



**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**MODULACIÓN DEL COMPORTAMIENTO
BIOLÓGICO DE LÍNEAS CELULARES DERIVADAS
DE ADENOCARCINOMAS MAMARIOS MURINOS
POR EL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO
PARASIMPÁTICO**

**Autor: Lic. Alejandro Javier Español
Directora: Dra. María Elena Sales
Consejera de Estudios: Prof. Dra. Lilia Lauría de Cidre**

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

Instituto de Oncología Angel H. Roffo

2004

A Ileana, por todo el amor y el apoyo incondicional que me ha brindado a lo largo de estos años. Sos la fuerza que me sostiene, gracias por estar junto a mi

AGRADECIMIENTOS

Haber podido llegar finalmente a la presentación de esta tesis, es gracias al apoyo de personas a quienes quiero agradecer:

A mi familia, por el apoyo incondicional que siempre me brindaron, por creer en mí, por ayudarme a lograr siempre mis metas, por su amor.

A mi directora, María Elena Sales, por proporcionarme un lugar agradable para trabajar en libertad, y por brindarme su confianza, sus conocimientos, su guía y sobre todo por las horas y sacrificios dedicados para que esta Tesis llegase a término.

A Ileana, por su apoyo, su comprensión y su amor a lo largo de todo este tiempo, imprescindibles para mí.

A los chicos de "este lado", Madela, Ana, Silvia, Eduardo Lali, Laura y Gabriela, por todo lo bueno que me dieron tanto en lo profesional como en lo personal y sin lo cual no podría haber realizado este trabajo.

A Elisa, Marta, Alicia, Dori, Mirta, Elena, Lidia, Lucas, Ale A. y Ale U. por su ayuda y conocimientos compartidos con nosotros. Y a todo el personal que colabora para mantener el orden y la limpieza del material de laboratorio.

A Ana y Mariana de CEFYBO, por haberme brindado su ayuda cuando la necesité, irremplazable para realizar este trabajo.

A Lilia Davel por su apoyo incondicional y su inagotable disposición para colaborar con este trabajo.

A las chicas del Bioterio, por prestarme su ayuda y sus ratones: Danka, Miriam, Vanina y el resto de la troupe.

A mi Consejera Lilia Lauría, por su ayuda, su afecto y por la fuerza que me ha dado.

A la Dra. Lustig, por ser un ejemplo a seguir tanto en lo profesional como en lo personal.

Algunos de los resultados presentados en esta Tesis han sido publicados en los siguientes trabajos:

- “Nitric oxide synthase, arginase and cyclooxygenase are involved in muscarinic receptor activation in different murine mammary adenocarcinoma cell lines”. Español A, Eiján A, Mazzoni E, Davel L, Jasnis M, Sacerdote de Lustig E and Sales M.
International Journal of Molecular Medicine. Vol 9 (6). Pp 651-657. 2002.
- “Different muscarinic receptors are involved in the proliferation of murine mammary adenocarcinoma cell lines”. Español A and Sales M.
International Journal of Molecular Medicine. Vol 13 (2). Pp 311-317. 2004.
- “Different mechanisms lead to the angiogenic process induced by three adenocarcinoma cell lines”. Davel L, Rimmaudo L, Español A, de la Torre E, Jasnis M, Ribeiro L, Gotoh T, Lustig E and Sales M.
Angiogénesis. Vol 7 (1). Pp 45-51. 2004.

Existen evidencias contradictoras acerca del efecto que ejerce el sistema nervioso autónomo parasimpático sobre la progresión tumoral. Por esto investigamos el papel que desempeña la activación de los receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) (incluidas sus vías de transducción) en líneas celulares derivadas de adenocarcinomas mamarios murinos (LM2 y LM3) en diversas etapas del crecimiento tumoral. Primeramente caracterizamos la expresión de RCM por ensayos de unión y saturación con bencilato de quinuclidinilo, un antagonista muscarínico tritiado. Observamos que las células LM3 expresan mayor número de sitios receptores que las células LM2. Las células de epitelio mamario murino normal NMuMG, no mostraron unión específica del radioligando. Ensayos de desplazamiento con diversos antagonistas muscarínicos: atropina (AT), metoctramina, 4-DAMP y pirenzepina indicaron que el subtipo M_2 predomina en las células de ambas líneas tumorales. Utilizando anticuerpos específicos contra los distintos subtipos de RCM (M_1 - M_5) en ensayos de Western blot corroboramos un orden de expresión $M_2 \geq M_4 > M_3 > M_1 > M_5$ en ambas líneas celulares. Las células NMuMG expresan escasamente los subtipos M_3 y M_2 .

El tratamiento con el agonista muscarínico carbacol (CARB) durante 15 minutos, estimula la proliferación celular en forma concentración dependiente, siendo la concentración efectiva máxima de CARB $10^{-7}M$. La preincubación con AT previno el incremento de la proliferación ejercido por CARB. El agonista no tuvo efecto sobre las células NMuMG en ninguna de las concentraciones utilizadas.

En las células LM3 el CARB promueve la proliferación, por activación del receptor M_3 , induciendo la producción de inositol 1,4,5-trifosfato vía fosfolipasa C (PLC) y óxido nítrico vía óxido nítrico sintasa tipo 1 (NOS1).

La proliferación inducida por CARB en las células LM2 necesita la activación de los receptores M_2 que promueven la liberación de prostaglandina E_2 (PGE_2) vía ciclooxigenasa 1 y 2 (COX-1 y COX-2). Además la activación del subtipo M_1 estimula la actividad de arginasa.

La neoangiogénesis es esencial para el crecimiento tumoral, observamos que ambas líneas tumorales presentan un efecto proangiogénico “per se”, el cual se incrementa por el agregado de CARB. En las células LM3 la activación de los subtipos M_1 , M_2 y M_3 induce la participación de las enzimas PLC y NOS; mientras que en las células LM2 la activación de los subtipos M_1 y M_2 induce la participación de las enzimas COX y arginasa. Este incremento de la angiogénesis puede ser el resultado del incremento en los niveles del factor de crecimiento del endotelio vascular, que produce el tratamiento con CARB, en ambas líneas celulares.

También observamos que el CARB incrementó significativamente el crecimiento tumoral “in vivo”. En las células LM3 el efecto se debe a la estimulación de receptores M_3 con formación de productos de PLC y NOS1, mientras que en las células LM2 depende de la producción de PGE_2 derivada de COX-2 por activación de receptores M_1 . El tratamiento de las células tumorales con la misma concentración del agonista, que promueve la proliferación pero por tiempos prolongados (hasta 24 hs), produce necrosis y apoptosis de las células tumorales de manera análoga al taxol, droga de elección para el tratamiento del cáncer de mama.

