Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Licenciatura

Efectos del Vinorelbine in vitro sobre un carcinoma de células transicionales de vejiga

Russo, Daniela Marta

1997

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Russo, Daniela Marta. (1997). Efectos del Vinorelbine in vitro sobre un carcinoma de células transicionales de vejiga. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000525_Russo

Cita tipo Chicago:
Russo, Daniela Marta. "Efectos del Vinorelbine in vitro sobre un carcinoma de células transicionales de vejiga". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000525_Russo

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

Efectos del Vinorelbine *in vitro* e *in vivo* sobre un carcinoma de células transicionales de vejiga.

Autora: Daniela Marta Russo

Director del Seminario: **Dr. R. Daniel Bonfil**

Coordinadora: **Dra. Lilia Lauría**

Lugar de Trabajo: Laboratorio de la Fundación de Investigación del Cáncer (FUNDIC).
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO-CONICET).

Tesis de Licenciatura para optar por el título de Licenciada en Ciencias Biológicas.

N° 521

Buenos Aires, Julio de 1997.

N° - 525

DEDICATORIA

Quiero dedicarle este trabajo a quienes me acompañan incondicionalmente y me ayudaron a crecer:

A los que ya no están, por todo lo que me enseñaron y compartieron conmigo, mis abuelos: María Victoria Gabilondo de Russo y Juan José Russo, Alfredo Vidal y en especial a mi viejita querida: Sarah I. Belderrain de Vidal (Teté); y mi dulce tía: Sarah R. Vidal de Vicenzi (Chichina).

A mis adorados viejos: Jorge M. Russo y Marina B. V idal de Russo, por enseñarme a vivir y guiarme en todo, dejándome elegir libremente. A mis hermanos: Jorge, Roxana y Marina, por quererme y pelearme todos los días.
A Nené, mi tía abuela querida, que todos los días me regala su cariño.
Al más loquito de todos, al Negrito de mi corazón, Die, por ser mi gran amor y ayudarme tanto en todo.

A mis queridos padrinos, Martha y El Vasco, al tío Juan y a todos mis primos que me acompañaron desde pequeña.

A mis amigas y demás seres queridos, por aceptarme tal cual soy , y brindarme tanto cariño y apoyo.

INDICE TEMATICO

1. RESUMEN.....Pág. **1**

2. INTRODUCCION

2.1 Cáncer de vejiga..... Pág. **2**
2.2 Etiología de la recurrencia..... Pág. **3**
2.3 Invasión tumoral..... Pág. **4**
2.4 Tratamiento del cáncer superficial de vejiga..... Pág. **8**
2.4.a Quimioterapia intravesical
2.4.b Inmunoterapia
2.5 Drogas antineoplásicas..... Pág. **9**
2.5.a Estudio de drogas para el tratamiento intravesical
2.7 Alcaloides de la Vinca.....Pág. **10**
2.7.a Vinorelbine
2.7.b Mecanismo de acción de los alcaloides de la Vinca

3. OBJETIVOS.....Pág. **13**

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Experimentos *in vitro* .....Pág. **14**
Líneas celulares
Droga
Viabilidad y Proliferación celular
Cinética del Crecimiento celular
Quimiosensibilidad al VNR
Ensayo de Quimioinvasión
Ensayo de Quimiotaxis
Ensayo de Adhesión Celular
Zimografía de Gelatinasas
Microscopía Electrónica de Barrido

4.2 Experimentos *in vivo* .....Pág. **18**
Animales
Implante intravesical de células tumorales
Histopatología vesical

4.3 Análisis Estadísticos.....Pág. **20**

5. RESULTADOS

5.1 Experimentos *in vitro* .....Pág. **21**

5.2 Experimentos *in vivo*.....Pág. **30**

6. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....Pág. **34**

7. AGRADECIMIENTOS.....Pág. **37**

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....Pág. **38**

Los tratamientos disponibles para los pacientes con carcinoma superficial de vejiga no ofrecen resultados totalmente satisfactorios en cuanto a la profilaxis de la recurrencia tumoral o de la progresión a cáncer invasor. Por este motivo, se buscan drogas alternativas eficaces en la prevención. En este caso, se ensayó con un alcaloide de la Vinca de segunda generación, de conocida actividad antineoplásica sobre diferentes tipos de tumores. En nuestros estudios, el Vinorelbine (VNR) demostró poseer actividad antiproliferativa (IC_{50}= 21,6 nM) sobre MB-49, una línea celular derivada de un carcinoma de células transicionales de vejiga murino.

Se estudió el comportamiento *in vitro* de la línea MB-49 en presencia de VNR, en relación a los eventos esenciales para el proceso invasivo. El VNR interfirió significativamente con la capacidad invasiva de MB-49 (42,6% y 62,5% de inhibición para 1 y 10 nM de VNR respectivamente) y con la respuesta migratoria de dichas células frente al medio quimioatractante (43,2% y 75,62% de inhibición para 1 y 10 nM de VNR respectivamente).

En base a los resultados, se eligió un modelo animal adecuado para el estudio del VNR como posible tratamiento profiláctico de la recurrencia y/o progresión tumoral del cáncer de vejiga. Los ratones C57BL/6J, luego de ser implantados intravesicalmente con células singeneicas fueron inoculados por la misma vía con VNR (0,2mg). Se observó menor incidencia tumoral en aquellos animales tratados con VNR luego de 30 minutos o 24 hs respecto de los controles (66%, 36% y 86% respectivamente). Además, según el análisis histopatológico de las vejigas, existe mayor volumen tumoral y grado de invasividad de la pared vesical en aquellos no tratados, respecto a los expuestos a la droga.

Estas características permiten postular al VNR como un potencial candidato a la quimioterapia intravesical contra el cáncer superficial de vejiga.

Introducción

CANCER DE VEJIGA.

El **cáncer** suele presentarse como un conglomerado de células anormales (tumor) que proliferan descontroladamente y expresan diversos grados de fidelidad a las células precursoras (estructural o funcionalmente) (**51**). Clínicamente, abarca un extenso grupo de enfermedades con diferente diagnóstico, pronóstico y respuesta al tratamiento. En cuanto a la biología de la célula tumoral, las neoplasias muestran variable velocidad de crecimiento, grado de diferenciación, invasividad y potencial metastásico (**52**). En la mayoría de los cánceres, el factor causal no ha sido claramente definido, aunque se conocen diversos factores externos (químicos, radiación, etc.) e internos (predisposición genética) que pueden interactuar para iniciar y promover la carcinogénesis. Es decir, el iniciador tumoral provocará en la célula un cambio genético irreversible que permanecerá enmascarado hasta que otro agente (promotor tumoral) favorezca la expansión de la población celular que posee la mutación inicial, desarrollándose el cáncer.

Según su comportamiento biológico, los tumores se clasifican en benignos o malignos. Los primeros permanecen localizados en el área de origen sin penetrar los tejidos adyacentes o diseminarse a regiones distantes y los segundos tienen la propiedad de invadir y producir metástasis (**51**). Los tumores malignos son motivo de creciente preocupación en la Salud de América Latina a medida que se logra el control de las enfermedades transmisibles y el aumento de la expectativa de vida al nacer . De esta forma preponderan las enfermedades crónicas, entre ellas el cáncer, que en el 97% de los países del Continente Americano figura dentro de las primeras cinco causas de defunción (**45**).

Al igual que otros tumores sólidos, el **cáncer de vejiga** es una enfermedad con un pico de incidencia en la séptima década de la vida (80%). Por otra parte es el quinto tipo de cáncer en el hombre, y representa el 2% de los tumores malignos (**18, 51**). Los factores de riesgo para el cáncer de vejiga incluyen la exposición a pinturas, anilinas, caucho, o cuero en las industrias químicas; el hábito de fumar, infecciones parasitarias (esquistosomiasis) o la susceptibilidad genética (**18, 52**).

El 95% de las lesiones malignas de vejiga son de origen epitelial (urotelial), el resto son principalmente mesenquimatosas. La mayoría de los tumores epiteliales (95%) son carcinomas de células transicionales, el 3% carcinomas de células escamosas, y los restantes adenocarcinomas (**18**). Los pacientes con carcinoma de células transicionales de vejiga, a su vez, pueden presentar tumores superficiales o invasivos.

Alrededor del 75% de los **carcinomas de vejiga** son **superficiales** y a pesar de ser considerados de bajo potencial maligno pueden progresar a tumor invasor en el 10-25% de los casos (**18**). Por otra parte, el porcentaje de **recurrencia** es alto (50-80%) dentro de los 6-12 meses posteriores a la cirugía (resección transuretral) dificultando el tratamiento (**18**). Es por este motivo que es fundamental la prevención de la recurrencia y de la progresión del tumor con una terapia eficaz.

Actualmente, el tratamiento de estos pacientes está basado en la detección temprana, la resección transuretral y la administración intravesical de drogas antineoplásicas (quimioterapia intravesical) o la inmunoterapia. Para la **enfermedad recurrente** una de las opciones es la fulguración, además de la resección. En sólo una minoría de casos, se efectúa la cistectomía de segmentos debido a la tendencia del carcinoma a comprometer múltiples regiones de la mucosa vesical (**3**).

Los tumores **invasivos** son aquellos que han infiltrado la pared vesical e incluyen tumores papilares (de baja probabilidad de metástasis), tumores con proyecciones tentaculares (alta probabilidad de metástasis y más agresivos) y lesiones no resecables que producen dolor severo, obstrucción y hemorragia. Este tipo de cáncer presenta un alto riesgo de metástasis a distancia al diagnosticarlo, por ello, la estrategia es tratar las lesiones primarias además de la enfermedad distante **(18).** La cistectomía radical es el tratamiento de elección para la enfermedad invasiva confinada a la vejiga. En el caso del carcinoma de células transicionales metastásico o avanzado localmente, se hallaron esquemas de quimioterapia sistémica multidroga basados en Cisplatino (M-VAC: Methotrexate - Vinblastina - Adriamicina - Cisplatino) que alcanzan respuestas completas en un alto porcentaje de pacientes **(9)**. Pese a los progresos quirúrgicos para el tratamiento del carcinoma de vejiga invasivo, aún existen problemas asociados al procedimiento (selección de pacientes y momento de la intervención). Por otra parte, no se han obtenido respuestas completas con la terapia multidroga como neoadyuvante (estudios preclínicos), es decir, administrándose antes de la cirugía **(9)**.

La terapéutica ideal del tratamiento de la enfermedad local debería curar el cáncer y evitar la diseminación ganglionar, permitiendo la preservación del órgano.

Etiología de la recurrencia:

Existen dos probables etiologías de la recurrencia o recidiva del cáncer de vejiga **(57)**:

1) **Recurrencias de origen multifocal.**
2) **Recurrencias debidas a la implantación de células tumorales.**

El 30% de los carcinomas de vejiga son **multifocales**, es decir, todo el epitelio de la vejiga y del tracto urotelial puede sufrir una transformación maligna. Las recurrencias de este origen incluyen tumores no visibles endoscópicamente, áreas de la mucosa con atipía y regiones que previamente tuvieron carcinoma *in situ* (sin progresión a tumor invasivo) **(57)**. Por esto, luego de un tratamiento aparentemente exitoso de la lesión vesical, pueden originarse nuevos tumores en el mismo sitio (**recurrencia**) o en otras regiones del urotelio vesical (nuevo tumor) **(57)**.

Se sabe que las células transicionales regularmente exfolian del carcinoma. Por este motivo, resulta razonable pensar que la superficie urotelial traumatizada por una resección transuretral o fulguración sea un sitio propicio para el anclaje celular **(58)**. Esto explicaría el origen de las **recurrencias debidas a la implantación tumoral**, fenómeno que fue demostrado en animales inoculados transuretralmente con células transicionales tumorales. Se observó que éstas fueron capaces de implantarse y crecer progresivamente en la superficie epitelial vesical previamente denudada por un carcinógeno **(56)** o a través de electrocauterización **(46, 53, 58)**. Por el contrario, se determinó que es muy poco probable que el mismo número de células pueda implantarse en una vejiga normal si no se produjo la lesión previamente **(58)**.

Seguramente **ambos orígenes** contribuyen al aumento del porcentaje de recurrencia luego de la resección transuretral, por lo tanto, es importante utilizar la quimioterapia intravesical como adyuvante (droga administrada post-quirúrgicamente).

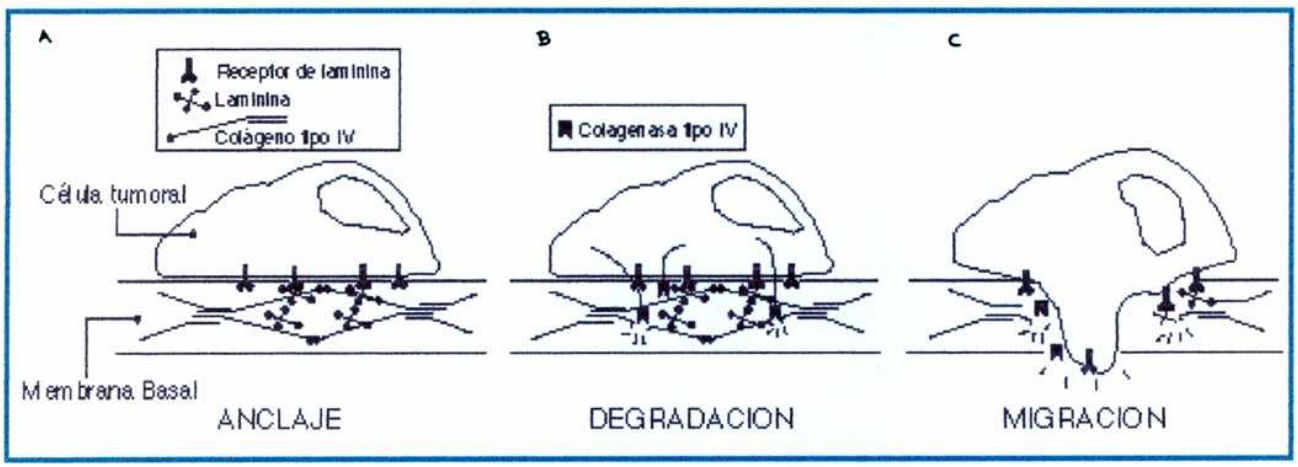
Invasión tumoral

Las células de diferentes tejidos producen y secretan un complejo estable de macromoléculas que actúa como un adhesivo intercelular, conocido como **matriz extracelular** (MEC). Se ha comprobado que la MEC está involucrada en numerosas funciones celulares como por ejemplo sostén estructural, regulación de la motilidad y migración celular, diferenciación, mitogénesis, etc., efectuadas por medio de la interacción entre las moléculas pertenecientes a la matriz y receptores celulares para dichas moléculas (**36**). Existen dos tipos de MEC: la **membrana basal** (MB) y el **estroma intersticial**. En condiciones normales, ambas forman una barrera impermeable a células y macromoléculas que es penetrada sólo en caso de inflamación, o reparación del tejido. Sin embargo, en el sitio en el cual contacta con un tumor invasivo, la matriz es digerida por enzimas proteolíticas (**36**), permitiendo el pasaje de células y macromoléculas. Durante la transición del carcinoma *in situ* al invasivo, las células neoplásicas penetran la membrana basal epitelial e ingresan en el estroma intersticial. Una vez allí, tienen acceso a los vasos linfáticos y sanguíneos, diseminándose a distancia (**36**).

En el caso de los tejidos epiteliales, la MEC está organizada como MB, una lámina que separa dicho tejido del estroma adyacente y que está compuesta principalmente por glicoproteínas (laminina, fibronectina, entactina, nidogen), colágeno tipo IV, y proteoglicanos (heparán-sulfato) que interaccionan entre sí formando una estructura laminar flexible e impermeable (**27**).

