola A, Lombardi M, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Auricchio F: **Integrating signals between cAMP and MAPK pathways in breast cancer.** *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2008, **13**:1318-1327.
140. Charest PG, Oligny-Longpre G, Bonin H, Azzi M, Bouvier M: **The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signalling.** *Cellular signalling* 2007, **19**(1):32-41.
141. Alonso D, Skilton G, Farina H, Delorenzo M, Gomez D: **Modulation of growth and urokinase secretion by vasopressin and closely related nonapeptides in metastatic mouse mammary tumor cells.** *International journal of oncology* 1997, **10**(2):375-379.
142. Ripoll GV, Garona J, Pifano M, Farina HG, Gomez DE, Alonso DF: **Reduction of tumor angiogenesis induced by desmopressin in a breast cancer model.** *Breast cancer research and treatment* 2013, **142**(1):9-18.

-
143. Ripoll GV, Giron S, Krzymuski MJ, Hermo GA, Gomez DE, Alonso DF: **Antitumor effects of desmopressin in combination with chemotherapeutic agents in a mouse model of breast cancer.** *Anticancer research* 2008, **28**(5A):2607-2611.
144. Alonso DF, Skilton G, Farias EF, Bal de Kier Joffe E, Gomez DE: **Antimetastatic effect of desmopressin in a mouse mammary tumor model.** *Breast cancer research and treatment* 1999, **57**(3):271-275.
145. Terraube V, Pendu R, Baruch D, Gebbink MF, Meyer D, Lenting PJ, Denis CV: **Increased metastatic potential of tumor cells in von Willebrand factor-deficient mice.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2006, **4**(3):519-526.
146. Giron S, Tejera AM, Ripoll GV, Gomez DE, Alonso DF: **Desmopressin inhibits lung and lymph node metastasis in a mouse mammary carcinoma model of surgical manipulation.** *Journal of surgical oncology* 2002, **81**(1):38-44.
147. Hermo GA, Torres P, Ripoll GV, Scursoni AM, Gomez DE, Alonso DF, Gobello C: **Perioperative desmopressin prolongs survival in surgically treated bitches with mammary gland tumours: a pilot study.** *Vet J* 2008, **178**(1):103-108.
148. Hermo GA, Turic E, Angelico D, Scursoni AM, Gomez DE, Gobello C, Alonso DF: **Effect of adjuvant perioperative desmopressin in locally advanced canine mammary carcinoma and its relation to histologic grade.** *Journal of the American Animal Hospital Association* 2011, **47**(1):21-27.
149. Westphal JR, Van't Hullenaar R, Geurts-Moespot A, Sweep FC, Verheijen JH, Bussemakers MM, Askaa J, Clemmensen I, Eggermont AA, Ruiter DJ *et al*: **Angiostatin generation by human tumor cell**

- lines: involvement of plasminogen activators.** *International journal of cancer Journal internationale du cancer* 2000, **86**(6):760-767.
150. Jakowlew SB: **Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis.** *Cancer metastasis reviews* 2006, **25**(3):435-457.
151. Monstein HJ, Truedsson M, Ryberg A, Ohlsson B: **Vasopressin receptor mRNA expression in the human gastrointestinal tract.** *European surgical research Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes* 2008, **40**(1):34-40.
152. Ripoll GV, Garona J, Hermo GA, Gomez DE, Alonso DF: **Effects of the synthetic vasopressin analog desmopressin in a mouse model of colon cancer.** *Anticancer research* 2010, **30**(12):5049-5054.
153. Pifano M, Garona J, Pastrian B, Iannucci NB, Gómez DE, Alonso DF, Ripoll GV: **Efecto antitumoral de desmopresina (dDAVP) y su análogo [V4Q5]dDAVP mediado por el receptor V2 (V2r) en líneas tumorales humanas con características neuroendócrinas (NE).** *Medicina Buenos Aires* 2014, **74**(3):284.
154. Ripoll GV, Farina HG, Yoshiji H, Gomez DE, Alonso DF: **Desmopressin reduces melanoma lung metastasis in transgenic mice overexpressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1.** *In Vivo* 2006, **20**(6B):881-885.
155. Czaplewski C, Kazmierkiewicz R, Ciarkowski J: **Molecular modeling of the human vasopressin V2 receptor/agonist complex.** *Journal of computer-aided molecular design* 1998, **12**(3):275-287.
156. Czaplewski C, Kazmierkiewicz R, Ciarkowski J: **Molecular modelling of the vasopressin V2 receptor/antagonist interactions.** *Acta biochimica Polonica* 1998, **45**(1):19-26.