Concluimos que la activación parasimpática puede producir efectos antagónicos en células tumorales dependiendo de la duración del estímulo. Así el tratamiento por períodos reducidos (minutos) promueve la proliferación celular, la angiogénesis y el crecimiento tumoral; mientras que el tratamiento prolongado (horas) produce un efecto citotóxico (necrosis/apoptosis) que podría ser favorable en la terapia antineoplásica.

Palabras clave:

Receptores colinérgicos muscarínicos

células tumorales mamarias

proliferación

angiogénesis

**PARASYMPATHETIC MODULATION OF MURINE MAMMARY
ADENOCARCINOMA CELL LINES BIOLOGICAL ACTIVITY**

Contradictory evidences are stated about the action of parasympathetic nervous system on tumor progression. We here characterize muscarinic acetylcholine receptors (mAChR) expression and activity in relation to tumor cells proliferation, and angiogenesis and in vivo tumor growth. Saturation binding assays with tritiated quinuclidinyl benzilate ($[^3\text{H}]\text{-QNB}$) indicated that LM3 cells express higher amounts of binding sites than LM2 cells, without exhibiting differences in their affinity constants. Normal murine mammary epithelial cells, NMuMG, didn't exhibit $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ specific binding. Displacement assays using different muscarinic antagonists: atropine (AT), methoctramine, 4-DAMP y pirenzepine, indicated that M_2 receptor subtype is predominant in both cell lines. Western blot assays, performed in LM3 and LM2 membrane enriched fraction, using specific antibodies against mAChR subtypes ($M_1\text{-}M_5$) revealed the following order of protein receptor expression: $M_2 \geq M_4 > M_3 > M_1 > M_5$. NMuMG cells slightly express M_3 and M_2 receptor subtypes.

LM3 and LM2 tumor cells treatment with the muscarinic agonist carbachol (CARB) during 15 minutes, stimulates cellular proliferation in a concentration dependent manner being 10^{-7}M the maximal effective dose. The preincubation of cells with AT prevented proliferative action of CARB. NMuMG didn't respond to the agonist at any tested concentration.

In LM3 cells, CARB promotes proliferation, by activating M₃ receptors, inducing IP₃ production via phospholipase C (PLC) and nitric oxide by neuronal nitric oxide synthase (NOS1). Proliferative action of CARB in LM2 cells needs the activation of M₂ receptors that promotes prostaglandin E₂ (PGE₂) liberation by cyclooxygenase-1 and 2 (COX-1 and COX-2). We also demonstrated that arginase products are needed for CARB proliferative action via M₁ receptor subtype activation.

Neoangiogenesis is essential for tumor growth. We observed that LM3 and LM2 cells are potent angiogenic stimuli, when are inoculated into syngeneic BALB/c mice. Preincubation of tumor cells with 10⁻⁷M CARB potentated angiogenic response. In LM3 cells the activation of M₁, M₂ and M₃ receptor subtypes triggers the participation of the PLC and NOS enzymes in tumor blood vessels formation; while in LM2 cells, M₁ and M₂ receptors induce the participation of COX and arginase products. We have also described that CARB is able to stimulate vascular endothelial growth factor levels, that could be up regulating angiogenic response in both tumor cell lines.

In addition, CARB stimulated LM3 tumor growth by activating M₃ receptors and as a consequence PLC and NOS1 products formation, while the increment in LM2 tumor volume promoted by CARB is due to COX-2 derived PGE₂ liberation via M₁ receptor activation.

Prolonged treatment of tumor cells with 10⁻⁷M CARB (24 h) induces necrosis and apoptosis comparable to taxol treatment, a well known effective antineoplastic drug for breast cancer treatment.

We can conclude that mAChR activation of murine mammary tumor cells can produce opposite effects depending on the last of action. Short term treatment of tumor cells (15 minutes) promotes cellular proliferation, angiogenesis and the tumora growth; while prolonged treatment (hours) produces cytotoxic effects (necrosis/apoptosis) that could favor antineoplastic therapy.

Key words: muscarinic acetylcholine receptors-mammary tumor cells-angiogenesis

AC: adenilil ciclasa

AINE: antiinflamatorio no esteroideo

AT: atropina

BCIP: fosfato de 5,4,3-bromo, cloro, indolil toluidina

bFGF: factor de crecimiento básico de fibroblastos

CARB: carbacol

CO₂: dióxido de carbono

COX: ciclooxigenasa

DAG: diacilglicerol

4-DAMP: metabromuro de 4-difenilacetoxi-N-metil –piperidina

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EGTA: ácido etilenglicol-bis[β-aminoetil eter]-N, N, N´N´-tetraacético

GEN: genisteína

HIF-1: factor-1 inducible por hipoxia

i.d.: intradérmico

IgG: inmunoglobulina G

IL: interleuquina

INDO: indometacina

IP₃: inositol trifosfato

LNMMA: N^G-monometil-L-arginina

LPS: lipopolisacárido bacteriano

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

MEK: quinasa de MAPK (MAPKK)

MET: metocloramida

Mfs: macrófagos

NBT: nitroazul de tetrazolio

NCDC: 4-carboxifenil-N,N-difenilcarbamato

NK: células natural killer

NO: óxido nítrico

NOHA: N^o hidroxil-L-arginina

NOS: óxido nítrico sintasa

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PGE₂: prostaglandina E₂

PIGF: factor de crecimiento placentario

PIR: pirenzepina

PK: proteína quinasa

PLA₂: fosfolipasa A₂

PLC: fosfolipasa C

PMSF: fluoruro de fenil, metilsulfonilo

RAPG: receptores acoplados a proteínas G

RCM: receptores colinérgicos muscarínicos

RIA: radioinmunoensayo

s.c.: subcutáneo

SDS-PAGE: dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida

SFB: suero fetal bovino

SI: sistema inmune

SN: sistema nervioso

SNA: sistema nervioso autónomo

SNAP: sistema nervioso autónomo parasimpático

SNAS: sistema nervioso autónomo simpático

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

SNS: sistema nervioso somático

TCA: ácido tricloroacético

TGF- α : factor de crecimiento transformante- α

TIA: angiogénesis inducida por tumor

TIR: tirfostina

TK: tirosina quinasa

Tx: taxol

uPA: activador de plasminógeno tipo uroquinasa

Val: valina

VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular

	Pág.
Agradecimientos	3
Resultados publicados	5
Resumen	7
Abstract	11
Abreviaturas	15
Índice	19
Introducción	26
1.- Sistema nervioso	27
2.- Receptores colinérgicos muscarínicos	33
3.- Proliferación celular	38
3.1.- Generalidades.....	38
3.2.- Ciclo celular	38
3.3.- Células neoplásicas	40
3.4.- Oncogenes y genes supresores de tumor	42
3.5.- La progresión tumoral	44
3.5.1- Cascada metastásica	45