Se ha postulado una hipótesis de tres pasos para describir la secuencia bioquímica de eventos que existen durante la invasión tumoral (**36**) los cuales se esquematizan en la **FIGURA 1**. El primer paso es el anclaje celular (A) a través de receptores y moléculas de adhesión de la superficie celular que interaccionan específicamente con componentes de la MEC. Luego, la célula anclada secreta enzimas hidrolíticas (proteasas) (B) que degradan localmente la matriz. Finalmente, ocurre la migración (C) celular hacia la región de la matriz modificada por la proteólisis en respuesta a un estímulo quimiotáctico específico (**39**). Estos pasos se reiteran cíclicamente durante la invasión y son cruciales en la diseminación metastásica de células tumorales (**68**).

FIGURA 1. Esquema del proceso invasivo tumoral (hipótesis de tres pasos).



Se han desarrollado varios **sistemas *in vitro* para cuantificar la invasividad tumoral**. Algunos emplean tejidos que contienen una MB u ór ganos enteros (pared de vejiga (**23**), amnios (**37**), y membranas corioalantoideas de pollo (**38**)). Se asume que es la MB de estos tejidos la que provee una barrera al pasaje celular, aunque no ha sido probado directamente. En otros casos, puede simularse ésta colocando sobre el filtro poroso de una cámara especial (de Boyden modificada o transwells), discos de colágeno IV liofilizado y laminina (**67**), o un recubrimiento de **membrana basal reconstituída**, conocida como **MATRIGEL** (MG) (**2**).

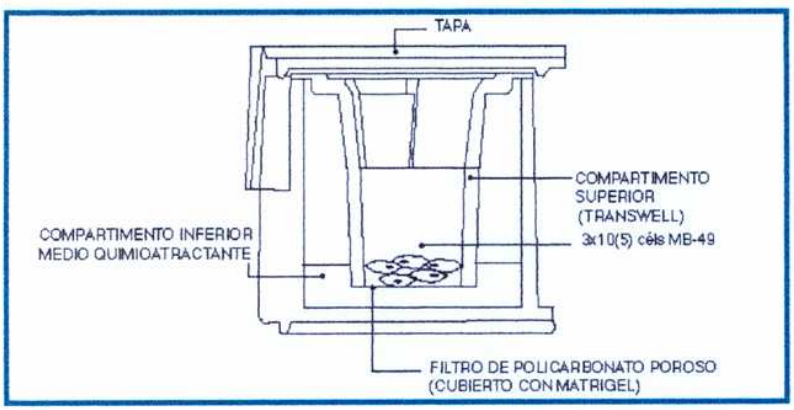
El MG es una membrana basal reconstituída extraída del sarcoma de Englebreth-Holm-Swarm (EHS) (**27**). Posee una consistencia gelatinosa y se emplea para cubrir los poros del filtro de policarbonato de la cámara o del transwell empleados en el ensayo de quimioinvasión. La formación del gel es fuertemente dependiente de la temperatura (rango de polimerización 20-50ºC) (**27**). El objetivo del recubrimiento o "coating" con MG es impedir la libre migración celular a través de los poros.

En el **ensayo de quimioinvasión** con MG (**2**), se evalúa la capacidad invasiva de las células frente a un estímulo quimiotáctico. Si éstas son capaces de adherirse a la matriz, degradarla y migrar hacia la cámara inferior estimuladas por el medio quimioatractante, se dice que poseen potencial invasivo *in vitro*. Dado que este ensayo no está formado por una capa contínua de células endoteliales que retracen la invasión, como en el caso de los que emplean tejidos, las células cruzan la matriz más rápidamente que en otros sistemas *in vitro* (1-3 días), *o in vivo* (3 a 5 días) (**68**).

La cámara que se utiliza en el ensayo está constituída por un transwell o compartimento superior que posee un filtro de policarbonato poroso. El diámetro de dichos poros es tal, que las células sólo pueden atravesarlo libremente si no existe el recubrimiento de MG que gelifica sobre ellos. El compartimiento inferior contiene un medio quimioatractante y el superior, células cuya invasividad va a determinarse. Como medida de dicha capacidad se utiliza el número de células que atraviesa el filtro recubierto con MG (**FIGURA 2**). La degradación de la barrera es efectuada por proteasas secretadas por las células y es esencial para que se produzca la migración celular hacia el quimioatractante presente en el compartimiento inferior.

Ya que el medio condicionado de fibroblastos NIH-3T3 contiene factores como la fibronectina, o el colágeno, que estimulan la penetración celular (**2**), se lo emplea generalmente como medio quimioatractante.

FIGURA 2. Esquema de la cámara empleada en el ensayo de quimioinvasión.



Este ensayo puede ser utilizado para buscar agentes que alteren el comportamiento invasivo y no necesariamente sean citotóxicos. Es por esta razón que quisimos evaluar los efectos del VNR sobre la capacidad invasiva de la línea MB-49, con dosis de baja toxicidad, que son esperadas luego de la dilución de la droga con la orina presente en la vejiga (**55**).

Se ha mencionado que como primer paso para la invasión tumoral es necesario el **anclaje** de la célula a través de interacciones entre los componentes de su superficie y los de la MEC. Estas uniones son específicas, y generan señales internas que pueden modificar la proliferación celular y la expresión de genes (**41**).

Por otra parte, la **migración** de las células tumorales, es producida en respuesta a un estímulo quimioatractante. Esta respuesta también es mediada por receptores de la superficie celular.

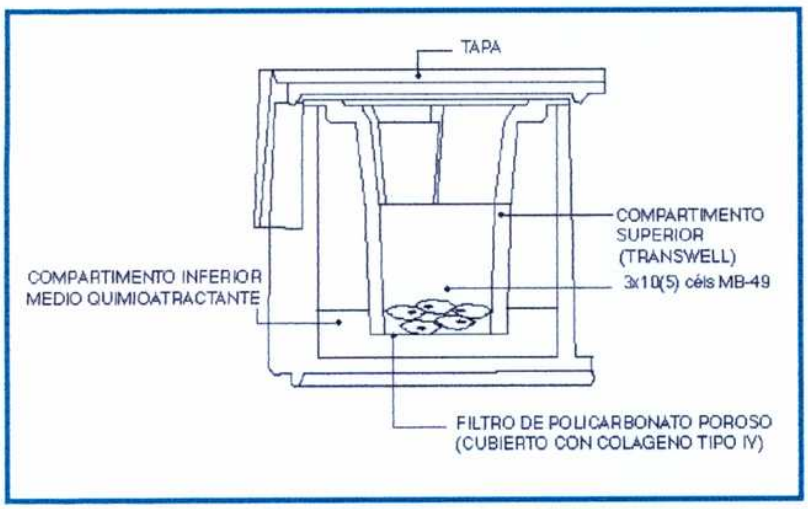
Por lo tanto, para evaluar el proceso invasivo es fundamental realizar los **ensayos de adhesión y quimiotaxis**, además de un estudio enzimático. De esta manera, se puede discernir cuál/es de estas propiedades fue alterada provocando un efecto anti-invasivo *in vitro*.

El **ensayo de adhesión**, consiste en determinar el porcentaje de células que permanecen ancladas al sustrato colocado en el fondo del pocillo de una placa de cultivo. Como sustratos, se emplean componentes de la matriz extracelular (como el colágeno, la fibronectina o la laminina) o el MG (MB reconstituída) (**2**).

El **ensayo de quimiotaxis** se realiza en el mismo dispositivo (**transwell**) empleado para la invasión *in vitro* sólo que la membrana porosa de policarbonato es cubierta con colágeno tipo IV (**FIGURA 3**), en vez de MG, con el fin de ofrecer un sustrato de adhesión celular. Las uniones intermoleculares del colágeno tipo IV forman una superficie reticulada que no obstruye el pasaje de las células a través de los poros del filtro (**27**).

El medio quimioatractante empleado en la cámara inferior es medio condicionado obtenido a partir de fibroblastos NIH-3T3.

FIGURA 3. Esquema de la cámara empleada en el ensayo de quimiotaxis.



La **proteólisis** y migración a través de las barreras tisulares son funciones celulares normales en condiciones fisiológicas específicas. Para que exista la invasión deben ocurrir eventos cíclicos de anclaje y liberación de enzimas proteolíticas en forma controlada. Esto implica su regulación, aún en el caso de las células tumorales, en forma temporal y espacial con respecto al anclaje celular . La actividad proteolítica es un balance entre la concentración local de enzimas activadas y de sus inhibidores endógenos (**40**).

La degradación de la MEC producida durante la invasión requiere de la acción de enzimas sintetizadas localmente por las células neoplásicas o estromales. La mayoría de éstas son proteasas altamente relacionadas, conocidas como **metaloproteasas de la matriz** (**MMPs**) que son secretadas en forma de zimógenos o proenzimas (**61**).Otras enzimas que contribuyen a la degradación de la MEC directamente o como activadores de MMPs, son las cisteino-proteasas (catepsina B) o serino-proteasas (urokinasa y activador tisular de plasminógeno)(**40, 52**).

Las MMPs se clasifican en 4 subgrupos:

a) **Colagenasas intersticiales** (MMP-1), **polimorfonucleares** (MMP-8) **y otras** (MMP-12 y MMP-13) que degradan colágenos fibrilares (Tipos I, II, III) y elastina.

b) **Gelatinasas A** (MMP-2) **y B** (MMP-9). Degradan colágenos tipo IV, V, VII y X (no fibrilares), y gelatina (colágeno desnaturalizado). También pueden actuar sinergísticamente con MMP-1 en la degradación de colágenos fibrilares.

c) **Estromelisinas** (MMP-3, MMP-10, MMP-11) y **matrilisina** (MMP-7), capaces de degradar proteoglicanos, laminina, fibronectina y algunos tipos de colágeno no fibrilares como el tipo IV.

d) **Metaloproteasas con dominio transmembrana** (MT-MMP-1, MT-MMP-2 y MT-MMP-3) localizadas en la superficie celular y mediadoras de la activación de otras metaloproteasas (**62, 65**).

Las **gelatinasas o colagenasas tipo IV** son enzimas claves en el proceso invasivo ya que clivan los dominios helicoidales del colágeno IV, uno de los componentes mayoritarios de la membrana basal, en un único sitio (**52**). La regulación de estas proteasas ocurre en diferentes niveles, alterando su actividad, síntesis o secreción. Existen numerosos moduladores, como por ejemplo inhibidores de proteasas (**52**), componentes de la matriz (laminina) (**69**), hormonas o factores de crecimiento (**69**), proteinquinasas (**7**) y oncogenes (**8**). Una familia importante de inhibidores endógenos de metaloproteasas son los TIMPs (inhibidores tisulares de metaloproteasas) que interfieren con la activación de los zimógenos (**63**).

Para evaluar el nivel de secreción de las gelatinasas en un medio condicionado suele utilizarse la **zimografía**. Por poseer actividad gelatinolítica (además de colagenolítica), estas enzimas pueden detectarse en geles SDS-PAGE co-polimerizados con gelatina. Las muestras no deben ser hervidas, para evitar su desnaturalización irreversible. Además, se realiza en condiciones no reductoras (sin ß-mercaptoetanol) que permiten la estabilidad de los puentes di-S estabilizadores de su estructura terciaria. Dado que el gel se realiza en presencia de SDS (agente desnaturalizante), éste debe ser eliminado lavando con Tritón X-100 y de esta forma reestablecer la conformación nativa enzimática. Posteriormente, se incuba en el buf fer óptimo

para permitir la degración de la gelatina (sustrato) en el sitio en el que se encuentra la enzima según su movilidad electroforética, que es proporcional al tamaño y forma de la proteína.

Una de las ventajas de ésta técnica es que por las características del gel puede utilizarse el medio condicionado de las células como fuente enzimática, sin necesidad de purificación. Este medio contiene (además de enzimas) factores secretados por las células en condiciones de medio de cultivo libre de suero fetal bovino (SFB) y presencia de seroalbúmina bovina (BSA). Esto último impide la interferencia de inhibidores séricos de proteasas y otras proteínas plasmáticas sobre la producción o actividad de las gelatinasas (**69**).

Tratamiento del Cáncer de Vejiga Superficial

La **quimioterapia antineoplásica** es la administración de drogas para tratar el cáncer. Según su objetivo, puede ser **paliativa** (mejora la calidad de vida del enfermo terminal controlando los síntomas), **adyuvante** (aumenta la tasa de curación o incrementa el período libre de enfermedad, aplicándose en estadios tempranos con posterioridad a la cirugía o radioterapia con intención curativa), **neoadyuvante** (con el objeto de disminuir el tamaño del tumor y eliminar metástasis ganglionares regionales se emplea en tumores localmente avanzados antes de la cirugía o radioterapia) **o de salvataje** (recuperación de la recaída del paciente luego de un período de respuesta aplicando múltiples drogas y en altas dosis) (**50, 66**).

Quimioterapia intravesical

La **quimioterapia intravesical** es ampliamente utilizada en pacientes con **cáncer superficial de vejiga** como **neoadyuvante** y **adyuvante** (antes y después de la resección local, respectivamente) (**50**). Sin embargo, variaciones en la dosis y esquema del tratamiento, así como en el tiempo transcurrido desde la cirugía al inicio de la quimioterapia local, provocan un amplio rango de respuestas (42% respuestas parciales y 85% de las completas)(**46**).

Los compuestos antitumorales administrados intravesicalmente presentan la ventaja de ser distribuídos en alta concentración al tumor y, al mismo tiempo, la de ocasionar menor toxicidad sistémica.

Al tomar contacto con la superficie del epitelio vesical, la droga debería destruir tumores distantes a la neoplasia original o no visibles endoscópicamente, sin perjudicar el urotelio normal. Por otra parte, podría ejercer su efecto citotóxico sobre toda aquella célula viable desprendida del tumor que permanezca en la vejiga post-quirúrgicamente. Esto último es fundamental para la reducción de la probabilidad de implantación celular (**58**).

Los agentes antineoplásicos que se emplean más frecuentemente por esta vía son: Thiotepa, Mitomicina C, y Adriamicina (o Doxorrubicina). Algunos de estos causan cambios morfológicos del urotelio normal (degeneración, vacuolización, exfoliación, etc.) por lo cual, su empleo prolongado podría causar finalmente una neoplasia vesical (**20, 59**). Por ejemplo, la Mitomicina C es capaz de inducir carcinoma de células transicionales (TCC) de vejiga, luego de repetidas instilaciones en ratones de la cepa C3H/He (**59**). Estudios realizados en animales (**20**) demuestran que puede producirse inflamación de la mucosa vesical e

hiperplasia urotelial con estos antineoplásicos.

En humanos, existen efectos tóxicos asociados al empleo de drogas administradas por esta vía como mielosupresión, síntomas de irritación vesical (cistitis química), y reacciones alérgicas (dermatitis)(**18, 57**).

Inmunoterapia

Desde 1976, se conocen los efectos antineoplásicos del tratamiento intravesical con BCG (bacilo Calmette-Guerin) sobre el carcinoma superficial de vejiga (**42**). Se emplea en pacientes con carcinomas residuales superficiales (**17, 43**) o *in situ* (**24**) y en aquellos libres de tumor luego de la cirugía (**10, 31**).