-
157. Iannucci NB, Ripoll GV, Garona J, Cascone O, Ciccia GN, Gomez DE, Alonso DF: **Antiproliferative effect of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin analogs on human breast cancer cells.** *Future medicinal chemistry* 2011, **3**(16):1987-1993.
158. Manning M, Misicka A, Olma A, Bankowski K, Stoev S, Chini B, Durroux T, Mouillac B, Corbani M, Guillon G: **Oxytocin and vasopressin agonists and antagonists as research tools and potential therapeutics.** *Journal of neuroendocrinology* 2012, **24**(4):609-628.
159. Pastrian MB, Guzman F, Garona J, Pifano M, Ripoll GV, Cascone O, Ciccia GN, Albericio F, Gomez DE, Alonso DF et al: **Structureactivity relationship of 1desamino8Darginine vasopressin as an antiproliferative agent on human vasopressin V2 receptorexpressing cancer cells.** *Molecular medicine reports* 2014, **9**(6):2568-2572.
160. Trzepalka E, Oleszczuk M, Maciejczyk M, Lammek B: **Solution structure of conformationally restricted vasopressin analogues.** *Acta biochimica Polonica* 2004, **51**(1):33-49.
161. Garona J, Ripoll GV, Iannucci NB, Cascone O, Gomez DE, Alonso DF: **Efecto antitumoral de un nuevo análogo de vasopresina en un modelo preclínico de carcinoma mamario murino.** *Medicina Buenos Aires* 2009, **69**(1):77.
162. Ripoll G, Iannucci N, Giron S, Cascone O, Gomez D, Alonso D: **Angiostatic activity of 1-Deamino-8-D-Arginine vasopressin and novel peptide analogues in breast cancer cells.** *AACR Meeting Abstracts* 2008, **2008**(1_Annual_Meeting):295-.
163. Stoev S, Cheng LL, Olma A, Klis WA, Manning M, Sawyer WH, Wo NC, Chan WY: **An investigation of position 3 in arginine**

- vasopressin with aliphatic, aromatic, conformationally-restricted, polar and charged amino acids. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 1999, **5**(3):141-153.
164. Chan WY, Wo NC, Stoev ST, Cheng LL, Manning M: **Discovery and design of novel and selective vasopressin and oxytocin agonists and antagonists: the role of bioassays.** *Experimental physiology* 2000, **85 Spec No**:7S-18S.
165. Manning M, Stoev S, Chini B, Durroux T, Mouillac B, Guillon G: **Peptide and non-peptide agonists and antagonists for the vasopressin and oxytocin V1a, V1b, V2 and OT receptors: research tools and potential therapeutic agents.** *Progress in brain research* 2008, **170**:473-512.
166. Liu H, Gaza-Bulsecu G, Chumsae C: **Glutamine deamidation of a recombinant monoclonal antibody.** *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 2008, **22**(24):4081-4088.
167. Robinson AB, Rudd CJ: **Deamidation of glutaminyl and asparaginyl residues in peptides and proteins.** *Current topics in cellular regulation* 1974, **8**(0):247-295.
168. Takabatake D, Fujita T, Shien T, Kawasaki K, Taira N, Yoshitomi S, Takahashi H, Ishibe Y, Ogasawara Y, Doihara H: **Tumor inhibitory effect of gefitinib (ZD1839, Iressa) and taxane combination therapy in EGFR-overexpressing breast cancer cell lines (MCF7/ADR, MDA-MB-231).** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2007, **120**(1):181-188.
169. Francia G, Green SK, Bocci G, Man S, Emmenegger U, Ebos JM, Weinerman A, Shaked Y, Kerbel RS: **Down-regulation of DNA mismatch repair proteins in human and murine tumor spheroids:**