3.5.2.- Angiogénesis en la progresión tumoral	48
3.6.- Cáncer de mama	52
3.6.1.- Generalidades	52
4.- Drogas antineoplásicas	54
4.1.- Generalidades	54
4.2.- Tratamiento de tumores de mama con antineoplásicos	55
4.3.- Taxol	57
Hipótesis y objetivos	60
Materiales y métodos	61
1.- Reactivos	61
1.1.- Reactivos generales	61
1.2.- Drogas de acción muscarínica.....	62
1.3.- Inhibidores enzimáticos	63
1.4.- Buffers	64
1.5.- Radioactivos	64
1.6.- Anticuerpos	65
2.- Cultivos de líneas celulares	66
3.- Identificación de receptores colinérgicos muscarínicos	66
3.1.- Ensayos de unión	67
3.1.1.- Ensayos de saturación	68
3.1.2.- Ensayos de desplazamiento	

	69
4.- Inmunodetección de receptores colinérgicos muscarínicos	70
4.1.- Preparación de lisados celulares	70
4.2.- Ensayos de Western blot	71
5.- Identificación de segundos mensajeros de la señalización .muscarínica .	71
5.1.- Producción de inositol fosfato.....	72
5.2.- Actividad e inmunodetección de óxido nítrico sintasa	73
5.2.1.- Producción de (U ¹⁴ C)-citrulina	73
5.2.2.- Medición de la concentración de nitrito	73
5.2.3.- Identificación de isoformas de óxido nítrico sintasa.....	73
5.2.3.1.- Preparación de lisados celulares	73
5.2.3.2.- Ensayos de Western blot	74
5.3.- Actividad e inmunodetección de arginasas	74
5.3.1.- Producción de urea	74
5.3.2.- Identificación de isoformas de arginasa	75
5.3.2.1.- Preparación de lisados celulares	75
5.3.2.2.- Ensayos de Western blot	76
5.4.- Actividad e inmunodetección de ciclooxigenasas	76
5.4.1.- Radioinmunoensayo para prostaglandina E ₂	76
5.4.2.- Identificación de isoformas de COX	77
5.4.2.1.- Preparación de lisados celulares	77
5.4.2.2.- Ensayos de Western blot	
6.- Proliferación celular	
6.1.- Incorporación de timidina	

6.2.- Tinción con cristal violeta	78
7.- Ensayos de angiogénesis in vivo	81
7.1.- Determinación de la angiogénesis inducida por células tumorales	81
7.2.- Determinación de los niveles de VEGF	82
7.2.1.- Obtención de las muestras	83
7.2.2.- Ensayos de Western blot	83
8.- Crecimiento tumoral	84
9.- Ensayos de determinación de la apoptosis	85
9.1.- Técnica de TUNEL modificada	
9.2.- Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio	86
10.- Estadística	87
Resultados	87
1.- Expresión y función de RCM en células tumorales	
1.1.- Expresión de receptores colinérgicos muscarínicos en células mamarias murinas	90
1.2.- Inmunomarcación de receptores colinérgicos muscarínicos en líneas celulares mamarias murinas	92
1.3.- Participación de fosfolipasa C	94
1.4.- Participación de óxido nítrico sintasas	
1.4.1.- Producción de U ¹⁴ C-citrulina	
1.4.2.- Producción de nitrito	

	97
1.4.3.- Expresión de isoformas de óxido nítrico sintasa en células mamarias murinas	99
1.5.- Participación de arginasas	100
1.5.1.-Actividad de arginasas	100
1.5.2.- Expresión de isoformas de arginasa en células mamarias murinas	102
1.6.-Participación de ciclooxigenasas.....	103
1.6.1.- Producción de PGE ₂	103
1.6.2.- Expresión de isoformas de ciclooxigenasa en células mamarias murinas	107
2.- Proliferación celular	107
2.1.- Efecto del carbacol.....	
2.2.- Participación de tirosinas quinasas en la proliferación celular	110
3.- Angiogénesis inducida por células tumorales	112
3.1.- Modulación parasimpática de la respuesta angiogénica	115
3.2- Producción del factor de crecimiento del endotelio vascular en células mamarias murinas	116
4.- Modulación parasimpática del crecimiento tumoral	118
5.- Modulación parasimpática del efecto de antineoplásicos	
5.1.- Efecto del tratamiento prolongado con carbacol	
5.2.- Estimulación de la necrosis y la apoptosis por carbacol	
5.3.- Interacción de Taxol con receptores colinérgicos muscarínicos	

5.4.- Efecto citotóxico de la combinación de Taxol con carbacol122

5.5.- Apoptosis inducida por la combinación de Taxol con carbacol

123

Discusión

1.- Expresión y función de los receptores colinérgicos muscarínicos en células de

adenocarcinomas mamarios murinos

130

2.- Angiogénesis tumoral: participación de los receptores colinérgicos

muscarínicos

135

9

3.- Crecimiento tumoral mediado por la activación de los receptores colinérgicos

muscarínicos.....

143

4.- Efectos antitumorales del carbacol

147

Conclusiones

Referencias bibliográficas

1.- Sistema Nervioso

El sistema nervioso puede ser dividido en: el Sistema Nervioso Central (SNC) y el Sistema Nervioso Periférico (SNP) (Fig. 1).

El SNC incluye las estructuras nerviosas del cerebro y de la médula espinal, situadas dentro del cráneo y del conducto raquídeo respectivamente; el SNP incluye a todos los axones aferentes y eferentes del SNC y a las neuronas localizadas por fuera de esas estructuras

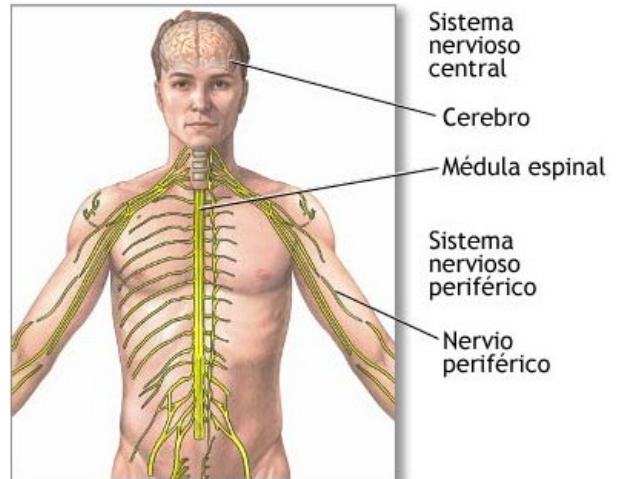


Figura 1: Sistema Nervioso.

centrales. El SNP puede, a su vez, ser dividido en el sistema nervioso somático (SNS) y el sistema nervioso autónomo (SNA). El SNS es voluntario e inerva exclusivamente al músculo esquelético, sus axones emergen del SNC y se prolongan hasta hacer sinapsis en las uniones neuromusculares. En el SNA los axones luego de abandonar el SNC hacen sinapsis en neuronas periféricas, formando los ganglios autónomos. Los axones de estas neuronas ganglionares inervan, a su vez, a las células efectoras constituyendo las uniones neuroefectoras.