El tratamiento del carcinoma superficial de vejiga con BCG intravesical es el más efectivo en el uso clínico (**10, 31**). Sus efectos antitumorales estarían relacionados con la respuesta inmunológica del huésped, de allí que se lo llame **inmunoterapia**. Aunque el modo de acción de BCG no ha sido completamente dilucidado, estudios en animales sugieren que es importante la inmunocompetencia del huésped para que la eliminación del tumor sea mediada por células LAK (lymphokine activated killer) activadas por el bacilo (**34, 49**). Recientemente (**54**), se demostró *in vitro* que esta activación provoca la muerte tumoral por inducción de la apoptosis en células de vejiga mediada por citotoxicidad T.

Aunque BCG no puede prolongar la sobrevida general de los pacientes con enfermedad *in situ*, se alcanzan respuestas completas cercanas al 70%, disminuyendo la necesidad de cistectomía de recuperación (**24, 30**).

Estudios en fase clínica, demostraron que este tratamiento retarda la recurrencia y la progresión del tumor (**25**).

Desafortunadamente, la quimioterapia intravesical con BCG produce una respuesta local inflamatoria intensa en la mayoría de los pacientes (**32**). Además, tiene un efecto tóxico acumulativo en terapias prolongadas, y en otros casos, deja de ser efectiva luego de 6 semanas de tratamiento (**9**). Las complicaciones sistémicas severas son muy poco frecuentes y generalmente son resultado de una cateterización traumática (**9**). Estas pueden presentarse como fiebre, neumonitis, hepatitis, artritis, abscesos o alergia cutánea (**18, 32**).

Drogas Antineoplásicas. Clasificación

Los agentes quimioterapéuticos utilizados contra el cáncer se clasifican en (**50, 66**):

1) **Alquilantes:** son drogas de acción inespecífica, que se incorporan covalentemente a una macromolécula (lípidos, proteínas, RNA o DNA). El efecto antitumoral más importante se da en el caso del DNA, inhibiendo su síntesis, degradándolo o produciendo mutaciones. Ejemplos de estos agentes: Mitomicina C (antibiótico), Cisplatino (compuesto derivado del Platino), o la Ciclofosfamida (mostaza nitrogenada), entre otros.

2) Antimetabolitos: son drogas análogas a un metabolito fisiológico, no metabolizables, que se unen al sitio activo de la enzima compitiendo con el sustrato verdadero. Ejemplos: Methotrexate (análogo del ácido fólico) o el 5' fluorouracilo (análogo de las pirimidinas).

3) Otros (antraciclinas, alcaloides de la vinca, generadores de radicales libres, otras drogas). Este amplio grupo incluye antibióticos intercalantes (Actinomicina D y Doxorrubicina), o generadores de radicales libres (Antraciclinas) y drogas que afectan proteínas fibrilares (actina, tubulina, MAPs, etc.) como el Taxol, los Alcaloides de la Vinca (AV), o la Estramustina, entre otros.

Estudio de drogas potencialmente eficaces en el tratamiento intravesical. Modelo de implantación tumoral.

A pesar de los grandes avances en el desarrollo y testeo de nuevos compuestos antitumorales y sus combinaciones, sólo un escaso número ha sido totalmente eficiente en el tratamiento de pacientes con cáncer de vejiga. Por lo tanto, el uso de un modelo adecuado para la búsqueda de nuevos agentes activos contra el cáncer superficial de vejiga, puede ser útil para proveer información cualitativa sobre la acción antineoplásica, diagramar el esquema de tratamiento y determinar qué combinaciones producen un efecto antitumoral aditivo sin un incremento significativo de la toxicidad.

Se han diseñado diferentes **modelos de implantación tumoral** (**46, 53, 56, 58**) que sirven para estudiar la actividad de un agente antineoplásico en el sitio anatómico natural. La denudación o ulceración de la mucosa vesical, por medio de compuestos químicos (**56**) o electrocauterización (**46, 53, 58**), produce un daño urotelial que favorece la implantación de las células neoplásicas. Por otra parte, existen diversas técnicas para efectuar la instilación celular basadas en el empleo de catéteres colocados transuretralmente. Un ejemplo es la utilizada por Shapiro (**53**), que fue elegida en nuestro laboratorio para realizar los experimentos *in vivo*.

Alcaloides de la Vinca. Vinorelbine.

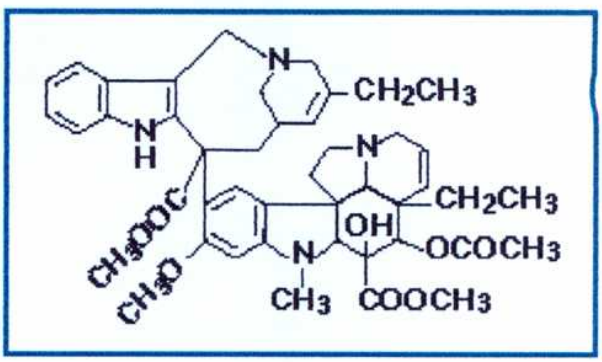
Fueron descubiertos hace más de 30 años y aislados de plantas *Vinca rosea L* y *Catharantus roseus G Don* (**6**). Se obtienen de las partes aéreas de la planta (principalmente de las hojas), con bajo rendimiento (10 a 100 g/ton de material seco).

Dentro de los alcaloides de la Vinca de primera generación (naturales), se encuentran la Vinblastina (VBL), la Vincristina (VCR) y la Vindesina (VND); las dos primeras, son ampliamente utilizadas como agentes quimioterapéuticos en diferentes tipos de cánceres, causando la inhibición del crecimiento celular por bloqueo de la polimerización de los microtúbulos, disolviendo los husos mitóticos y deteniendo las células en METAFASE (**6**). Su uso clínico está limitado por neuropatías relacionadas con la alteración de microtúbulos y transporte axonales. Por esto, se buscaron compuestos con similar espectro antitumoral y menor neurotoxicidad.

Vinorelbine

El **Vinorelbine** (5'-nor-anhidrovinblastina) (**FIGURA 4**), derivado semisintético de la VBL, es un **alcaloide de la Vinca** de segunda generación (no-natural) (**33, 48**). Con respecto a los AV de origen natural, posee mayor actividad sobre microtúbulos mitóticos y menor sobre los de tipo axonal. Esto se relacionaría con el potente efecto antitumoral y el mínimo potencial neurotóxico que son característicos del VNR (**5**).

FIGURA 4. Estructura química del Vinorelbine.



Se determinó *in vitro* la actividad antineoplásica del Vinorelbine (**13**) en más de 30 líneas celulares derivadas de tumores de origen humano y murino (leucemias, carcinoma de ovario, pulmón, colon, mama y melanoma).

Estudios recientes (**16**), indican que la toxicidad limitante para la quimioterapia sistémica con VNR es la hematotoxicidad (mielosupresión) dependiendo de la dosis empleada.

La actividad antineoplásica de Vinorelbine *in vivo* fue estudiada en tumores murinos y humanos implantados en ratones. Los principales efectos fueron obtenidos al administrar el alcaloide por la vía endovenosa en leucemias, melanoma, reticulosarcoma, y carcinomas de pulmón, mama, y gástrico (**13, 28**).

En 1989, fue aprobado en Francia para su uso en el tratamiento del carcinoma broncopulmonar de células no pequeñas no quirúrgico (**15**) y en 1990 contra el cáncer de mama diseminado (**11**). Se han realizado estudios clínicos (monoquimioterapia) en pacientes con cánceres bronquiales de células no pequeñas (**15**), en los que es el agente más activo, al igual que en los cánceres de mama y ovario metastásicos (**11, 21**).

El VNR penetra en la célula por difusión, el 35% del transporte es en forma pasiva y el 25% activa, es decir, dependiente de energía. Existen dos puntos de unión a la membrana plasmática de diferente afinidad (**29**). La reducida actividad del VNR en cepas portadoras del fenotipo de resistencia a multidroga sugiere que este mecanismo afecta fuertemente la acción del antineoplásico. Recientemente, se ha comprobado que la resistencia al VNR estaría mediada por la glicoproteína P (**1**).

Los efectos del VNR *in vitro* son similares a los de la Vincristina sobre la tubulina, aunque existen

diferencias en tumores murinos y humanos (**4**).

Mecanismo de acción de los Alcaloides de la Vinca.

Los alcaloides de la Vinca tienen diferentes efectos en la quimioterapia del cáncer, pero el mecanismo de acción sobre los microtúbulos mitóticos es idéntico. Los microtúbulos están implicados en la estructura del citoesqueleto, la migración de los cromosomas en la mitosis y el transporte neuronal, entre otros. A bajas concentraciones, estos compuestos provocan la **despolimerización de los microtúbulos interpolares** (**5**) (induciendo bloqueo celular en METAFASE) y a altas concentraciones afectan los del cinetocoro. En particular, el **Vinorelbine** bloquea las células en **PROFASE**, ya que es específico sobre éstos últimos y otros elementos, inhibiendo la transición de PROFASE a METAFASE (**5**), sin afectar los microtúbulos del tipo axonal. Esto explicaría la citotoxicidad diferencial y la neurotoxicidad de ciertos alcaloides de la Vinca (**19**).

La interacción de los AV con la tubulina (proteína ubicua asociada a otras) implica la inhibición del ensamblaje de ésta en los microtúbulos y su agregación formando paracristales (**19**).

O b j e t i v o s

* Estudiar los efectos del Vinorelbine (VNR) sobre la proliferación y la capacidad invasiva *in vitro* de la línea MB-49 (carcinoma de células transicionales de vejiga murina).

* Evaluar la terapia intravesical con una dosis única de VNR, como posible tratamiento para el carcinoma de células transicionales de vejiga, utilizando para ello un modelo animal (ratones C57BL/6J) en el que se implantan ortotópicamente células tumorales de vejiga singeneicas (MB-49).

Materiales y Métodos

MATERIALES Y METODOS:

Experimentos *in vitro*

Líneas celulares:

Se utilizó la línea MB-49, derivada de un carcinoma de células transicionales de vejiga, inducido químicamente con 7,12-dimetilbenzo-antraceno en un ratón C57BL/6J (facilitada por el Dr .E.C.Lattime, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA) (**64**). Las células fueron crecidas en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, Missouri) con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland) a 37ºC en una atmósfera de 5% CO_2.

La línea NIH-3T3, derivada de fibroblastos de ratón Swiss, fue crecida en medio RPMI-1640 con 10% de SFB en las mismas condiciones de gas y temperatura. Estas células se utilizaron para obtener el **medio condicionado** preparado en RPMI-1640 con 0,1% de seroalbúmina bovina (BSA)(Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland), empleado en los ensayos de invasión y quimiotaxis *in vitro* como quimioatractante.

Droga:

El Vinorelbine (VNR, Navelbine® ditartrato, Pierre Fabre Medicament, Boulogne-sur-Seine, France) fue diluído en medio de cultivo (RPMI-1640) suplementado con 10% de SFB a las concentraciones indicadas en cada experimento. (PM: 1079,15)

Viabilidad y proliferación celular. Ensayo colorimétrico MTS-PMS:

La viabilidad y proliferación celular fueron evaluadas empleando un ensayo colorimétrico que se basa en la conversión, directamente en la placa, de la sal de tetrazolio MTS-PMS en un formazán soluble en el medio de cultivo. Este último es cuantificable espectrofotométricamente a 492 nm (Cell Titer 96 AQueous®(Promega, Madison, WI)). La absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo. La reacción (biorreducción) es llevada a cabo por dehidrogenasas mitocondriales, detectables sólo en células metabólicamente activas.

Se colocaron 20μl del reactivo MTS-PMS por well, conteniendo 100μl de medio de cultivo RPMI-1640 con 10% de SFB. Se incubó a 37ºC, durante 2 ó 3 hs, y se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas (Labsystems Uniskan I).

Cinética del crecimiento celular:

Para determinar las fases del crecimiento celular , se sembraron diferentes concentraciones de cé -

las MB-49 en placas de 96 wells (Corning) ($1x10^4$ céls/well, $5x10^3$ céls/well, $2,5x10^3$ céls/well, $1,25x10^3$ céls/well) y se evaluó su proliferación durante 6 días (una placa por día) con el ensayo MTS-PMS. Las placas fueron incubadas a 37ºC en una atmósfera con 5% CO_2 y el medio de cultivo, RPMI-1640 con 10% de SFB, fue renovado diariamente antes de proceder con el ensayo colorimétrico.

Todas las dosis celulares fueron realizadas por cuadruplicado desde el primer al sexto día de ensayo.

Ensayo de Quimiosensibilidad:

Se sembraron $2,5x10^3$ células/well/100μl (en crecimiento exponencial) en una placa de 96 wells de fondo plano y se incubaron por 48 hs, a 37ºC en 5% CO_2. El medio de cultivo (RPMI-1640 con 10% SFB) fue reemplazado por 100μl de medio con Vinorelbine (dosis entre 0,04 nM y 100 μM). Cada dosis de VNR fue ensayada por tri- o cuadruplicado. Las células fueron expuestas durante 3hs a la droga, en estufa gaseada (5% CO_2) a 37ºC. Luego, se permitió la recuperación celular por 24 hs, colocando 100μl de medio de cultivo fresco sin VNR e incubando nuevamente a 37ºC y 5% CO_2. Se evaluó la viabilidad celular con el ensayo MTS-PMS.

Invasividad tumoral in vitro:

Para determinar las condiciones que permitieran un ensayo de invasión *in vitro* rápido y discriminatorio, se varió la concentración (25-50μg de proteína total) de matrigel (MG) (Collaborative Biomedical Products, Bedford, Maryland) colocada sobre los filtros de policarbonato con poro de 8 ó 12μm. Estos filtros o membranas porosas separan dos compartimientos de una cámara especial (**transwell cell culture chamber**) (Costar, Cambridge, MA.) de manera que las células colocadas en la parte superior deberán degradar el MG que cubre los poros del filtro para migrar a través de ellos hacia el compartimiento inferior estimuladas por el medio quimioatractante. De dicho ensayo, realizado a 37 ºC en 5% CO_2 por 18 hs, se determinó que el diámetro de poro que permite el pasaje celular por migración y no por gravedad es 8μm y que 25μg/100μl de MG forman una barrera suficiente para cubrir la superficie de dicho filtro.

Las células MB-49 fueron crecidas a semiconfluencia en flask de 25 cm^2, expuestas durante 24 hs a medio de cultivo adicionado con 10nM VNR, cosechadas y resuspendidas en medio RPMI-1640 con 0,1% BSA. Para la evaluación de la invasividad, se utilizó una suspensión celular de $3x10^5$ células MB-49/100μl del medio mencionado.

El día previo al inicio del ensayo, se colocaron 50μl (25μg/100μl) de MG frío (en hielo) diluído en medio de cultivo (RPMI-1640 con 0,1% BSA) en la parte superior del filtro poroso de policarbonato, y se dejó secar por 18 hs en esterilidad a temperatura ambiente para permitir la gelificación del MA TRIGEL. Por su consistencia gelatinosa (a temperatura ambiente), esta membrana basal reconstituída impide el pasaje celular a través de los poros del filtro de la cámara, y puede ser atravesada únicamente después de ser degradada por las enzimas proteolíticas secretadas por las células. Para evitar el agregado exógeno de proteasas o sus inhibidores presentes en el suero fetal bovino, éste fue reemplazado por seroalbúmina bovina

al preparar los medios.