- implications for multicellular resistance to alkylating agents. *Molecular cancer therapeutics* 2005, **4**(10):1484-1494.
170. Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y, Kimata K: **Heparin regulates vascular endothelial growth factor165-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. Comparison of the effects of heparin and modified heparins.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(36):31508-31515.
171. Mullen P: **The use of Matrigel to facilitate the establishment of human cancer cell lines as xenografts.** *Methods in molecular medicine* 2004, **88**:287-292.
172. Jones LW, Eves ND, Courneya KS, Chiu BK, Baracos VE, Hanson J, Johnson L, Mackey JR: **Effects of exercise training on antitumor efficacy of doxorubicin in MDA-MB-231 breast cancer xenografts.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005, **11**(18):6695-6698.
173. Liu TC, Wang Y, Hallden G, Brooks G, Francis J, Lemoine NR, Kirn D: **Functional interactions of antiapoptotic proteins and tumor necrosis factor in the context of a replication-competent adenovirus.** *Gene therapy* 2005, **12**(17):1333-1346.
174. Gao D, Vahdat LT, Wong S, Chang JC, Mittal V: **Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer.** *Cancer research* 2012, **72**(19):4883-4889.
175. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C: **Clonogenic assay of cells in vitro.** *Nature protocols* 2006, **1**(5):2315-2319.

-
176. Laubli H, Borsig L: **Selectins as mediators of lung metastasis.** *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* 2010, **3**(1):97-105.
177. Spano D, Heck C, De Antonellis P, Christofori G, Zollo M: **Molecular networks that regulate cancer metastasis.** *Seminars in cancer biology* 2012, **22**(3):234-249.
178. Morales M, Arenas EJ, Urosevic J, Guiu M, Fernandez E, Planet E, Fenwick RB, Fernandez-Ruiz S, Salvatella X, Reverter D et al: **RARRES3 suppresses breast cancer lung metastasis by regulating adhesion and differentiation.** *EMBO molecular medicine* 2014, **6**(7):865-881.
179. Garona J, Pifano M, Pastrian B, Iannucci NB, Gomez D, Alonso D, Ripoll G: **Efectos sobre la colonización metastásica pulmonar de distintos esquemas de administración del compuesto hemostático desmopresina (DDAVP) en un modelo preclínico de cáncer mamario.** *Medicina Buenos Aires* 2013, **73**(3):195.
180. Han SS, Cho CK, Lee YW, Yoo HS: **Antimetastatic and immunomodulating effect of water extracts from various mushrooms.** *Journal of acupuncture and meridian studies* 2009, **2**(3):218-227.
181. North WG, Pai S, Friedmann A, Yu X, Fay M, Memoli V: **Vasopressin gene related products are markers of human breast cancer.** *Breast cancer research and treatment* 1995, **34**(3):229-235.
182. Kaufmann JE, Oksche A, Wollheim CB, Gunther G, Rosenthal W, Vischer UM: **Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP.** *The Journal of clinical investigation* 2000, **106**(1):107-116.

183. Zuber AM, Singer D, Penninger JM, Rossier BC, Firsov D: **Increased renal responsiveness to vasopressin and enhanced V2 receptor signaling in RGS2-/- mice.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2007, **18**(6):1672-1678.
184. Kaufmann JE, Iezzi M, Vischer UM: **Desmopressin (DDAVP) induces NO production in human endothelial cells via V2 receptor- and cAMP-mediated signaling.** *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2003, **1**(4):821-828.
185. Santore TA, Chen Y, Smit MJ, Iyengar R: **Adenovirus-directed expression of Q227L-G alpha(s) inhibits growth of established tumors of later-stage human breast cancer cells in athymic mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(3):1671-1676.
186. Yamamura Y, Nakamura S, Itoh S, Hirano T, Onogawa T, Yamashita T, Yamada Y, Tsujimae K, Aoyama M, Kotosai K et al: **OPC-41061, a highly potent human vasopressin V2-receptor antagonist: pharmacological profile and aquaretic effect by single and multiple oral dosing in rats.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1998, **287**(3):860-867.
187. Burdett E, Kasper FK, Mikos AG, Ludwig JA: **Engineering tumors: a tissue engineering perspective in cancer biology.** *Tissue engineering Part B, Reviews* 2010, **16**(3):351-359.
188. Howes AL, Richardson RD, Finlay D, Vuori K: **3-Dimensional culture systems for anti-cancer compound profiling and high-throughput screening reveal increases in EGFR inhibitor-mediated cytotoxicity compared to monolayer culture systems.** *PloS one* 2014, **9**(9):e108283.