El SNA consta de tres divisiones anatómicas principales:

- Sistema Nervioso Autónomo Simpático (SNAS)
- Sistema Nervioso Autónomo Parasimpático (SNAP)
- Sistema nervioso entérico, formado por los plexos nerviosos intrínsecos del tracto gastrointestinal estrechamente conectados con el SNAS y el SNAP (Appenzeller 1997).

El SNA regula importantes funciones orgánicas, esenciales para el desarrollo de la vida. Por ejemplo, modula funciones tales como: la respiración, el funcionamiento vascular y cardíaco, las secreciones de glándulas endócrinas y exócrinas, la actividad del músculo liso, el metabolismo intermedio, la temperatura corporal, etc. Las funciones del SNA por lo tanto son muy diversas, su farmacología es sumamente rica y sus aplicaciones terapéuticas son numerosas. El control autónomo se ejerce también sobre el sistema inmune (SI) y el somatosensorial, aunque la importancia fisiológica de dicho control todavía no está totalmente esclarecida.

La vía autónoma consta de dos neuronas dispuestas en serie mientras que la vía eferente somática consta de una única motoneurona que conecta el SNC con el músculo esquelético (Fig. 2).

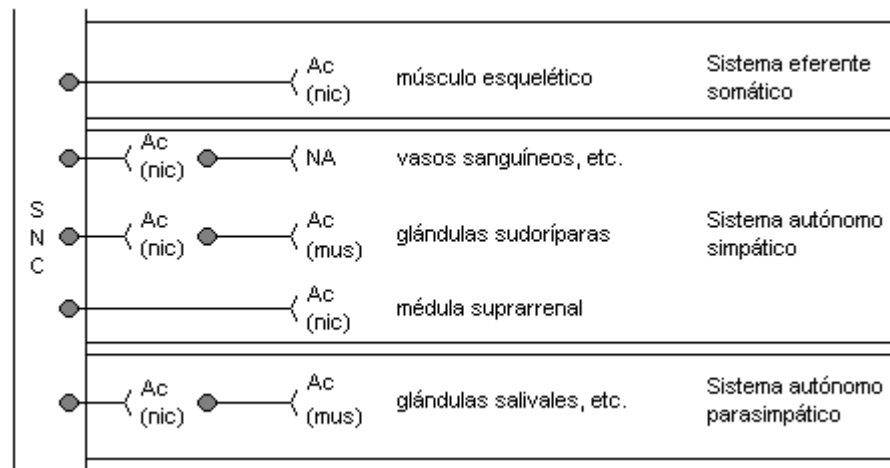


Figura 2: vías eferente y autónoma indicando el receptor principal: de acetilcolina (Ac); nicotínico (nic); muscarínico (mus); de noradrenalina (NA).

Las dos neuronas de la vía autónoma se conocen como preganglionar y postganglionar, respectivamente. En el SNAS, las sinapsis intermedias están situadas en los ganglios autónomos, que se encuentran fuera del SNC y están formados por las terminales nerviosas de las fibras preganglionares y los cuerpos celulares de las fibras postganglionares.

Las neuronas preganglionares simpáticas tienen sus cuerpos celulares en el asta lateral de la materia gris de los segmentos torácico y lumbar de la médula espinal y las fibras distales constituyen los nervios espinales conformando el haz simpático toracolumbar. Una vez que han salido de la médula espinal, las neuronas se separan del nervio espinal como filamentos que se extienden hasta la cadena paravertebral de los ganglios simpáticos, situados a cada lado de la columna vertebral. Cada nervio preganglionar se ramifica y establece contacto sináptico con células ganglionares en varios ganglios simpáticos. Estos ganglios

contienen los cuerpos celulares de las neuronas simpáticas postganglionares, cuyos axones se reagrupan en el nervio espinal. Muchas de las fibras simpáticas postganglionares llegan a la periferia por medio de ramificaciones de los nervios espinales; otras, destinadas a las vísceras abdominales y pélvicas, contienen los cuerpos celulares en un grupo de ganglios prevertebrales de la cavidad abdominal. La inervación de la médula suprarrenal, que, como respuesta a un estímulo nervioso secreta catecolaminas, es la única excepción a la disposición de dos neuronas de las vías autónomas. En realidad, las células de la médula suprarrenal son neuronas simpáticas postganglionares modificadas y los nervios que llegan a la glándula son equivalentes a las fibras preganglionares (Fig. 3).

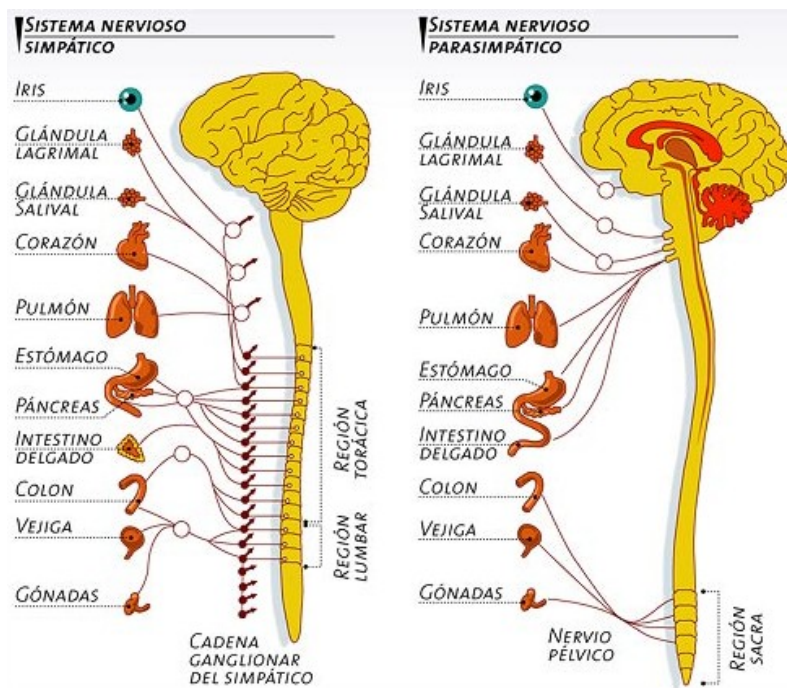


Figura 3: estructura del SNA de los mamíferos.