Al día siguiente se colocaron 400μl de medio condicionado (MC) de fibroblastos NIH-3T3 (RPMI-1640 con 0,1% BSA, incubados por 48 hs a 37 °C en 5% CO_2) en el compartimiento inferior de la cámara. Previa humidificación de los filtros con el medio (100μl), se agregaron 100μl de la suspensión celular ($3x10^5$ céls MB-49/100μl) en medio libre de suero y adicionado con BSA en la cámara superior y se incubó por 18 hs a 37°C.
Transcurrido este tiempo, se descartó el medio del compartimiento superior y se tripsinizaron las células adheridas a las paredes de la cámara y a la cara inferior del filtro (500μl de tripsina). Las células obtenidas fueron centrifugadas a baja velocidad y el pellet celular resuspendido en 20μl de PBS. Se efectuó el *recuento celular* en cámara de Neubauer y se calculó la concentración celular (número de céls/well) con la siguiente fórmula: $N/4 \times 2 \times 10^2$, siendo N, el número de células contadas en los 4 cuadrantes de la cámara.

Sólo las células con potencial invasivo son capaces de adherirse a la matriz reconstituída (MATRIGEL), degradarla (por medio de enzimas proteolíticas) y migrar desde la cámara superior a la inferior estimuladas por el medio quimioatractante. Por esto, también se lo llama **ensayo de quimioinvasión.**

Quimiotaxis in vitro:

Se procedió al igual que en el ensayo de invasión colocándose en lugar de MG, 50μl de (5μg/100μl) colágeno tipo IV (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland)(diluído en ácido acético 0,1M) sobre los filtros, y se lo dejó secar durante 18 hs en esterilidad a temperatura ambiente. Se sembraron las células en la cámara superior y en la inferior se colocó medio condicionado. (Ver detalles en Invasión *in vitro*).

Adhesión celular a sustrato in vitro:

La adhesión celular al colágeno tipo IV y al MG fue evaluada en placas de 96 wells, de fondo plano, cubiertas con dichos sustratos (5μg/100μl y 25μg/100μl respectivamente) y secadas en esterilidad durante 18 hs a temperatura ambiente. Las células MB-49 semiconfluentes (en crecimiento exponencial) fueron tratadas con VNR (10nM) en medio completo (RPMI-1640 con 10% SFB) por 24 hs. Transcurridas éstas, se eliminó el medio con suero, se tripsinizaron y centrifugaron las células a 1000 rpm por 10 min. Luego, fueron lavadas y resuspendidas en medio con 0,1% BSA y sembradas en dosis de $5x10^4$ células-/well sobre el MG o colágeno tipo IV. Se incubaron a 37°C en 5% CO_2 durante 30, 60, ó 90 min (*). Al cabo de estos tiempos, se aspiró el medio (conteniendo las células no adheridas, en suspensión), se lavó con PBS el pocillo y se agregaron 100μl de medio completo. Las células adheridas se cuantificaron con el ensayo de MTS-PMS. Por placa, se sembraron grupos 100% de células (VNR y CONTROL), los que no fueron absorbidos durante el experimento y se utilizaron como referencia del total de células sembradas. Para determinar el porcentaje de adhesión celular, se emplearon las absorbancias a 492 nm de los grupos CONTROL y VNR 100% céls (total de células sembradas) y se despejó de la siguiente fórmula:
% adh= A_{492nm} de muestra/A_{492nm} de céls totales x 100. Todos los grupos fueron ensayados por octuplicado y las lecturas fueron efectuadas luego de 2hs de colocado el reactivo MTS-PMS.

(*) Se sembraron diferentes placas para medir la adhesión a distintos tiempos.

Zimografía de gelatinasas secretadas al medio condicionado.

* Preparación de medios condicionados de células MB-49:

Cultivos celulares fueron crecidos a semiconfluencia en flasks de 25cm ^{2}, lavados con medio libre de SFB, y cultivados en medio RPMI-1640 con 0,1% BSA (seroalbúmina bovina) con 10nM VNR o sin él (CONTROL) por 24 hs a 37 °C en una atmósfera de 5% CO_2. Luego, se recolectó el medio y fue centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante libre de células, se denomina **medio condicionado** (MC).

NOTA: La cantidad de enzimas secretadas al medio condicionado fue normalizada a una misma concentración celular por lo que es comparable entre los grupos VNR y CONTROL ($4,5x10^6$ céls/ml).

* Zimografía:

Se evaluó la actividad gelatinolítica de las enzimas secretadas al MC en una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) que permite detectarla por contener el sustrato enzimático en él. Para ello se construyó un gel discontinuo formado por uno concentrador de 4% de poliacrilamida (**stacking gel**) y otro separador (**resolving gel**) de 7,5% de poliacrilamida co-polimerizado con gelatina 0,1% (**26**).

Luego se sembraron 20μl del MC diluído en Sample Buffer (0,015M Tris HCl pH 6.8, 10% glicerol, 0,5% SDS, 0,0003% Bromophenol Blue) y se corrió por 65 min a 122V. El gel fue incubado a temperatura ambiente por 1 h, con agitación horizontal, en Tris HCl 50mM pH 7.4 y 2,5% Tritón X-100 (Rinsing Buffer 1) eliminándose el SDS presente en el mismo. Luego se retiró el Tritón X-100 lavando, a temperatura ambiente, con Tris HCl 50mM pH 7.4 (3 lavados de 5 min) (Rinsing Buffer 2).

El gel se incubó a 37 °C por 72 hs en Buffer de Incubación (Tris HCl 50mM pH 7.4, ClNa 0,15M, Cl_2Ca 10mM) y se tiñó durante 1 h 30 min a temperatura ambiente con Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25% (Sigma) en 30% de metanol y 10% de ácido acético glacial. Se decoloró en la misma solución sin colorante (Destaining Solution).

Se utilizaron marcadores de PM standard como referencia durante la corrida electroforética (COLOR MARKER High Range (29-205 kD), o PRESTAINED SDS MOLECULAR WEIGHT MARKERS (27-180 kD) ambos de Sigma).

La actividad gelatinolítica se visualizó como bandas de degradación no coloreadas contra un fondo azul oscuro de gelatina intacta.

Microscopía Electrónica de Barrido.

Para efectuar la microscopía se cultivaron células MB-49 sobre discos de plástico colocados dentro de los pocillos de una placa de 24 wells (Corning). La dosis celular sembrada inicialmente fue de

$1x10^4$céls/disco en medio RPMI-1640 con 10% de SFB (volumen final 500μl). Las placas fueron incubadas durante 24 hs a 37°C en una atmósfera de 5% CO_2. Al día siguiente, se reemplazó el medio de cultivo por RPMI-1640 con 0,1% de BSA conteniendo diferentes dosis de VNR (0, 1 y 100 nM) y se incubó en estufa gaseada durante 24 hs. Transcurridas estas, se lavó cada pocillo con PBS, y se permitió la recuperación celular en medio RPMI-1640 con 10% de SFB (500μl) durante 24 hs en las mismas condiciones de gas y temperatura. Cada dosis de VNR fue efectuada por triplicado.

Las células presentes en los discos fueron fijadas en glutaraldehído 0,25 % (v/v en PBS) frío durante una hora. Luego se realizó una deshidratación seriada de las mismas en acetona (4 cambios de 15 minutos cada uno en acetona 20, 40, 60 y 80 % y 3 cambios de 15 minutos cada uno en acetona 100%). Los especímenes fueron visualizados y fotografiados a través de un microscopio electrónico de barrido a 4 kV y a 1800 aumentos (Scanning EM, JEOL JSM-3SCF).

Experimentos *in vivo*:

Animales:

Se utilizaron ratones hembras C57BL/6J de 2-3 meses de edad, provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata. Los animales fueron alimentados con pellet y agua *ad libitum* y mantenidos en el Bioterio del Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO).

Implante intravesical de células tumorales murinas singeneicas:

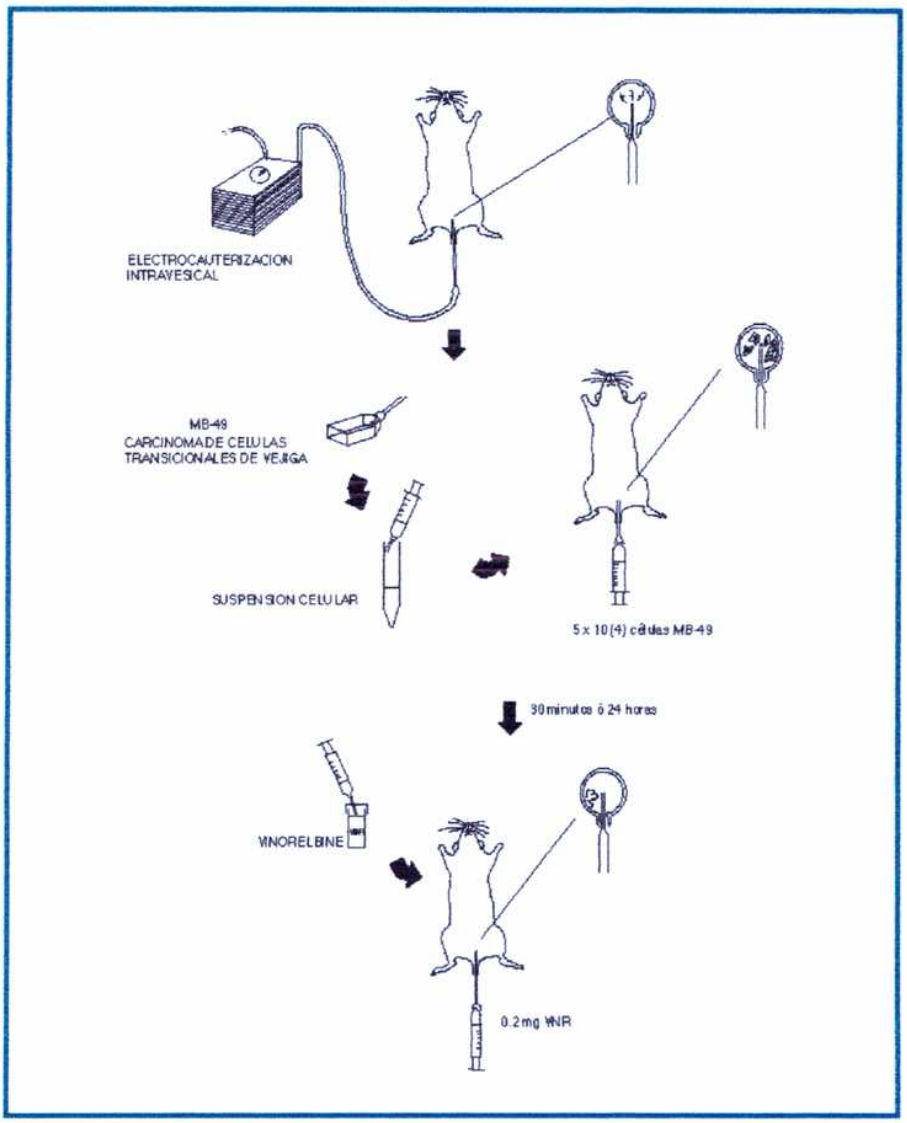
Para determinar si el tratamiento con Vinorelbine (VNR) es crucial en la prevención de la recurrencia, se eligió un sistema murino de implantación tumoral intravesical. En este modelo, ratones C57BL/6J fueron inoculados transuretralmente con la línea MB-49 (carcinoma de células transicionales de vejiga) singeneica, es decir, proveniente de un ratón de la misma cepa. Previamente, se injurió la mucosa vesical de los animales por medio de la electrocauterización para facilitar la adhesión de las células tumorales inoculadas intravesicalmente. Este hecho ha sido comprobado experimentalmente en animales y simularía lo ocurrido en los pacientes luego de la resección transuretral **(47, 58)**.

Se procedió según la metodología de Soloway **(58)** con las modificaciones realizadas posteriormente **(44, 53)**. Luego de anestesiar los ratones C57BL/6J intraperitonealmente con pentobarbital sódico (Nembutal, Sigma) (0,06 mg/g de peso del animal), se les afeitó la región dorso-lumbar y humectó con hidrogel conductor de electricidad (Rigogel, Rigó S.A., Argentina). Posteriormente, se aseguró a cada animal en decúbito dorsal sobre una placa metálica, y se colocó transuretralmente un catéter de teflón de 25 G (Jelco, Johnson and Johnson, Arlington, Virginia) como se indica en la **FIGURA 5**. Se vació el contenido de la vejiga, se electrocauterizó introduciendo un electrodo de acero inoxidable a través del catéter y aplicando un pulso de electricidad (4 seg) a la menor intensidad del electrocoagulador (modelo: E12,

Weros, Argentina). La electrocauterización permitió la posterior implantación de las células tumorales en la mucosa vesical injuriada.

Se realizaron los siguientes grupos: CONTROL, VNR 30 min, y VNR 24 hs. El electrodo fue extraído para efectuar la instilación de $5x10^4$ células tumorales MB-49 (0,1 ml para CONTROL y VNR 24 hs ó 0,05ml para VNR 30 min), a través del catéter. Según el grupo experimental, se inoculó VNR (0,2 mg) a los 30 min ó 24 hs posteriores a la instilación celular .

FIGURA 5. Esquema de la metodología empleada para realizar los experimentos *in vivo*.



Resultados

Estudio *in vitro* :

Se determinaron las fases del crecimiento *in vitro* de la línea MB-49, carcinoma de células transicionales de vejiga de ratón C57BL/6J, y las condiciones óptimas para su exposición al antineoplásico Vinorelbine. A partir del ensayo de proliferación (**cinética del crecimiento celular**) durante 6 días, se eligió la dosis celular y el tiempo de lectura a ensayar en el experimento de quimiosensibilidad a la droga.

Las **Figuras 6.A** y **6.B** muestran el patrón de crecimiento de las diferentes dosis celulares: 1,25x10^3céls/well (—), 2,5x10^3céls/well (...), 5x10^3céls/well (---) y 10x10^3céls/well (– –), en el transcurso de 6 días. La medición colorimétrica se efectuó a las 2 hs (**FIG 6.A**) y 3 hs (**FIG 6.B**) de agregado el reactivo MTS-PMS.

FIGURA 6. Proliferación de las células MB-49 en el transcurso de seis días.
A) Lectura de la absorbancia luego de 2 hs de colocado el reactivo MTS-PMS, B) idem a las 3hs.