-
189. Dihlmann S, von Knebel Doeberitz M: **Wnt/beta-catenin-pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2005, **113**(4):515-524.
190. Besso M, Rosso M, Lapyckyj L, Garona J, Ripoll G, M. V-L: **El tratamiento de células de cáncer de mama humano MCF7 con el péptido Desmopresina induce cambios en la localización celular de cadherina epitelial y otros miembros del complejo adherente.** *Medicina Buenos Aires* 2012, **72**(2):62.
191. Etienne-Manneville S, Hall A: **Rho GTPases in cell biology.** *Nature* 2002, **420**(6916):629-635.
192. Wang T, Luo S, Lin C, Chang P, Chen M: **Modulation of p75 neurotrophin receptor under hypoxic conditions induces migration and invasion of C6 glioma cells.** *Clinical & experimental metastasis* 2014.
193. Zimmerman NP, Roy I, Hauser AD, Wilson JM, Williams CL, Dwinell MB: **Cyclic AMP regulates the migration and invasion potential of human pancreatic cancer cells.** *Molecular carcinogenesis* 2013.
194. Fritz G, Kaina B: **Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs.** *Current cancer drug targets* 2006, **6**(1):1-14.
195. Albini A, Tosetti F, Li VW, Noonan DM, Li WW: **Cancer prevention by targeting angiogenesis.** *Nature reviews Clinical oncology* 2012, **9**(9):498-509.
196. Hollingshead MG, Stockwin LH, Alcoser SY, Newton DL, Orsburn BC, Bonomi CA, Borgel SD, Divelbiss R, Dougherty KM, Hager EJ et al: **Gene expression profiling of 49 human tumor xenografts from in vitro culture through multiple in vivo passages--strategies for**

- data mining in support of therapeutic studies.** *BMC genomics* 2014, **15**:393.
197. Hudis CA, Gianni L: **Triple-negative breast cancer: an unmet medical need.** *The oncologist* 2011, **16 Suppl 1**:1-11.
198. Lianos GD, Vlachos K, Zoras O, Katsios C, Cho WC, Roukos DH: **Potential of antibody-drug conjugates and novel therapeutics in breast cancer management.** *OncoTargets and therapy* 2014, **7**:491-500.
199. Khawli LA, Hu P, Epstein AL: **NHS76/PEP2, a fully human vasopermeability-enhancing agent to increase the uptake and efficacy of cancer chemotherapy.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005, **11**(8):3084-3093.
200. Shalinsky DR, Brekken J, Zou H, Bloom LA, McDermott CD, Zook S, Varki NM, Appelt K: **Marked antiangiogenic and antitumor efficacy of AG3340 in chemoresistant human non-small cell lung cancer tumors: single agent and combination chemotherapy studies.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1999, **5**(7):1905-1917.
201. Sirotnak FM, She Y, Lee F, Chen J, Scher HI: **Studies with CWR22 xenografts in nude mice suggest that ZD1839 may have a role in the treatment of both androgen-dependent and androgen-independent human prostate cancer.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2002, **8**(12):3870-3876.
202. Howe AK: **Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA.** *Biochimica et biophysica acta* 2004, **1692**(2-3):159-174.

-
203. Howe AK, Baldor LC, Hogan BP: **Spatial regulation of the cAMP-dependent protein kinase during chemotactic cell migration.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(40):14320-14325.
204. Lucchi S, Calebiro D, de Filippis T, Grassi ES, Borghi MO, Persani L: **8-Chloro-cyclic AMP and protein kinase A I-selective cyclic AMP analogs inhibit cancer cell growth through different mechanisms.** *PloS one* 2011, **6**(6):e20785.
205. Cook SJ, McCormick F: **Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf.** *Science* 1993, **262**(5136):1069-1072.
206. Copsel S, Garcia C, Diez F, Vermeulem M, Baldi A, Bianciotti LG, Russel FG, Shayo C, Davio C: **Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) regulates cAMP cellular levels and controls human leukemia cell proliferation and differentiation.** *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(9):6979-6988.
207. Burdyga A, Conant A, Haynes L, Zhang J, Jalink K, Sutton R, Neoptolemos J, Costello E, Tepikin A: **cAMP inhibits migration, ruffling and paxillin accumulation in focal adhesions of pancreatic ductal adenocarcinoma cells: effects of PKA and EPAC.** *Biochimica et biophysica acta* 2013, **1833**(12):2664-2672.
208. Fiordalisi JJ, Keller PJ, Cox AD: **PRL tyrosine phosphatases regulate rho family GTPases to promote invasion and motility.** *Cancer research* 2006, **66**(6):3153-3161.
209. Hao RT, Zhang XH, Pan YF, Liu HG, Xiang YQ, Wan L, Wu XL: **Prognostic and metastatic value of phosphatase of regenerating liver-3 in invasive breast cancer.** *Journal of cancer research and clinical oncology* 2010, **136**(9):1349-1357.