En las vías parasimpáticas, las células postganglionares se encuentran principalmente en los órganos blanco y los ganglios parasimpáticos, como el ciliar y el esfenopalatino, se localizan en la cabeza y el cuello.

Los nervios parasimpáticos salen de dos zonas separadas del SNC: el haz craneal y el haz sacro. El haz craneal consta de fibras preganglionares en ciertos nervios craneales como el nervio ocular, los nervios faciales, el glosofaríngeo y el vago. Los ganglios están dispersos en estrecho contacto con los órganos blanco y en comparación con las neuronas del sistema simpático, las postganglionares son muy cortas. Las fibras parasimpáticas destinadas a las vísceras pélvicas y abdominales abandonan la médula espinal como un haz sacro. Estas fibras preganglionares establecen sinapsis en un grupo de ganglios pélvicos dispersos, las fibras cortas postganglionares se extienden hasta tejidos blanco como la vejiga, el recto y los genitales. Los ganglios pélvicos transportan tanto fibras simpáticas como fibras parasimpáticas, siendo en esta zona las dos divisiones anatómicamente iguales (Fig. 3).

Los SNAS y SNAP pueden producir efectos opuestos en algunos tejidos como el músculo cardíaco y el músculo liso del intestino y de la vejiga, mientras que en otros tejidos sólo tiene actividad una de las divisiones del SNA. Por ejemplo, en las glándulas sudoríparas y en la mayoría de los vasos sanguíneos sólo hay inervación simpática, mientras que el músculo ciliar del ojo sólo tiene inervación parasimpática. El músculo liso bronquial tiene inervación parasimpática constrictora pero su tono es simpático, pues la adrenalina circulante inhibe el efecto parasimpático constrictor. Las arterias tienen inervación simpática

vasoconstrictora y la vasodilatación se ejerce mediante la liberación de óxido nítrico (NO) por las células endoteliales.

2.- Receptores colinérgicos muscarínicos

En el SNAP el neurotransmisor acetilcolina es capaz de activar por lo menos a dos tipos de receptores colinérgicos: muscarínicos (RCM) y nicotínicos. El receptor nicotínico es una proteína pentamérica, cuyo nombre se debe a su afinidad por la nicotina. Ésta se une directamente a la subunidad α del receptor y estimula la apertura de un canal de sodio formado por varias subunidades diferentes: α , β , δ , γ y ϵ .

Los RCM están ubicados en las terminales neuroefectoras postsinápticas del SNAP y tienen la capacidad de unir muscarina, un alcaloide producido por el hongo tóxico *Amanita muscaria* cuyo efecto es la estimulación de dichos receptores. Se ha demostrado que la respuesta colinérgica es variable según la naturaleza del tejido estudiado. Farmacológicamente se han descrito tres subtipos de RCM: M_1 , M_2 y M_3 . El M_1 o neuronal se une selectivamente al agonista oxotremorina y su antagonista selectivo es la pirenzepina (PIR). Estos receptores se encuentran principalmente localizados en el SNC, en las neuronas periféricas y en las células parietales gástricas. Funcionalmente median acciones excitatorias por disminución de la conductancia de K^+ que provoca la despolarización de la membrana y también estimulan la secreción de ácido gástrico. Los receptores M_2 o cardíacos abundan en el miocardio, pero también se localizan en las terminaciones presinápticas de las neuronas periféricas y centrales. Sus acciones son generalmente inhibitorias y se bloquean selectivamente con gallamina. Los

receptores M_3 , localizados en glándulas y músculo liso producen, principalmente, efectos excitatorios: estimulación de las secreciones glandulares (salival, bronquial, sudorípara, etc.) y contracción del músculo liso visceral. También median la relajación del músculo liso, principalmente vascular, como resultado de la liberación de NO de las células endoteliales vecinas. El antagonista selectivo es el metabromuro de 4-difenilacetoxi-N-metil -piperidina (4-DAMP).

La clonación genética ha demostrado que existen cinco subtipos distintos de RCM (M_1 a M_5) que pertenecen a la familia de receptores de 7 dominios transmembrana acoplados a proteína G (RAPG) (Wess 1996). Estos subtipos están constituidos por una única cadena glicoproteica cuyos 7 dominios transmembrana hidrofóbicos están conectados por 3 "loops" hidrofílicos extracelulares e intracelulares. Estos 7 dominios se ensamblan en una estructura tipo anillo para formar un bolsillo donde se une el agonista. El extremo amino terminal se encuentra en el lado extracelular de la membrana y contiene potenciales sitios de glicosilación que no son necesarios para la unión del agonista o el acoplamiento a efectores (Van Koppen 1990; Ohara 1990). El extremo carboxilo terminal está localizado en el lado citoplasmático y contiene un residuo cisteína. La secuencia de aminoácidos de los cinco subtipos de RCM está altamente conservada, con una similitud de por lo menos un 90% dentro de los 7 dominios transmembrana hidrofóbicos, aunque se han descrito diferencias en los dominios citoplasmáticos y extracelulares hidrofílicos (Bonner 1989).

Los dominios citoplasmáticos del receptor son responsables del acoplamiento a la proteína G (Wess 1993). La misma está compuesta por 3 subunidades: α , β y γ . Durante la activación de los RCM, la proteína G presenta modificaciones conformacionales que llevan al reemplazo del GDP por GTP. Este intercambio de nucleótidos de guanina disminuye la afinidad de la subunidad α por el complejo $\beta\gamma$ y el heterotrímero se disocia. La subunidad α unida a GTP y el dímero $\beta\gamma$ interactúan entonces con distintos sistemas efectores, que incluyen a adenilil (AC) y guanilil ciclasas (GC), fosfodiesterasas, fosfolipasa A₂ (PLA₂), fosfolipasa C (PLC) y fosfatidil inositol 3-quinasas, activando o inhibiendo la producción de diversos segundos mensajeros como AMPc, GMPc, diacilglicerol (DAG), 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃), ácido araquidónico y ácido fosfatídico. También es sabido que la unión del agonista promueve la apertura de los canales de Ca²⁺ que a su vez activan diversas vías enzimáticas (Fig. 4) (Marinissen 2001).