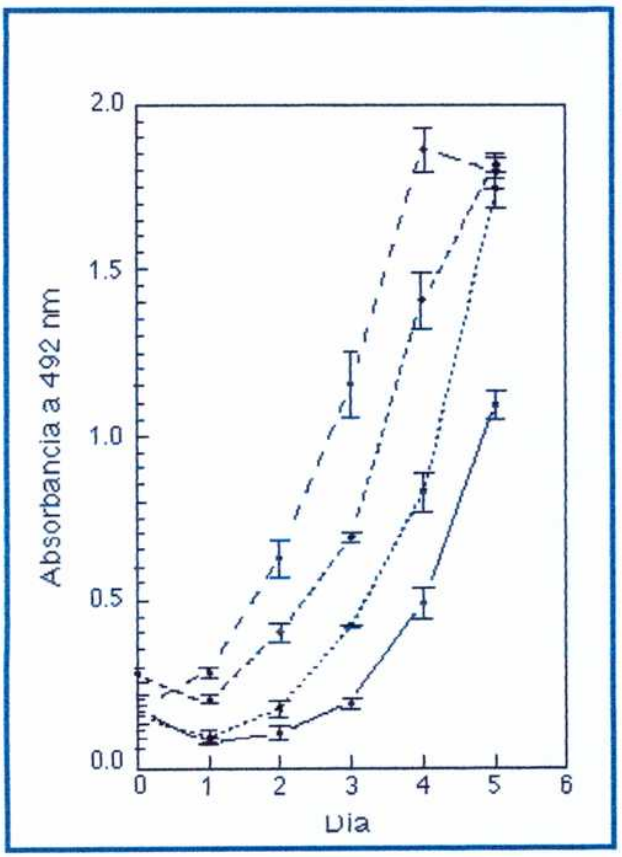
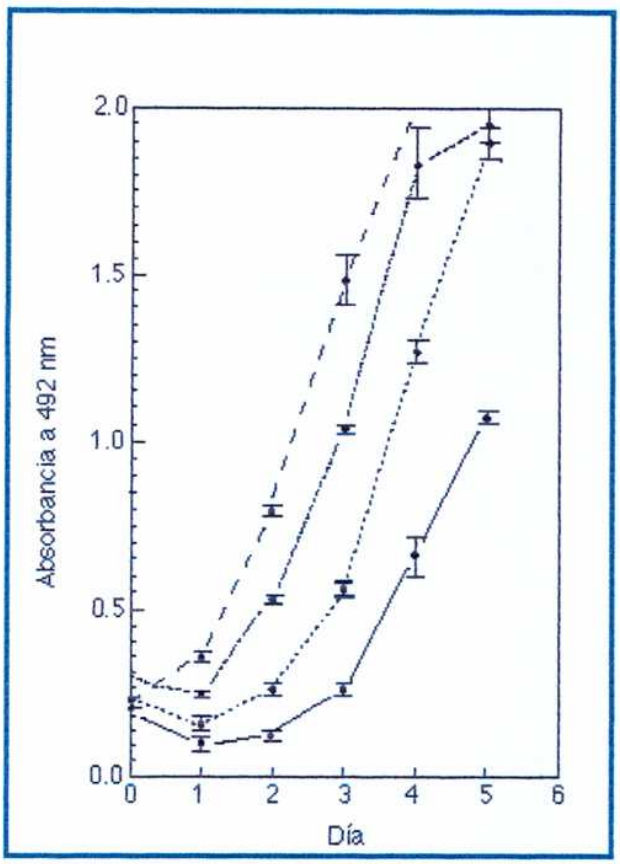


FIGURA 6A

FIGURA 6B



En ambas Figuras se observa que las pendientes de las curvas aumentan en forma exponencial a partir del día 2 debido a la proliferación celular. Recordemos que el VNR es fase específico, actúa en PROFASE, por lo tanto es importante que las células se encuentren en crecimiento al ser expuestas a él. Por esta razón, se colocó el alcaloide de la Vinca luego de 48 hs de la siembra celular en el ensayo de quimio - sensibilidad.

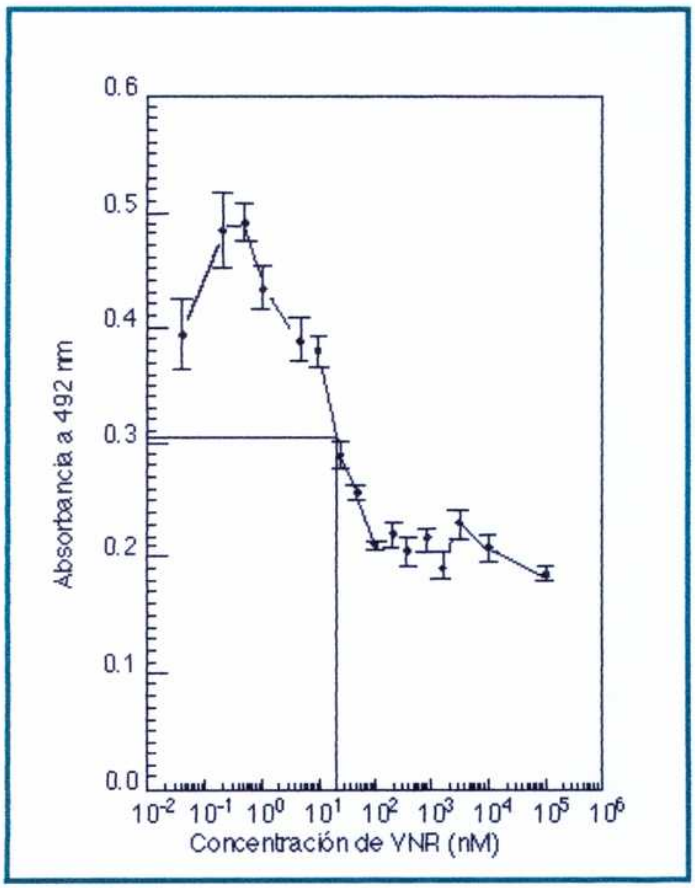
En las **Figuras 6.A** y **6.B** se observan, para una misma dosis celular, pendientes semejantes, por lo tanto corroboramos que el número de células viables está correlacionado linealmente con el aumento de la absorbancia (**12**) independientemente del tiempo de lectura a 492 nm.

El estudio de **quimiosensibilidad al VNR**, se efectuó con $2{,}5x10^3$ céls/well, éste número fue elegido del ensayo antes mencionado para mantenerlas creciendo en fase exponencial durante el experimento y poder medir la densidad óptica en la porción lineal de la curva. Dado que los valores de absorbancia son mayores en la **Figura 6.B**, se efectuó la lectura luego de 3 hs de agregado el reactivo MTS-PMS.

El ensayo de la **quimiosensibilidad** de la línea MB-49 al Vinorelbine evidencia que luego de una exposición de 3 hs a la droga, se produce una disminución en la proliferación/viabilidad celular (**Figura 7**). Esta no puede ser revertida luego de 24 hs de recuperación en medio con suero fetal bovino antes de

efectuar el ensayo del MTS-PMS. La pendiente negativa de la curva indica que el número de células viables decrece al aumentar la concentración de la droga (es un efecto dosis dependiente), alcanzando una inhibición máxima del 46,7% a 1600 nM de VNR. Dado que la medición de la absorbancia a 492 nm es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas en cultivo (viables), su descenso está correlacionado con la muerte celular y por esto decimos que el VNR ejerce un efecto citotóxico sobre MB-49. El valor de **IC50** (concentración de la droga necesaria para alcanzar la mitad (50 %) de la inhibición máxima del crecimiento)(**12, 71**) se determinó hallando el valor de la concentración de VNR (eje X) correspondiente a la mitad de la diferencia entre los valores de absorbancia máximo (sin VNR, 0 nM) y el mínimo (plateau), es decir la absorbancia : $A_{50}= 1/2 (A_{máx} + A_{mín})$. Para la exposición a VNR durante 3 hs, se obtuvo una IC50= 21,6 nM ($A_{50}= 0,305$, $A_{máx}= 0,415$, $A_{mín}= 0,194$).

FIGURA 7. Quimiosensibilidad de las células MB-49 al Vinorelbine.

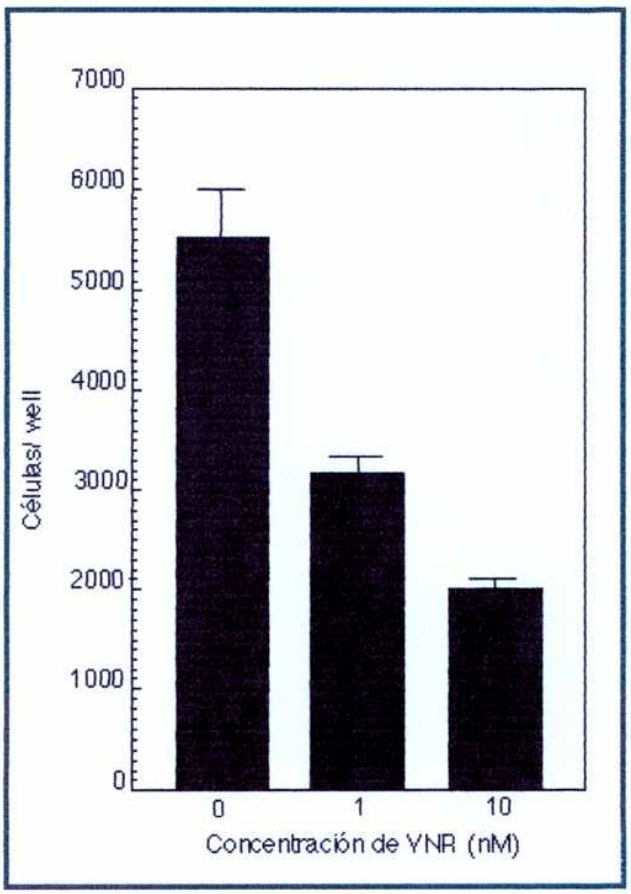


La concentración de VNR está representada en escala logarítmica.

Conociendo que existe este efecto sobre la línea MB-49, consideramos interesante estudiar el comportamiento de las células viables luego de ser expuestas a dosis subletales. Es importante tener en cuenta que luego de la cirugía transuretral, los pacientes son tratados con quimioterapia intravesical para prevenir la recurrencia por implantación celular. Las concentraciones subletales pueden alcanzarse dentro de la vejiga luego de la dilución de la droga con la orina. Por lo tanto, si VNR ejerciera alguna acción antineoplásica en estas condiciones sería muy ventajoso. En base a lo mencionado, se estudiaron los comportamientos celulares involucrados en la capacidad invasiva de la línea MB-49 *in vitro*.

En la **Figura 8**, se grafican los resultados obtenidos del **ensayo de invasividad tumoral *in vitro***. La capacidad invasiva de la línea MB-49 se vio afectada significativamente en presencia de VNR en dosis de baja toxicidad, 1 y 10 nM, reduciéndose un 42,6% y un 62,6% respectivamente.

FIGURA 8. Efecto del Vinorelbine sobre la invasividad *in vitro* de las células MB-49.



ANOVA : CONTROL vs VNR 1 nM: valor p Bonferroni: $p < 0,05$ **
CONTROL vs VNR 10 nM: valor p Bonferroni: $p < 0,001$ ***
VNR 10 nM vs VNR 1 nM: valor p Bonferroni: n.s. ($p > 0,05$)

Dado que sólo las células con potencial invasivo son capaces de adherirse a la matriz reconstituída (MATRIGEL), degradarla (por medio de enzimas proteolíticas) y migrar a través de ella, se estudiaron estos eventos *in vitro*.

Primeramente, se ensayó la **adhesión celular** sobre dos sustratos, el colágeno tipo IV y una membrana basal reconstituída (MATRIGEL). En la **Tabla 1** se observa que no existen diferencias significativas en la capacidad de adhesión al MATRIGEL entre los grupos CONTROL y VNR 10 nM. Sin embargo, existe una disminución del 11% (p=0,026, Test T alternativo de Welch), en la adhesión al **colágeno tipo IV** luego de 30 minutos de sembradas las células en el grupo tratado (**Tabla 2**).

TABLA 1. Efecto del Vinorelbine sobre la adhesión celular al MATRIGEL.

	Porcentaje de Adhesión celular al sustrato (media ± ES) MATRIGEL		
Tratamiento	30 min	60 min	90 min
CONTROL	79,06 ± 3,42%	77,12 ± 3,38%	86,20 ± 3,03%
VNR 10 nM	70,89 ± 1,57%	82,32 ± 2,26%	82,23 ± 1,26%

Test T alternativo de Welch p> 0,05 para todos los casos.

TABLA 2. Efecto del Vinorelbine sobre la adhesión celular al COLAGENO tipo IV.

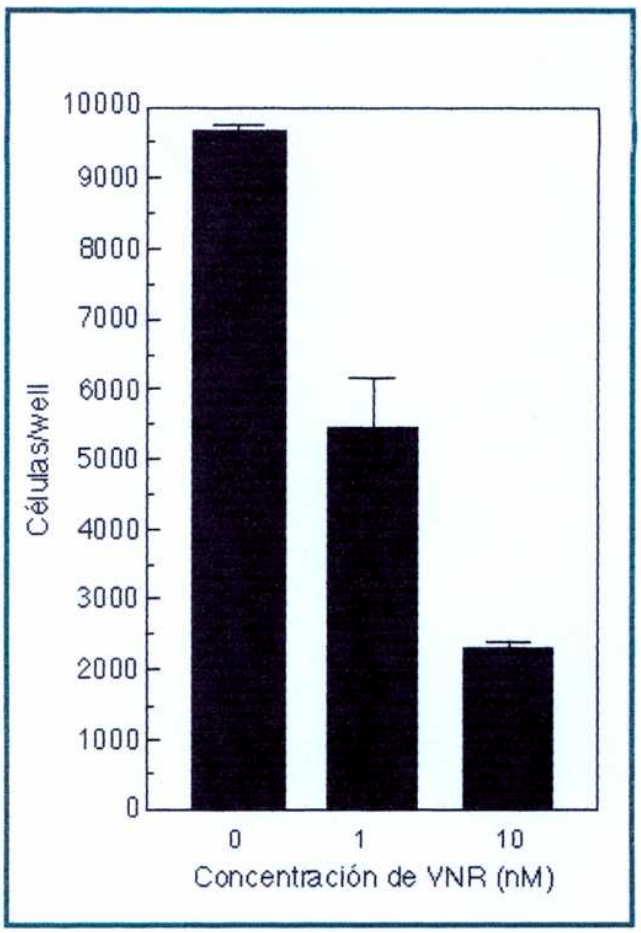
	Porcentaje de Adhesión celular al sustrato (media ± ES) COLAGENO IV		
Tratamiento	30 min	60 min	90 min
CONTROL	80,87 ± 2,76%	67,19 ± 2,70%	74,66 ± 1,76%
VNR 10 nM	71,98 ± 2,09% *	72,92 ± 1,02%	75,97 ± 0,85%

*p= 0,026 Test T alternativo de Welch

Por otra parte, se evaluó la actividad del VNR sobre la migración celular en el ensayo de **quimiotaxis *in vitro*** exponiendo las células MB-49 a dosis de toxicidad menor al IC_{50}. Recordemos que toda célula que posea receptores específicos para los agentes quimioatractantes, presentes en el medio condicionado de la cámara inferior , es estimulada a migrar hacia ésta última. Por lo tanto, si esta respuesta es

bloqueada, la migración celular no se producirá, interfiriendo con su capacidad invasiva. En los ensayos realizados, se determinó que la respuesta quimiotáctica es afectada significativamente por el VNR, ocasionando una reducción del 43,2% y 75,6% para 1 y 10 nM respectivamente (**Figura 9**).

FIGURA 9. Acción del Vinorelbine sobre la respuesta quimiotáctica *in vitro* de las células MB-49.



ANOVA : CONTROL vs VNR 1 nM: valor p Bonferroni: * $p < 0,05$
CONTROL vs VNR 10 nM: valor p Bonferroni: *** $p < 0,001$
VNR 10 nM vs VNR 1 nM: valor p Bonferroni: * $p < 0,05$

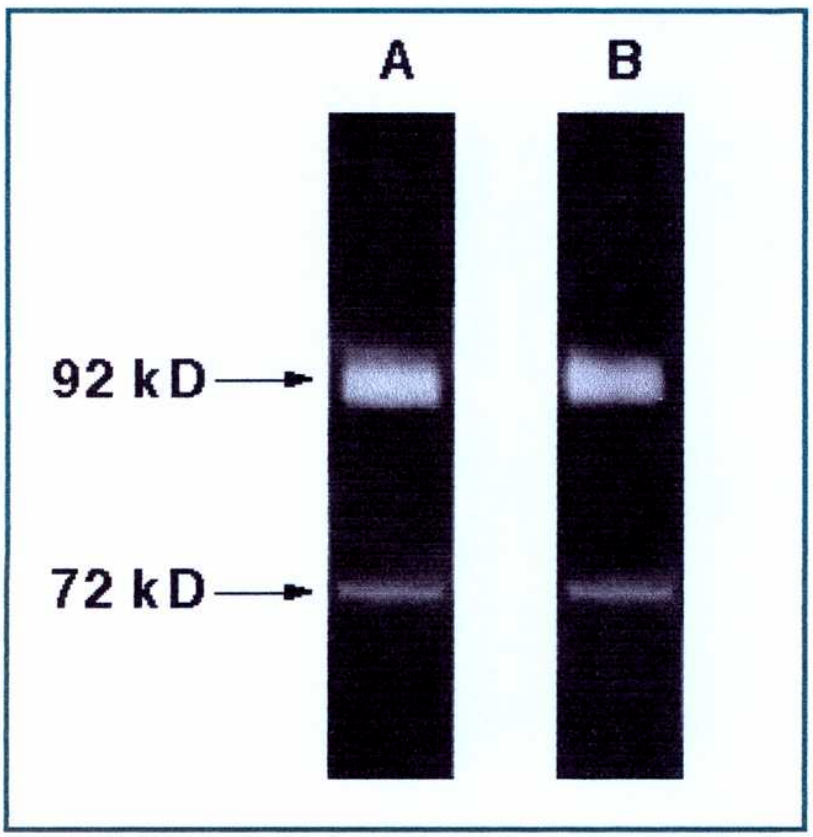
NOTA: La viabilidad de las células sobrevivientes a la exposición a VNR que fueron sometidas a los ensayos de invasión, adhesión y quimiotaxis fue evaluada por exclusión del Trypan Blue (superior al 92% en todos los casos).