-
210. Zeng Q, Dong JM, Guo K, Li J, Tan HX, Koh V, Pallen CJ, Manser E, Hong W: **PRL-3 and PRL-1 promote cell migration, invasion, and metastasis.** *Cancer research* 2003, **63**(11):2716-2722.
211. Blanquart C, Karouri SE, Issad T: **Protein tyrosine phosphatase-1B and T-cell protein tyrosine phosphatase regulate IGF-2-induced MCF-7 cell migration.** *Biochemical and biophysical research communications* 2010, **392**(1):83-88.
212. Gonzalez AM, Claiborne J, Jones JC: **Integrin cross-talk in endothelial cells is regulated by protein kinase A and protein phosphatase 1.** *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(46):31849-31860.
213. Huang J, Roth R, Heuser JE, Sadler JE: **Integrin alpha(v)beta(3) on human endothelial cells binds von Willebrand factor strings under fluid shear stress.** *Blood* 2009, **113**(7):1589-1597.
214. Starke RD, Ferraro F, Paschalaki KE, Dryden NH, McKinnon TA, Sutton RE, Payne EM, Haskard DO, Hughes AD, Cutler DF *et al*: **Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis.** *Blood* 2011, **117**(3):1071-1080.
215. Lissitzky JC, Parriaux D, Ristorcelli E, Verine A, Lombardo D, Verrando P: **Cyclic AMP signaling as a mediator of vasculogenic mimicry in aggressive human melanoma cells in vitro.** *Cancer research* 2009, **69**(3):802-809.
216. Kim S, Harris M, Varner JA: **Regulation of integrin alpha vbeta 3-mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin alpha5beta1 and protein kinase A.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(43):33920-33928.
217. Folkman J, Kalluri R: **Cancer without disease.** *Nature* 2004, **427**(6977):787.

-
218. Terraube V, Marx I, Denis CV: **Role of von Willebrand factor in tumor metastasis**. *Thrombosis research* 2007, **120 Suppl 2**:S64-70.
219. Mochizuki S, Soejima K, Shimoda M, Abe H, Sasaki A, Okano HJ, Okano H, Okada Y: **Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand factor**. *Journal of the National Cancer Institute* 2012, **104**(12):906-922.
220. Wun T, Paglieroni TG, Lachant NA: **Desmopressin stimulates the expression of P-selectin on human platelets in vitro**. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1995, **126**(4):401-409.
221. Samdani AF, Kuchner EB, Rhines L, Adamson DC, Lawson C, Tyler B, Brem H, Dawson VL, Dawson TM: **Astroglia induce cytotoxic effects on brain tumors via a nitric oxide-dependent pathway both in vitro and in vivo**. *Neurosurgery* 2004, **54**(5):1231-1237; discussion 1237-1238.
222. Hirano S: **In vitro and in vivo cytotoxic effects of nitric oxide on metastatic cells**. *Cancer letters* 1997, **115**(1):57-62.
223. Ermens AA, Schoester M, Spijkers LJ, Lindemans J, Abels J: **Toxicity of methotrexate in rats preexposed to nitrous oxide**. *Cancer research* 1989, **49**(22):6337-6341.
224. Pervin S, Singh R, Chaudhuri G: **Nitric oxide-induced cytostasis and cell cycle arrest of a human breast cancer cell line (MDA-MB-231): potential role of cyclin D1**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(6):3583-3588.
225. Changolkar A, Menditto L, Shah M, Puto K, Farrelly E: **Comparison of injectable anticoagulants for thromboprophylaxis after cancer-related surgery**. *American journal of health-system pharmacy : AJHP*