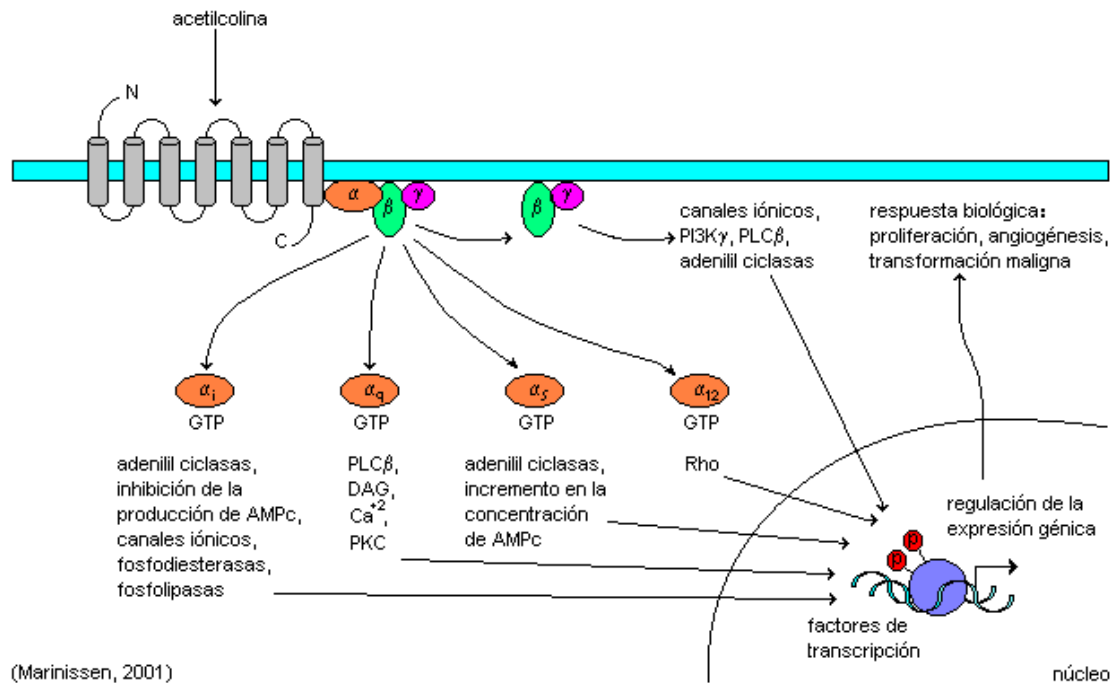


Figura 4: vías de señalización muscarínica. Abreviaturas: PLC β : fosfolipasa C β ; DAG: diacilglicerol; PKC: proteína quinasa C, PI3K: quinasa de fosfatidil inositol.

Clásicamente, los agonistas colinérgicos como la acetilcolina o el análogo estable carbacol (CARB) producen al unirse a receptores M_1 , M_3 y M_5 la activación de una proteína Gq/11 que es responsable de la estimulación de la actividad de PLC la que hidroliza fosfatidilinositol polifosfatos de la membrana celular para formar fosfatos de inositol (Matsui 2000). Uno de ellos, el IP_3 , produce la liberación del Ca^{2+} intracelular de los depósitos en el retículo endoplasmático, que media la activación de ciertas enzimas como la óxido nítrico sintasa (NOS). Se conocen 3 isoformas de NOS: NOS1 o neuronal, NOS2 o inducible y NOS3 o endotelial que producen NO a partir de arginina. El NO producido es capaz de estimular diversas hemoproteínas como la GC y la ciclooxigenasa (COX). De esta última se conocen 2 isoformas, la COX-1 o constitutiva y la COX-2 o inducible, cuyo producto, la prostaglandina E_2 (PGE_2) puede modular la actividad de NOS. La arginina, sustrato de la NOS, también puede ser metabolizada por las arginasas. De éstas se han descrito dos isoformas, una citoplasmática, arginasa I y una mitocondrial, arginasa II, que producen ornitina y urea.

La activación de PLC produce DAG que junto con el Ca^{2+} , activa a la proteína quinasa C (PKC). Esta enzima constituye un punto de “cross-talk” entre distintas vías de transducción de señales intracelulares. Modelos de expresión de RCM en células aisladas, han demostrado que la activación de los mismos puede estimular múltiples enzimas efectoras simultáneamente como: PLA_2 , PLC y PLD, así como también tirosinas quinasas (TK) y una nueva clase de canales de Ca^{2+} insensibles a la variación de voltaje (Matsui 2000).

Los agonistas muscarínicos pueden también activar a los receptores M₂ y M₄. Estos subtipos clásicamente interactúan con un grupo de proteínas Gi produciendo la inhibición de la AC, la activación de los canales K⁺ y la modulación de la actividad de los canales de Ca²⁺ en ciertos tipos celulares (Caulfield 1998; Matsui 2000).

Otros eventos celulares como la liberación de ácido araquidónico y un aumento en la actividad de GC pueden ser también el resultado de la activación de RCM (McKinney 1989). Aún cuando las vías mencionadas corresponden a los mecanismos de señalización clásica, se han descrito otras enzimas y proteínas activables por RCM como fosfodiesterasas, TK, proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), y las quinasas de MAPK también llamadas MEK (Marinissen 2001; Nathanson 2001).

3.- Proliferación celular

3.1.- Generalidades

Las células que forman un organismo normal y sano mantienen una relación compleja e interdependiente, en la que unas regulan la proliferación de otras. Alteraciones en los mecanismos de control pueden llevar a que una célula normal se convierta en tumoral (Bernabo 1999). Las células normales proliferan cuando reciben las señales adecuadas que les envían células vecinas. Esta colaboración permanente asegura entonces que cada tejido mantenga el tamaño y la arquitectura adecuados para las necesidades del organismo en cuestión. Existe un balance entre la tasa de proliferación celular y la muerte celular programada (apoptosis), estando ambos procesos altamente regulados en la mayoría de sus pasos. Un aumento del número de células puede producirse como resultado de una alteración en la transducción de señales que regulan estos dos procesos esenciales y puede ocurrir a diferentes niveles: en los receptores de factores de crecimiento, en las vías de señalización y/o en los mecanismos de expresión de genes (Rosini 2002; Devouassoux-Shisheboran 2003; Raedle 2001).

3.2.- Ciclo celular

El proceso por el cual una célula da lugar a dos células hijas se denomina ciclo celular y consta de cuatro fases: G1, S, G2 y M. La fase G1 es la etapa donde la célula prepara su maquinaria sintética para que la fase siguiente termine sin errores. Tiene una duración de 6 a 12 hs y antecede a la síntesis o replicación

del ADN. Hay células que pueden detener su progresión hacia la división en este estadio y permanecer durante días, meses o años en estado de reposo sin aumento de masa, en lo que se ha denominado fase G0. En la fase G1 existe un punto de control llamado el punto de restricción R, en el que la célula comprueba que ha generado la masa necesaria para comenzar la síntesis de ADN y que la presencia de nutrientes, sales, factores de crecimiento y temperatura son adecuados. Es el punto de control más importante y los procesos oncogénicos modifican la regulación del ciclo celular principalmente mediante la alteración de la regulación de este punto de restricción (Bonfil 1998).