Para determinar los efectos del VNR sobre las actividades gelatinasas/colagenasas tipo IV se-

cretadas al medio condicionado por la línea MB-49, se realizaron geles SDS-PAGE con 0,1% de gelatina (**zimografía en gelatina**). Estas enzimas clivan preferencialmente la gelatina, y en las condiciones ensayadas son detectadas como bandas de degradación, sin coloración, frente a un fondo azul de sustrato intacto. En el medio condicionado proveniente de la línea MB-49, los geles incubados durante 72 hs revelan dos bandas de actividad gelatinolítica. En base a la migración electroforética, se determinó que la banda de menor movilidad correspondería a MMP-9, colagenasa tipo IV con actividad gelatinasa de 92 kD, y la de mayor movilidad a MMP-2, con la misma actividad y de PM inferior , 72 kD. Los geles incubados durante 24 y 48 hs no permitían visualizar claramente la banda de 72 kD, por lo que se aumentó el tiempo de incubación a 72 hs.

En base a la intensidad de la banda, pueden cuantificarse las enzimas secretadas al medio condicionado por densitometría del gel. En los geles de 72 hs es evidente la diferencia de secreción de enzimas que existe en la línea MB-49, en la que prepondera la actividad MMP-9. En la **FIGURA 10** se observa un gel incubado durante 72 hs en el cual el número de células fue normalizado como se indica en MATERIALES Y METODOS para permitir la comparación entre los diferentes grupos.

FIGURA 10. Zimografía en gelatina de los medios condicionados derivados de células MB-49. Las células fueron expuestas durante 24 hs a 10 nM de Vinorelbine (calle **A**) o en ausencia de este (calle **B**). La actividad gelatinolítica se visualiza como bandas claras frente a un fondo oscuro de gelatina teñida luego de 72hs de incubación en el buf fer apropiado según se detalla en MATERIALES Y METODOS. Los números a la izquierda indican el peso molecular aparente de dichas bandas (en kD)



Según el análisis densitométrico de los geles de 72 hs, existen diferencias significativas en la intensidad de la banda correspondiente a 92 kD por el tratamiento con VNR durante 24 hs (en dosis de baja toxicidad): CONTROL= 1,00 ± 0,03, VNR 10 nM= 1,18 ± 0,03 (Test T de Student $p < 0,01$). Esto indica una mayor secreción de esta gelatinasa en dosis subletales, por el contrario no existen diferencias con respecto a la actividad de 72 kD.

Se visualizó la superficie celular de MB-49 empleando **microscopía electrónica de barrido**. En condiciones de cultivo libre de droga (**Figura 11.A**), la morfología de las células MB-49 es achatada e irregular, presentando un firme anclaje a la superficie del disco. En la fotografía, se observan agregados conformados por células en monocapa. Por otra parte, la superficie celular presenta numerosas proyecciones de la membrana citoplasmática (**Figura 11.A**).

La exposición al Vinorelbine ocasiona alteraciones en la superficie celular tal como lo evidencian las fotografías de las **Figuras 11.B** y **11.C**. Las células MB-49 tratadas con 1nM de la droga (**Figura 11.B**) presentan una morfología esferoide además de verse reducida la cantidad de proyecciones citoplasmáticas. Por otra parte, aquellas células que fueron expuestas al antineoplásico a mayores dosis (**Figura 11.C**) presentan poros en su superficie (característicos de la necrosis celular) y una reducción en el número de proyecciones de la membrana plasmática, prevaleciendo las células esferoides.

FIGURA 11. Microscopía electrónica de barrido de células MB-49 expuestas a diferentes dosis de Vinorelbine: 0 nM (A), 1 nM (B) y 100 nM (C), durante 24 hs. Aumento 1800X.

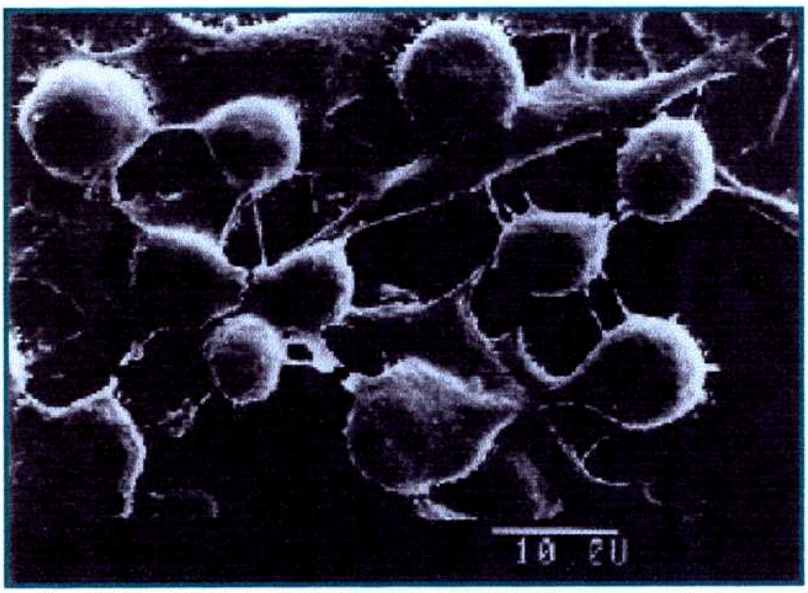
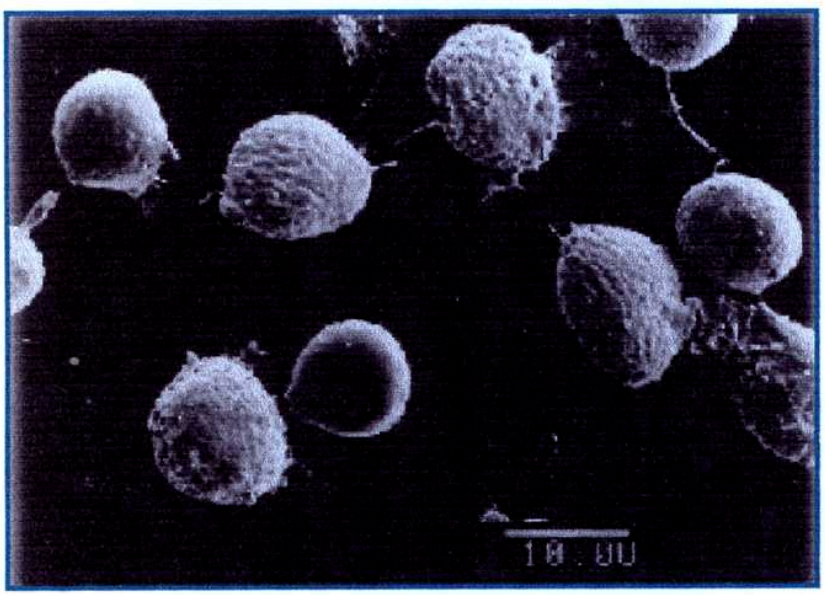


FIGURA 11.A

FIGURA 11.C



Estudios *in vivo* :

Para evaluar al VNR en cuanto a su eficacia en prevenir la implantación tumoral o la progresión a tumor invasivo, se procedió a la inoculación intravesical de ratones como se indicó anteriormente. En base a bibliografía (**46**), se seleccionó un período de tiempo que permitiera realizar el experimento en condi - ciones óptimas. Un estudio *in vitro* sobre carcinoma de vejiga humano indica que el tiempo mínimo para la implantación celular sobre matriz extracelular es de una hora, alcanzando un máximo a las 24 hs (**47**). Por otra parte, estudios con Thiotepa indican que una única dosis intravesical es efectiva en la prevención de la recurrencia administrada post-quirúrgicamente (**72**).

Por lo tanto, se instiló una dosis única del Vinorelbine luego de 30 minutos ó 24 hs de inoculadas las células de carcinoma transicional de vejiga en el sitio anatómico natural. Previamente, se verificó que su viabilidad era del 95% por exclusión del Trypan Blue.

Los ratones de todos los grupos fueron seleccionados al azar, electrocauterizados e inoculados con las células intravesicalmente. Por lo tanto, las diferencias en la incidencia tumoral luego de la adminis - tración de la droga, se deben a diferencias de implantación celular , y estas últimas son producto de la acción del VNR.

Según el análisis estadístico de los resultados, existen diferencias significativas en la incidencia tumoral del grupo tratado intravesicalmente con VNR luego de 24 hs y el control (**Tabla 3**). En el grupo VNR 30 minutos se observó una incidencia tumoral intermedia respecto de las determinadas en los demás grupos, sin detectarse diferencias estadísticamente significativas.

TABLA 3. Efecto de la quimioterapia intravesical sobre la incidencia de implantación de las células tumorales:

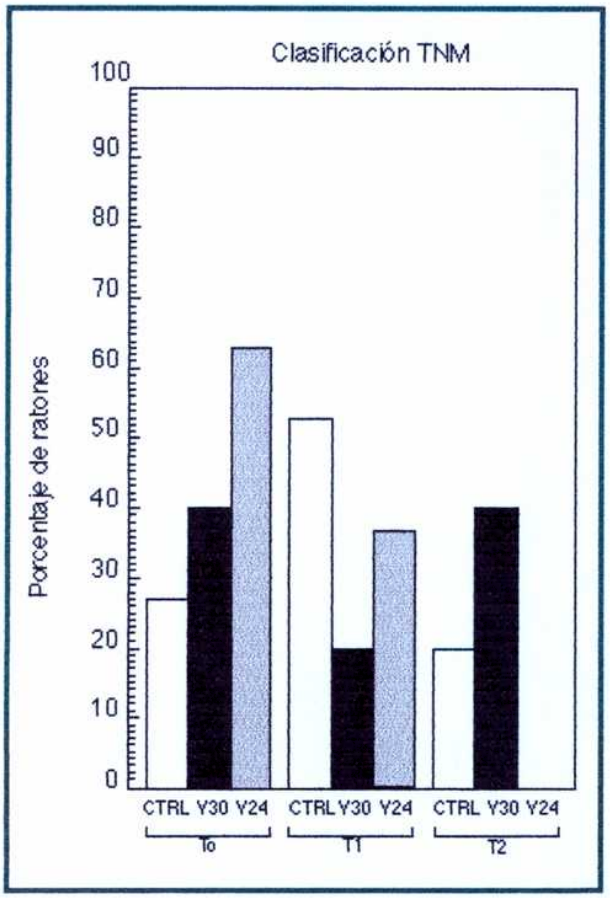
Terapia	No. de ratones	No. ratones con tumor
CONTROL	36	31 (86%)
VNR 30 min	9	6 (66%)
VNR 24 hs	33	12 (36%) ***

Test Chi-cuadrado *** **p=0,00011**

Luego de 14-18 días de inoculadas las células intravesicalmente, se observó que los ratones pertenecientes al grupo control morían. Al efectuar la necropsia se les extrajo la vejiga, y se comprobó que en algunos casos ésta había sido reemplazada por la masa tumoral. En base a esto, se sacrificaron todos los animales pertenecientes al grupo cuando se advertían los siguientes signos: dificultad para movilizarse, temblor, hematuria o abultamiento del abdomen bajo. Los grupos tratados con Vinorelbine (luego de 30 minutos y 24 hs) también fueron sacrificados, para determinar la presencia tumoral en el mismo momen - to que los controles. No se detectaron lesiones debidas a toxicidad local del alcaloide de la Vinca como ser ulceración o irritación de la mucosa vesical.

Para evaluar el grado de invasividad tumoral en los ratones de los diferentes grupos, se efectuó su clasificación con el sistema "TNM" (**T**umor primario, compromiso ganglionar o **N**odular y **M**etástasis distante) según los resultados histopatológicos. La clasificación del carcinoma depende de la profundidad invasiva del tumor en la pared vesical. Para la presencia del tumor intravesical: **To=**no hay evidencia de tumor primario, **T1=**tumor que invade tejido conectivo subepitelial (lámina propia de la mucosa) y **T2=**tumor que invade músculo superficial **(52)** **(Figura 12)**.

FIGURA 12. Efecto de la quimioterapia intravesical sobr e la Invasividad tumoral. Representación gráfica de los resultados obtenidos según la clasificación TNM. Grupo CONTROL N=15, VNR 30 min N=5, VNR 24 hs N= 19.



No se observó asociación significativa entre el grado de invasividad tumoral y el tratamiento con VNR (p=0,0978 Test Exacto de Fisher) en las vejigas estudiadas.

En la **FIGURA 12** se muestran los resultados de la clasificación de los tumores analizados por histopatología. Cuando el informe patológico no especificó si el tumor invadió el área muscular , se consideró como una invasión del tejido conectivo subepitelial (T1). En el caso en el que la profundidad de la invasión muscular no es especificada, se codificó como T2 **(52)**.

El grado de invasividad de los tumores vesicales hallados en los ratones tratados con VNR (en base a los resultados histopatológicos de las necropsias), no se vio afectado significativamente por el tratamiento intravesical con VNR. Sin embargo, se observa una tendencia a presentar tumores menos profundos en los animales tratados luego de 24 hs con respecto a aquellos que no recibieron la droga (**Figura 12**).

El tratamiento intravesical con VNR a las 24 hs demostró ser efectivo en la prevención de la implantación, dado que existe una disminución significativa de la incidencia tumoral en este grupo (**Tabla 3**). Sin embargo, efectuado luego de 30 minutos no presentaría mayores beneficios, ya que no es significativamente diferente al CONTROL. Recordemos que el momento en el que se inicia el tratamiento es crítico, ya que la implantación celular se produce dentro de las primeras veinticuatro horas de la resección *transuretral* (**47**) y que la electrocauterización suele producir diuresis dentro de la primera hora de realizada, por lo que la vejiga podría liberar parte del VNR.

Se observaron diferencias significativas entre los volúmenes de los tumores vesicales de los ratones tratados y no tratados intravesicalmente con VNR luego de 24 hs (**Tabla 4**). Es decir, la disminución del volumen tumoral se correlaciona con la administración intravesical del VNR a las 24 hs. Sin embargo, esta diferencia no es significativa estadísticamente entre los ratones que recibieron la droga luego de 30 minutos y aquellos que no la recibieron (**Tabla 4**).