- : *official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* 2014, **71**(7):562-569.
226. Erdelyi LS, Balla A, Patocs A, Toth M, Varnai P, Hunyady L: **Altered agonist sensitivity of a mutant v2 receptor suggests a novel therapeutic strategy for nephrogenic diabetes insipidus.** *Mol Endocrinol* 2014, **28**(5):634-643.
227. North WG, Wells W, Fay MJ, Mathew RS, Donnelly EM, Memoli VA: **Immunohistochemical evaluation of vasopressin expression in breast fibrocystic disease and ductal carcinoma in situ (DCIS).** *Endocrine pathology* 2003, **14**(3):257-262.
228. Neeman E, Ben-Eliyahu S: **Surgery and stress promote cancer metastasis: new outlooks on perioperative mediating mechanisms and immune involvement.** *Brain, behavior, and immunity* 2013, **30 Suppl**:S32-40.
229. Weitz J, Herfarth C: **Surgical strategies and minimal residual disease detection.** *Seminars in surgical oncology* 2001, **20**(4):329-333.
230. Kirman I, Cekic V, Poltaratskaia N, Asi Z, Bessler M, Huang EH, Forde KA, Whelan RL: **Plasma from patients undergoing major open surgery stimulates in vitro tumor growth: Lower insulin-like growth factor binding protein 3 levels may, in part, account for this change.** *Surgery* 2002, **132**(2):186-192.
231. Bartal I, Melamed R, Greenfeld K, Atzil S, Glasner A, Domankevich V, Naor R, Beilin B, Yardeni IZ, Ben-Eliyahu S: **Immune perturbations in patients along the perioperative period: alterations in cell surface markers and leukocyte subtypes before and after surgery.** *Brain, behavior, and immunity* 2010, **24**(3):376-386.

-
232. Greenfeld K, Avraham R, Benish M, Goldfarb Y, Rosenne E, Shapira Y, Rudich T, Ben-Eliyahu S: **Immune suppression while awaiting surgery and following it: dissociations between plasma cytokine levels, their induced production, and NK cell cytotoxicity.** *Brain, behavior, and immunity* 2007, **21**(4):503-513.
233. Svendsen MN, Werther K, Nielsen HJ, Kristjansen PE: **VEGF and tumour angiogenesis. Impact of surgery, wound healing, inflammation and blood transfusion.** *Scandinavian journal of gastroenterology* 2002, **37**(4):373-379.
234. Philippin-Lauridant G, Thureau S, Ouvrier MJ, Blot E: **Fatal hemoptysis in a patient with breast cancer treated with bevacizumab and paclitaxel.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2008, **19**(11):1977-1978.
235. Ono M, Ito T, Kanai T, Murayama K, Koyama H, Maeno K, Mochizuki Y, Iesato A, Hanamura T, Okada T *et al*: **Rapid tumor necrosis and massive hemorrhage induced by bevacizumab and paclitaxel combination therapy in a case of advanced breast cancer.** *OncoTargets and therapy* 2013, **6**:1393-1398.
236. Cottu PH, Fourchette V, Vincent-Salomon A, Kriegel I, Fromantin I: **Necrosis in breast cancer patients with skin metastases receiving bevacizumab-based therapy.** *Journal of wound care* 2011, **20**(9):403-404, 406, 408 *passim*.
237. Kriegel I, Cottu PH, Fourchette V, Sanchez S, Fromantin I, Kirov K, Guillaume A, Pelloquin A, Esteve M, Salmon RJ: **Wound healing and catheter thrombosis after implantable venous access device placement in 266 breast cancers treated with bevacizumab therapy.** *Anti-cancer drugs* 2011, **22**(10):1020-1023.

238. Srivastava RK, Srivastava AR, Korsmeyer SJ, Nesterova M, Cho-Chung YS, Longo DL: **Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase.** *Molecular and cellular biology* 1998, **18**(6):3509-3517.
239. Tortora G, di Isernia G, Sandomenico C, Bianco R, Pomatico G, Pepe S, Bianco AR, Ciardiello F: **Synergistic inhibition of growth and induction of apoptosis by 8-chloro-cAMP and paclitaxel or cisplatin in human cancer cells.** *Cancer research* 1997, **57**(22):5107-5111.