La existencia de puntos de control del ciclo celular es clave para la división celular ya que permite que todo el proceso tenga lugar cuando la célula esté correctamente preparada y existan las condiciones necesarias para iniciar una nueva fase. Sirven de freno durante el ciclo, asegurando que una fase no se inicie antes de que la anterior haya finalizado y permiten el control del ciclo por señales externas. Existen muchas células diferenciadas en el organismo que sólo sintetizan las proteínas que necesitan para mantener su actividad, sin crecer ni dividirse a pesar de que las condiciones externas sean favorables. Por otra parte, si las células crecieran en tamaño o masa más rápidamente o más lentamente de lo que se dividen se harían cada vez más grandes o más pequeñas respectivamente. Todo ello indica que existe un control riguroso del metabolismo celular para adecuar crecimiento a división. Este control se pierde en los procesos oncogénicos mediante la alteración de la regulación de los puntos de restricción (Guyton 1998).

La muerte celular es una etapa importante en los organismos vivos, existiendo dos tipos de muerte celular: la necrosis y la apoptosis. La apoptosis está regulada genéticamente en respuesta a un reloj interno o a estímulos externos. La necrosis en cambio, ocurre como resultado de un daño celular y no está controlada genéticamente. En la apoptosis, la célula pierde los contactos celulares normales, y forma brotes, que luego se desprenden como cuerpos apoptóticos. Las organelas, incluyendo los lisosomas, se mantienen intactas. La cromatina se compacta y suele formar masas densas uniformes adosadas a la membrana nuclear en forma de herradura. No se genera respuesta inflamatoria, o ésta es mínima, siendo las células apoptóticas fagocitadas por macrófagos (Mfs) o células normales adyacentes. La apoptosis puede ser gatillada por diferentes tipos de estímulos tales como la ausencia de factores de crecimiento; la exposición a agentes que dañan el ADN, como las drogas antineoplásicas; la exposición a determinadas toxinas ambientales; el aumento del Ca^{2+} intracelular, etc. (Bennett 1995).

3.3.- Células neoplásicas

El rasgo distintivo de las células neoplásicas es su capacidad de proliferación, que excede largamente a la de las células normales de la misma estirpe. Esta extraordinaria velocidad de crecimiento de la masa neoplásica es consecuencia del grado de desequilibrio entre la generación de nuevas células y la pérdida de las mismas (Guyton 1998).

Las células neoplásicas presentan múltiples anomalías, que abarcan desde una división celular descontrolada, con crecimiento independiente del anclaje, hasta su enorme capacidad de proliferar aún en ausencia de factores de crecimiento. Esta independencia de factores exógenos radica en que han adquirido la capacidad de sintetizar sus propios factores, así como los receptores funcionales para ellos. También se han descrito alteraciones en las vías de señalización intracelulares. Además, las células tumorales muestran una disminución o pérdida de respuesta a factores inhibitorios de crecimiento, que puede deberse tanto a una alteración en la síntesis de los mismos o de sus receptores como a defectos en los mecanismos de señalización desencadenados.

Se ha demostrado que la célula maligna presenta una expresión diferencial de ciertas proteínas involucradas en la invasión (integrinas, colagenasas, metaloproteasas, etc). Es sabido que inhibidores específicos, anticuerpos neutralizantes, o la regulación de la expresión de estas moléculas, podrían bloquear el proceso invasivo (Puricelli 2001).

En la Tabla 1 se resumen las principales propiedades de las células transformadas.

Pérdida del control del crecimiento:	Cambios morfológicos:
---	------------------------------

Pérdida del control por densidad celular	Menor extensión sobre el sustrato
Menor dependencia de factores exógenos	Aumento de la relación núcleo/citoplasma
Independencia del anclaje	Anormalidades nucleolares
Inmortalización	Heterogeneidad
Alteraciones de membrana:	Alteraciones en la adhesividad, motilidad y deposición de matriz:
Variaciones de la composición	Disminución de la adhesión
Cambios en la fluidez	Aumento de la motilidad
Perturbaciones en el transporte	Alteraciones en la síntesis y deposición de colágeno, fibronectina y laminina
Modificación de las cargas de superficie	
Modificación en las integrinas	

Tabla 1: Principales propiedades de las células transformadas (Gómez 1998).

3.4.- Oncogenes y genes supresores de tumor

Dos tipos de genes están principalmente implicados en los mecanismos de regulación de la carcinogénesis: los oncogenes y los genes supresores. Los oncogenes estimulan la proliferación y la malignización celular, son mutaciones de genes normales (protooncogenes) que están involucrados en la regulación del crecimiento y división celular (las alteraciones que activan a estos genes actúan en forma dominante). Los genes supresores de tumor son genes que normalmente inhiben el crecimiento celular y que en el cáncer pueden estar alterados perdiendo su función (las alteraciones que inactivan a estos genes actúan en forma recesiva).

La mayoría de los oncogenes y genes supresores de tumores alteran las vías de transducción de señales simulando una estimulación mitogénica

persistente por lo que la célula se independiza de los factores de crecimiento y de otros factores extracelulares.

Sólo una pequeña fracción de las células que presentan mutaciones originan un tumor, existiendo varias razones para ello:

1.- La mayoría de las células que han sufrido una mutación tienen una capacidad de supervivencia menor que las células normales y mueren.

2.- Sólo algunas de las células mutadas que sobreviven se convierten en tumorales, porque incluso, la mayoría de estas células mutadas siguen teniendo controles de acción inhibitoria que impiden su proliferación.

3.- Las células tumorales suelen ser destruidas por el SI del hospedador antes de que conformen un tumor.

4.- Para inducir la aparición de un tumor suele ser necesario activar al mismo tiempo varios oncogenes diferentes (Haber 1997).

3.5.- La progresión tumoral

El desarrollo de un tumor es un proceso escalonado que comienza con la aparición de alteraciones en una o varias células normales, transformándose en poseedoras de un genotipo mutante, lo que inicia un programa de proliferación

indebido. La posterior transformación maligna de una célula ocurre por acumulación de mutaciones en genes específicos. Los cambios genéticos aportan ventajas selectivas para el crecimiento, invasión y establecimiento de las metástasis. Los tumores malignos consisten en múltiples poblaciones de células con diferentes patrones de expresión genética y por lo tanto, de diversidad bioquímica, inmunológica y biológica. Los distintos clones que se originan continuamente crecen hasta formar una pequeña masa tumoral de unos pocos milímetros. Para seguir creciendo necesita el desarrollo de nuevas estructuras vasculares que le aporten oxígeno y nutrientes. En este proceso, angiogénesis, intervienen factores liberados por el propio tumor y por células del hospedador, que estimulan la proliferación de células endoteliales y con ello la formación de nuevos vasos sanguíneos que irrigan al tumor en desarrollo (Folkman 1990). Este paso importante y fundamental en el crecimiento tumoral, facilita también el proceso de diseminación metastásica.