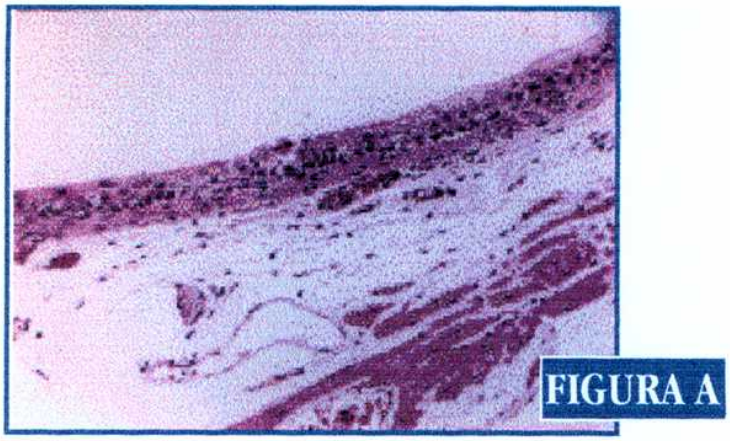
TABLA 4. Efecto de la quimioterapia intravesical sobre el crecimiento de los tumores implantados:

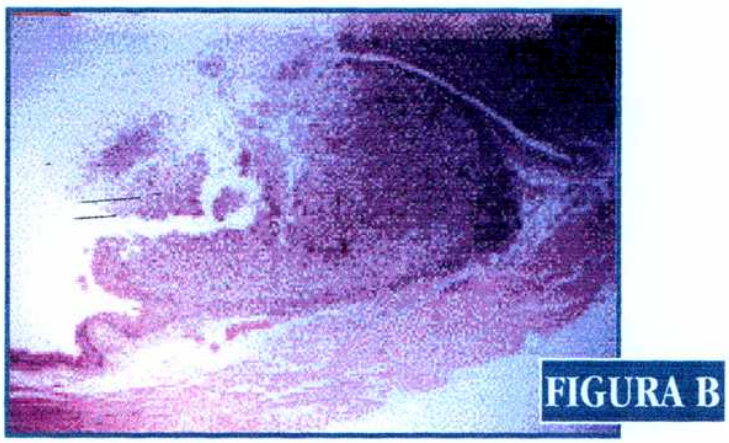
Terapia	No. de vejigas	Volumen medio tumoral (media ± ES)
CONTROL	16	98,006 ± 13,347 mm^3
VNR 30 min	3	23,387 ± 21,058 mm^3
VNR 24 hs	5	0,248 ± 0,112 mm^3

ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis: (Test para múltiples comparaciones de Dunn)
CONTROL vs VNR 30 min: n.s.
CONTROL vs VNR 24 hs: ** $p < 0,01$
VNR 30 min vs VNR 24 hs: n.s.

Según el **estudio histopatológico**, todos los tumores intravesicales de los diferentes grupos son morfológicamente idénticos y se implantan en la mucosa. En algunos casos, los tumores vesicales crecen en la submucosa por ulceración y en otros invaden el músculo. Para los grupos tratados la mucosa vesical es normal (no existe carcinoma *in situ*).

En los casos de presencia tumoral, el crecimiento del tumor es hacia el epitelio (ulceración epitelial) y el lúmen vesical (**FIGURA 13**).





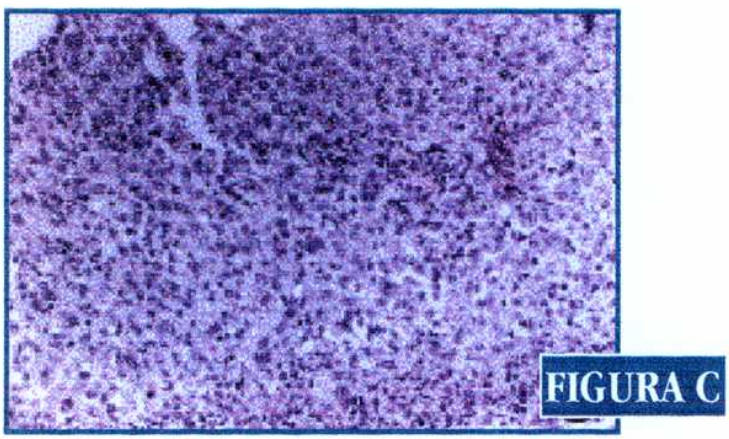


FIGURA 13 (A, B, C) Aspecto histológico de las vejigas de los ratones inoculados intravesicalmente con MB-49 dieciseis días antes. Foto A. Epitelio y estroma de la vejiga de un ratón tratado con Vinorelbine luego de 24 hs que no presenta crecimiento tumoral. Hematoxilina Eosina 40 X. **Foto B**. Vejiga de un ratón perteneciente al grupo control que presenta crecimiento tumoral que rompe el epitelio e invade el estroma. Hematoxilina Eosina 10 X. **Foto C**. Sección de la foto B a mayor aumento. Hematoxilina Eosina 100 X.

Discusión y Conclusiones

DISCUSION Y CONCLUSIONES:

Constantemente se ensayan nuevos compuestos antitumorales y sus combinaciones buscando adelantos en el tratamiento del cáncer. El empleo de un modelo adecuado para esta búsqueda es útil para proveer información sobre la acción del antineoplásico, y diagramar posibles esquemas terapéuticos. En el presente trabajo se empleó el Vinorelbine (VNR), un compuesto perteneciente al grupo de los alcaloides de la Vinca (AV), semisintético (**48**), que posee las siguientes características: amplio espectro antitumoral (**13**), baja toxicidad neurológica (**29**) y mayor índice terapéutico respecto a otros AV (**15**), entre otras.

El cáncer de vejiga ocupa el quinto lugar dentro de las neoplasias humanas en el sexo masculino, y en el 75% de los casos se presenta como carcinoma superficial. Los pacientes con la enfermedad confinada a la mucosa vesical tienen buen pronóstico, sin embargo es muy frecuente la recurrencia luego de la resección transuretral del tumor (en especial si se trata de carcinoma de células transicionales de vejiga).

La administración intravesical de agentes quimioterapéuticos presenta numerosas ventajas con respecto a la quimioterapia sistémica, por ejemplo, mayor eficacia terapéutica con menor toxicidad y el contacto directo de la droga con la lesión tumoral. Sin embar go, algunos de los compuestos que se emplean actualmente generan ulceraciones vesicales y en otros casos neoplasias, hecho que motiva la búsqueda de drogas alternativas.

Este trabajo es el primero que documenta la actividad antitumoral del Vinorelbine sobre cáncer de vejiga, específicamente sobre células transicionales murinas.

Las hipótesis planteadas fueron fundamentalmente dos, determinar si el VNR posee acción antitumoral sobre un carcinoma superficial de vejiga y si es capaz de retardar o inhibir la aparición de la enfermedad recurrente administrándose localmente como adyuvante. Es decir, si tiene propiedades que permitan utilizarlo como agente antineoplásico en la quimioterapia intravesical contra la recidiva o la progresión tumoral.

Como se indicó anteriormente, el Vinorelbine posee actividad antineoplásica sobre las células MB-49 de carcinoma transicional de vejiga murina, ejerciendo un efecto antiproliferativo. Además, experimentos piloto indican que posee similar actividad sobre células de carcinoma de vejiga humano (UM-UC-3), luego de la exposición durante 3 hs. Estos resultados no son sorprendentes, dado que la acción antiproliferativa de los AV es atribuída en gran parte a la inhibición de la MITOSIS como resultado de la despolimerización de los microtúbulos del huso mitótico. Este efecto, es ocasionado por la inhibición de la polimerización de la tubulina en microtúbulos. Sin embargo, se sabe que los AV pueden actuar sobre blancos diferentes a la tubulina o sus microtúbulos, como ser el DNA, el RNA, el metabolismo de nucleótidos o la actividad ATPasa dependiente de calmodulina, entre otros. (**22**)

El ensayo de invasión *in vitro* permite evaluar propiedades de la línea tumoral como: la unión a la matriz, respuesta quimiotáctica, secreción de metaloproteasas, y la penetración de la matriz. A bajas concentraciones, el VNR ejerce un efecto anti-invasivo sobre las células sobrevivientes luego de ser expuestas durante 24 hs, afectando principalmente la migración celular tal cual indican los ensayos de quimiotaxis. Esta propiedad sería ventajosa contra la diseminación de tumores invasivos, como se observó en estu-

dios realizados en cáncer de próstata con Estramustina, agente antineoplásico anti-MAPs (proteínas aso - ciadas a microtúbulos) (**60, 70**).

El Vinorelbine afecta la polimerización de la tubulina en microtúbulos, los que están involucrados en procesos celulares diversos como la formación del huso mitótico, la organización del citoesqueleto o la migración de las vesículas dentro de la célula. Por ello, el efecto inhibidor de la motilidad celular obser - vado con VNR en el ensayo de quimiotaxis, podría deberse a su acción sobre los microtúbulos, afectando la organización del citoesqueleto.

Por otra parte, existe una correlación directa entre la motilidad y la invasión celular , y es de esperarse que la inhibición de la primera por efecto del VNR afecte el comportamiento invasivo de MB-49.

En referencia a los resultados obtenidos en el ensayo de adhesión, sólo en el caso del colágeno tipo IV luego de 30 minutos se observaron diferencias estadísticamente significativas en el anclaje al exponer las células al VNR. Estos resultados explicarían la inhibición de la proliferación y migración celulares dado que son anclaje dependientes (**39**), pero no está claro el efecto del tiempo sobre este fenómeno.

El descubrimiento de una droga que inhiba la secreción de proteasas o su activación sería benefi - cioso desde el punto de vista terapéutico contra tumores metastásicos o invasivos, ya que el aumento de ésta actividad (específicamente de colagenasas) está correlacionado con el grado de invasividad tumoral en cáncer de vejiga (**14**).

En base a los resultados de los ensayos de invasión *in vitro*, se estudió la secreción de gelatinasas o colagenasas tipo IV, enzimas proteolíticas involucradas en este proceso. Los zimogramas presentan una leve estimulación de la secreción en los medios condicionados pertenecientes a las células expuestas al VNR. Aunque la diferencia es significativa estadísticamente, debemos considerar que estos ensayos no reflejan las condiciones fisiológicas ya que existen interacciones entre las células tumorales y del hospeda - dor o inhibidores producidos por ambos, que afectan la secreción de proteasas o su activación (**36**) y por ende la capacidad invasiva celular. En este caso no puede explicarse la inhibición de la capacidad invasi - va con VNR por una inhibición de la actividad gelatinolítica. Las condiciones de ensayo fueron tales que se eliminó el aporte de factores que pudieran afectar la actividad enzimática o su activación. Por lo tanto, en reemplazo del suero fetal bovino, se empleó medio con seroalbúmina bovina para realizar el medio condicionado. Esto último también fue llevado a cabo en los medios preparados para los ensayos de invasión y quimiotaxis.

Con respecto al modelo de implantación elegido (ratones C57BL/6J inoculados ortotópicamente con células MB-49), se alcanzaron niveles de incidencia tumoral superiores a otros sistemas, como por ejemplo los ratones C3H/He inoculados con células MBT-2. En nuestro caso, la incidencia fue del 86% en los ratones CONTROL ($5x10^4$ células MB-49 en medio de cultivo) frente al 68% (inoculan $5x10^5$ células en PBS) del mismo grupo perteneciente al trabajo realizado por Shapiro *et al.* (**53**) o el 30% (inoculan $1x10^6$ células en PBS) de Pan *et al.* (**46**), siempre efectuando la misma técnica de implantación.

En el trabajo realizado por Nativ *et al.* (**44**), utilizando el mismo modelo (ratones C57BL/6J inoculados con $5x10^6$ células MB-49), obtuvieron una incidencia tumoral del 71% en los ratones control.

En referencia a los resultados obtenidos a partir de la administración intravesical del Vinorelbine, podemos decir que son alentadores ya que sólo el 36% de los ratones tratados con VNR a las 24 hs presentaban tumor intravesical, frente a trabajos como los de Shapiro *et al.* (**53**), Pan *et al.* (**46**) o Soloway *et al.* (**56**), que informan que el 25% de los ratones tratados con BCG intravesical (**53**), el 26,9% de los inoculados con Thiotepa a las 24 hs (**46**) por la misma vía, o el 52% con Thiotepa y 30% con Epodyl (**56**), desarrollaron tumores. Por otra parte, cabe mencionar que la suspensión celular fue de mayor concentración a la empleada por otros investigadores que recurrieron a la misma metodología y modelo animal (células MB-49 en ratones C57BL/6J)(**35, 44**). Además, las diluciones celulares y de la droga fueron efectuadas en medio de cultivo, hecho que favorece las condiciones de viabilidad de las primeras, y por lo tanto dificulta la acción del antineoplásico. Es importante recordar que la reimplantación de células residuales luego de la resección transuretral, se produce en un entorno de orina y su número es inferior al que se emplea para inocular intravesicalmente en los ratones.

Las condiciones *in vitro* dan una noción de la acción que puede ejercer una droga, aunque no sea lo que realmente ocurre *in vivo*. En este trabajo, observamos efectos *in vitro* e *in vivo* del VNR sobre células transicionales de carcinoma superficial de vejiga murino que permiten considerarlo un posible agente quimioterapéutico contra este mal. La introducción de un medicamento eficaz para combatir una enfermedad como el cáncer, para el cuál existen tratamientos con efectos indeseables es ventajosa y debe ser precedida por exhaustivos estudios clínicos. Por ello se emplea esta metodología para el estudio de agentes con potencial uso quimioterapéutico.

La disminución de la incidencia tumoral ejercida por VNR *in vivo* y la reducción del volumen tumoral en los casos en los que se determinaron tumores intravesicales, son propiedades altamente beneficiosas para combatir la enfermedad recurrente.

Las experiencias efectuadas señalan una tendencia a poseer tumores menos invasivos en aquellos animales inoculados intravesicalmente con VNR luego de 24 hs de la electrocauterización, hecho de importancia para el control de la progresión del cáncer superficial de vejiga a tumor invasivo.

Los ensayos *in vivo* fueron llevados a cabo administrando una dosis de 0,2 mg de la droga en una única aplicación. Sin duda, la acción antineoplásica del Vinorelbine sobre el carcinoma superficial de vejiga murino justifica la profundización de los estudios en búsqueda de esquemas de administración intravesical y combinación con otros agentes que sean efectivos en la lucha contra esta enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Por el cariño que desde hace tantos años me brindan y la paciencia que en este último tiempo tuvieron soportándome por este trabajo, mil gracias a Mary, Die, Maxi y Jessi.

A mi amiga del alma Mara y su flia, por estar siempre junto a mí y escuchar - me siempre, aunque la distancia nos separe físicamente.

A mis amigas: "la maestra ciruela" Caro, que me ayudó con las primeras co - rrecciones y con su amistad; y a Gaby, Flavia, Liliana y Silvia, por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A las Dras María Josefina Tomio y Marta Mazzetti, por ser parte de mis co - mienzos, mis eternas consejeras y enseñarme tanto a todo nivel.

Al Dr. Daniel Bonfil, por todos los buenos momentos que pasamos en el la - boratorio y lo que me enseñó. A la Comisión Directiva de la Fundación de Investi - gación del Cáncer (FUNDIC), por haber depositado su confianza en mí en las ta - reas que realicé para la entidad.

A mis amigas y compañeras del laboratorio, "mi mamá del laboratorio" Norma y "mi compinche" Mechi , por cuidarme y quererme todos los días, además de colaborar con las tareas diarias.

A Guille, mi compañero de tantos años, y a Hernán por sus colaboraciones en los inicios de este proyecto.

A las siguientes Instituciones y personal por haber depositado su confianza en mí y colaborar de alguna u otra forma en la realización de este proyecto:
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO), a su directora la Dra. Gimeno, y en especial a Andrea, Belén, Cristina, Juan Carlos, Magui, María Ester, Maribel y Rolo por la buena onda.
Fundación RONTAG, por su apoyo con el proyecto.
A la Dra. García Palazzo, por el estudio histopatológico.

A todos aquellos a los que no nombr o pero están en mi corazón y me acompañan siempre.

A Die, el más grande de todos, por el amor que me brinda desde hace 10 años y el diseño de mi seminario.

Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. Adams, D.J., Knick, V.C. P-glycoprotein mediated multidrug resistance to 5-nor -anhydrovinblastine (Navelbine®). *Investigation in New Drugs 13 (1): 13-21 (1995).*

2. Albini, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H.K., Martin, G.R., Aaronson, S.A., Kozlowski, J.M., Mc Ewan, R.N. A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potencial of tumor cells. *Cancer Research 47: 3239-3245 (1987).*

3. Baltimore, Williams and Wilkins. *Principles and Management of Ur ologic Cancer p446-466. 2nd Edition, Javadpour N.Ed.(1983).*

4. Bhattacharyya, B., Wolff, J. Tubulin aggregation and disaggregation: mediation by two distinct Vinblastine binding sites. *Proceedings National Academy of Science USA 73: 2375-2378 (1976).*

5. Binet, S., *et al. In situ* analysis of the action of Navelbine on tubulin and associated proteins. *Seminars in Oncology 16: (2), sup 4, 5-8 (1989).*

6. Boiron, M., Niitani, H., Queisser, W. Introduction. *Seminars in Oncology 16 (2) supl.4,1. (1989).*

7. Bonfil, R.D., Momi Ki, S., Fridman, R., Reich, R., Reddel, R., Harris, C.C., Klein Szanto, A.J.P. Enhancement of the invasive ability of a transformed human bronchial epithelial cell line by 12 - O - tetradecanoyl-phorbol-13-acetate and diacylglicerol. *Carcinogenesis 10: 2335-2338 (1989).*

8. Bonfil, R.D., Reddel, R., Ura, H., Reich, R., Fridman, R., Harris, C.C., Klein Szanto, A.J.P. Invasive and metastasic potential of a v-Ha-ras transformed human bronchial epithelial cell line. *Journal of National Cancer Institute 81: 587-594 (1989).*

9. Bosl, G.S., *et al.*. Bladder cancer: advances in biology and treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology 16: 33-70 (1994).*

10. Brosman, S.A. Experience with BCG in pacients with superficial bladder cancer . *Journal of Urology 128: 27-30 (1982).*

11. Canobbio, L., *et al.* Phase II study of Navelbine® in advanced breast cancer. *Seminars in Oncology 16: (2), sup 4, 33-36 (1989).*

12. Cell Titer 96®. Non-radiactive Cell Proliferation Assay. *Technical Bulletin., # TB 169. Pr omega Corporation (1993).*

13. Cros, S., *et al.* Experimental antitumor activity of Navelbine®. *Seminars in Oncology 16: (2), sup 4, 15-20 (1989).*

14. Davies, B., Waxman, J., *et al.* Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Research 53: 5365-5369 (1993).*

15. Depierre, A., *et al.* Efficacy of Navelbine® in non-small cell lung cancer. *Seminars in Oncology 16: (2), sup 4, 26-29 (1989).*

16. Depierre, A., Chastang, C., Quoix, E., *et al.* Vinorelbine versus Vinorelbine plus Cisplatin in advanced non-small cell lung cancer: a randomized trial. *Annals of Oncology 5: 37-42 (1994).*

17. Douville, Y., Pelouze, G., Roy , R., Charrois, R., Kibrite, A., Martin, M., *et al.* Recurrent bladder papillomata treated with Bacillus-Calmette-Guerin: a preliminary report (phase I trial). *Cancer Treatment Reports 62: 551-552 (1978).*

18. Fair, W.R., Fuks, Z.Y., Scher, H.I. Cancer. *Principles and Practice of Oncology. Edited by De Vita, V.T., Hellmans, S., and Rosenberg, S.A. Philadelphia, Lippincott Company. Fourth edition. Chapter 38, 1052-1069 (1993).*

19. Fellous, A., *et al.* Biochemical effects of Navelbine® on tubulin and associated proteins. *Seminars in Oncology 16: (2), sup 4, 9 -14 (1989).*

20. Friedman, D., Mooppan, U.M.M., Rosen, Y., Kim, H. The effect of intravesical instillations of Thiotepa, Mitomycin C, and Adriamycin on normal urothelium: an experimental study in rats. *Journal of Urology 145: 1060-1063 (1991).*

21. George, M.J., *et al.* Navelbine® in advanced ovarian epithelial cancer: a study of the French Oncology Centers. *Seminars in Oncology 16: (2), sup 4, 30-32 (1989).*

22. Jordan, M.A., Thrower, D., Wilson, L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca Alkaloids. *Cancer Research 51: 2212-2222 (1991).*

23. Hart, I.R., and Fidler, I.J. An *in vitro* quantitative assay for tumor cell invasion. *Cancer Research 38: 3218-3224 (1978).*

24. Herr, H.W., Pinsky, C.M., Whitmore, W.F., Oettgen, H.F. and Melamed, M.R. Effects of intravesical BCG on carcinoma *in situ* of bladder. *Cancer (Phila.) 51: 1323-1326 (1983).*

25 Herr, H.W., Wartinger, D.D., Fair, W.R. *et al.* Bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer: a 10-year followup. *Journal of Urology 147: 1020-1023 (1992).*

26. Heussen, C. and Dowle, E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing SDS and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry 102: 196-202 (1980).*

27. Kleinman, H.K., Mc Garvey , M.L., Hassell, J.R., *et al.* Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry 25: 312-318 (1986).*

28. Knick, V.C., Eberwein, D.J., Miller, C.G. Vinorelbine tartrate and Paclitaxel combinations: enhanced activity against *in vivo* P388 murine leukemia cells. *Journal of National Cancer Institute 87: (14) 1072-1077 (1995).*

29. Krikorian, A., Rahmani, R., Bromet, M., Bore, P ., Cano, J.P. Pharmacokinetics and metabolism of Navelbine®. *Seminars in Oncology 16: (2), sup 4, 21-25 (1989).*

30. Lamm, D.L., Blumenstein, B.A., Crawford, E.D, *et al.* A randomized trial of intravesical Doxorubicin and inmunotherapy with Bacille Calmette-Guerin for transitional cell carcinoma of the bladder . *New England of Medicine 325 (17): 1205-1209 (1991).*

31. Lamm, D.L., Thor, D.E., Harris, S.C., Reyna, J.A., Stogdill, V.D. and Radwin, H.M. BCG inmunotherapy of superficial bladder cancer. *Journal of Urology 124: 38-42 (1980).*

32. Lamm, D.L., Van der Meijden, A.P.M., Morales, A., Brosman, S.A., Catalona, W.J., Herr, H.R., Soloway, M.S., Steg, A. and Debruyne, F .M.J. Incidence and treatment of complications of Bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy in superficial bladder cancer .*Journal of Ur ology 147: 596-600 (1992).*

33. Langlois, N., Guéritte, F., Langlois y et al. Applications of a modification of the Polonovsky reaction to the synthesis of Vinblastine-type alkaloid. *Journal of American Chemistry Society 98: 7017-7024 (1976).*

34. Lattime, E.C., Gomella, L.G., Mc Cue. P.A. Murine bladder carcinoma cells present antigen to BCG-specific CD4+ T-cells. *Cancer Research 52: 4286-4290 (1992).*

35. Lee, S.S., Eisenlohr, L.C., Mc Cue, P .A., Mastrangelo, M.J., and Lattime, E.C. Intravesical gene therapy: *in vivo* gene transfer using recombinant vaccinia virus vectors. *Cancer Research 54: 3325-3328 (1994).*

36. Liotta, L.A. Tumor invasion and metastases- Role of extracellular matrix: Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Research 46:1 -7 (1986).*

37. Liotta, L.A., Lee, W.C., and Morakis, D.J. New method for preparing large surfaces of intact basement membrane for tumor invasion studies. *Cancer Letters 11: 141-147 (1980).*

38. Marcel, M.M., De Bruyre, G.K., Vandesande, F., and Dragonetti, C. Immunohistochemical study of embryonic chick heart invaded by malignant cells in three-dimensional culture. *Invasion Metastasis 1: 195-204 (1981).*

39. Mc Carthy, J.B., Basara, M.L., Palm, S.L., Sas, D.F., Furcht, F.T. The role of cell adhesion proteins, laminin, and fibronectin in the movement of malignant and metastasic cells. *Cancer Metastasis Review 4: 125-132 (1985).*

40. Mignatti, P., Rifkin, D.B. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiology Review 73: 161-195 (1993).*

41. Minafra, S., Giambelluca, C., Andriolo, M., Minafra-Pucci, I. Cell-cell and cell-collagen interactions influence gelatinase production by human breast-carcinoma cell line 8701-BC. *International Journal of Cancer, 62: 777-783, (1995).*

42. Morales, A., Edinger, D., and Bruce, A.W. Intracavitary BCG in the treatment of superficial bladder tumors. *Journal of Urology 116: 180-183 (1976).*

43. Morales, A., Otten Hof, P., and Emerson, L. Treatment of residual, non-infiltrating bladder cancer with Bacillus-Calmette-Guerin. *Journal of Urology 125: 649-651 (1981).*

44. Nativ, O., Medalia, O., Engelberg, S., Raviv, G. and Aronson, M. Enhanced cytologic detection of early stage mouse bladder tumor following induction of uroepithelial cell shedding. *Journal of Urology 152: 217-219 (1994).*

45. *Organización Panamericana de la Salud (OPS) y Organización Mundial de la Salud (OMS). Registros*

Médicos de Salud. Serie PALTEX. Módulo 5 No 17. Pág 4 y 5. 1991

46. Pan, J.S., Slocum, H.K., Rustum, Y.M., Greco, W.R., Gaeta, J.F., Huben, R.P. Inhibition of implantation of murine bladder tumor by Thiotepa in cauterized bladder . *Journal of Ur ology 142: 1589-1593(1989).*

47. Pode, D., Alon, Y., Horowitz, A.T., Vlodavsky, I. and Biran, S. The mechanism of human bladder tumor implantation in an *in vitro* model. *Journal of Urology 136: 482-486, 1986).*

48. Potier, P. The synthesis of Navelbine prototype of a new series of Vinblastine derivatives. *Seminars in Oncology 16: (2), sup 4, 2-4 (1989).*

49. Ratliff, T.L., Gillen, D.P., and Catalona, W.J. Requirement of a thymus dependent immune response for BCG-mediated antitumor activity. *Journal of Urology 137: 155-158 (1987).*

50. Rothlin, R.P., Tessler, J., Zieher, L.M. *Farmacología. Vol V, Sexta parte. (1994).*

51. Rubin, E., Farber, J.L. *Patología. Capítulos 5 y 17. Editorial Médica Panamericana. (1990)* .

52. Ruddon, R.W. *Cancer Biology. Third Edition. Oxford University Press. Chapters 1 and 11 (1995).*

53. Shapiro, A., Kelley, D.R., Oakley, D.M., Catalona, W.J., Ratliff, T.L. Technical factors affecting the reproducibility of intravesical mouse bladder tumor implantation during therapy with Bacillus Calmette-Guerin. *Cancer Research 44: 3051-3054 (1994).*

54. Shemtov, M.M., Cheng, D.L., Kong, L., Shu, W., Sassaroli, M., Droller, M.J. Liv, B.C. LAK cell mediated apoptosis of human bladder cancer cells involves a pH-dependent endonuclease system in the cancer cell: possible mechanism of BCG therapy. *Journal of Urology 154: 269-274 (1995).*

55. Soloway, M.S. Editorial: Intravesical therapy for bladder cancer . *Journal of Ur ology 152: 379-381(1994).*

56. Soloway, M.S. Intravesical and systemic chemotherapy of murine bladder cancer . *Cancer Research 37: 2918-2929 (1977).*

57. Soloway, M.S. Rationale for intensive intravesical chemotherapy for superficial bladder cancer . *Journal of Urology 123: 461-466 (1981).*

58. Soloway, M.S., Facs, M.D., and Masters, S. Urothelial susceptibility to tumor cell implantation. Influence of cauterization.*Cancer 46: 1158-1163 (1980).*

59. Soloway, M.S., Murphy , W.M., De Furia, M. D., Croke, S.T ., and Finebaum, P . The effect of Mitomycin C on superficial bladder cancer. *Journal of Urology 125: 646-648 (1981).*

60. Speicher, L.A., Barone, L., Tew, K.D. Combined antimicrotubule activity of Estramustine and Taxol in Human Prostatic Carcinoma Cell Lines. *Cancer Research 52: 4433-4440 (1992).*

61. Stetler-Stevenson, W.G., Krutsch, H.C., Wacher, M.P., Margulies, I.M.K., and Liotta, L.A. The activation of human type IV collagenase proenzime: sequence identification of the major conversion product following organomercurial activation. *Journal of Biological Chemistry 264: 1353-1356 (1989).*

62. Strongin, A.Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B., Grant, G.A., Goldberg, G.I. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. *Journal of Biological Chemistry 270: 5331-5338 (1995).*

63. Strongin, A.Y., Marmer, B., Grant, G.A., Goldberg, G.I. Plasma membrane-dependent activation of 72-kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2. *Journal of Biological Chemistry 268:14033-14039 (1993).*

64. Summerhayes, I., and Franks, L.M. Effects of donor age on neoplasic transformation of adult mouse bladder epithelium *in vitro. Journal of National Cancer Institute 62: 1017-1023 (1979).*

65. Takino, T., Sato, H., Yamamoto, E., Seik, M. Cloning of human gene potentially encoding a novel matrix metalloproteinase having a C-terminal transmembrane domain. *Gene 155: 293-298 (1995).*

66. Tannock, I.F., Hill, R.P. *The Basic Science of Oncology. First Edition. Pergamon Press. 1987.*

67. Terranova, V.P., Hujanen, E.S., Loeb, D.M., Martin, G.R., Thornburg, L., Glushko, V. Use of a reconstituted basement membrane to measure cell invasiveness and select for highly invasive tumor cells. *Proceedings of National Academy of Science USA 83: 465-469 (1986).*

68. Terranova, V.P., Hujanen, E.S., Martin, G.R. Basement membrane and the invasive activity of metas - tasic tumor cells. *Journal of National Cancer Institute 77: 311-316 (1986).*

69. Turpeenniemi-Hujanen, T., Thorgeirsson, U.P., Rao, C.N., and Liotta, L.A. Laminin increases the release of type IV collagenase from malignant cells. *Journal of Biological Chemistr y 261: 1883-1889 (1986).*

70. Wang, M., Stearns, M.E. Blocking of collagenase secretion by Estramustine during *in vitro* tumor cell invasion. *Cancer Research 48: 6262-6271 (1988).*

71. Yeong-Shiau Pu, Teh-Sheng Hsieh, Tsong-Chang Tsai, Ann-Lii Cheng, Chang-Yao Hsieh, Ih-Jen Su, Ming-Kuen Lai. Tamoxifen enhances the chemosensitivity of bladder carcinoma cells. *Journal of Urology 154: 601-605 (1995).*

72. Zincke, H., Utz, D.C., Taylor, W.F., Myers, R.P. and Lery, F.J. Influence of Thiotepa and Doxorubicin instillation at time of transurethral sur gical treatment of bladder cancer on tumor recurrence. *Journal of Urology 129: 505-509 (1983).*

Dr. R. Daniel Bonfil
DIRECTOR

Dra. Lilia Lauría
COORDINADORA

Daniela M. Russo
TESISTA