Todos los cambios genotípicos de las células tumorales durante la progresión in vivo, están asociados a la adquisición de características de crecimiento de mayor agresividad. En muchos casos, el diagnóstico de malignidad se basa en la morfología de las células neoplásicas, cuya estructura celular se vé claramente alterada: aumento del tamaño del núcleo, incremento en el cociente núcleo/citoplasma, distribución anormal de la cromatina y presencia de nucleolos prominentes.

3.5.1.- Cascada metastásica

Las células tumorales son capaces de migrar desde el tumor primario a sitios distantes y sobrevivir a una compleja serie de interacciones con los tejidos normales del hospedador, para dar origen a un foco metastásico. Todo este fenómeno se inicia cuando las células tumorales infiltran los tejidos adyacentes y luego penetran en cavidades corporales o en la circulación.

La progresión tumoral es un proceso de múltiples pasos y muy complejo que incluye la llamada cascada metastásica. Los pasos esenciales de la diseminación metastásica son semejantes en todos los tumores y se ilustran en la Fig. 5 (Fidler 1978).

Para su estudio puede dividirse en los siguientes pasos:

1. **Neovascularización:** es imprescindible la formación y llegada de nuevos vasos sanguíneos para el crecimiento del tumor primario y posterior diseminación.
2. **Invasión:** algunas células tumorales pueden regular negativamente la adhesión, aumentando su movilidad y así, al desprenderse de la lesión primaria pueden invadir estructuras adyacentes como las membranas basales. La invasión del estroma del hospedador por algunas células tumorales ocurre por acción de enzimas secretadas por las células tumorales y por las células del SI del hospedador.

3. **Intravasación y entrada a la circulación:** los capilares y vénulas de paredes finas de los neovasos, así como los canales linfáticos, ofrecen poca resistencia a la penetración de las células tumorales en circulación. Además, la liberación por parte de la célula tumoral de enzimas que degradan la matriz extracelular y la membrana basal facilitan este proceso.

4. **Embolismo:** la formación de agregados de células puede ser homotípicos (sólo constituidos por células tumorales) y heterotípicos (constituidos por células tumorales con plaquetas).

5. **Transporte:** las células metastásicas viajan por los vasos sanguíneos formando agregados heterotípicos, con fibrina, que protege a las células tumorales del medio circundante y fundamentalmente del SI. Las células metastásicas deben evadir la destrucción por los mecanismos de defensa del hospedador que incluyen respuestas inmunes específicas e inespecíficas. Se sabe que la mayor parte de las células tumorales circulantes mueren rápidamente. Esta muerte puede atribuirse a características de la célula tumoral como deformidad, agregación y expresión de moléculas de adhesión a superficies celulares. También factores del hospedador como flujo sanguíneo turbulento, células natural killer (NK), Mfs, linfocitos y plaquetas influyen en la supervivencia de émbolos tumorales originados en la circulación. Más aún, el pasaje de las células tumorales a través de los capilares puede llevar a la lisis celular ocasionada por fuerzas de rozamiento.

6. **Arresto:** las pocas células tumorales que logran sobrevivir en la circulación se arrestan en los lechos capilares de órganos distantes específicos para cada tipo de tumor (órgano blanco).

7. **Adhesión:** el arresto se produce por adhesión a células endoteliales del capilar o a membranas basales subendoteliales expuestas.

8. **Extravasación:** las células tumorales (especialmente las agregadas) pueden proliferar en el lumen de los vasos sanguíneos, pero la mayoría extravasan al parénquima del órgano blanco por mecanismos similares a los que operan durante la intravasación.

9. **Proliferación:** las células tumorales que poseen receptores de superficie adecuados pueden responder a factores de crecimiento liberados por el órgano blanco (efecto parácrino) y proliferar en el parénquima de dicho órgano.

10. **Angiogénesis:** para formar una masa mayor de 1-2 mm de diámetro, las metástasis al igual que el tumor primario, deben desarrollar una nueva red vascular. Las metástasis pueden dar a su vez, origen a metástasis adicionales (fenómeno de metástasis de metástasis) (Liotta 1991).

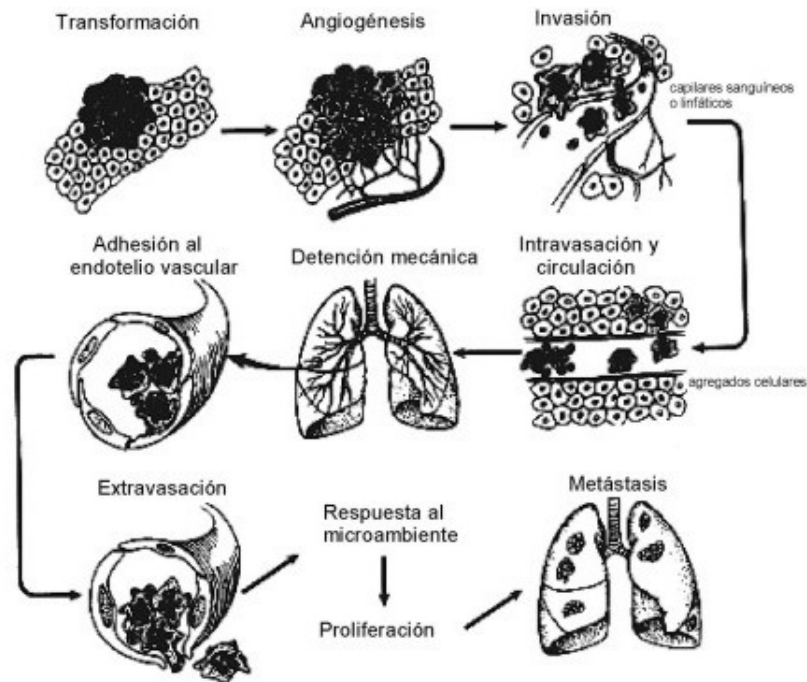


Figura 5: esquema de la cascada metastásica (Fidler 1978).

3.5.2.- Angiogénesis en la progresión tumoral

La angiogénesis tumoral involucra la ramificación direccional de nuevos vasos hacia el tumor y la metástasis en crecimiento (Fig. 6). El estímulo que induce la vascularización puede provenir directamente de las propias células neoplásicas y células infiltrantes como Mfs, linfocitos y mastocitos, que liberan factores de crecimiento, proteasas o productos de lisis de la matriz extracelular. Estos factores actúan específicamente sobre las células endoteliales de los vasos que rodean al tumor induciendo su proliferación y migración, estableciendo así una adecuada irrigación del mismo (Davel 1993).

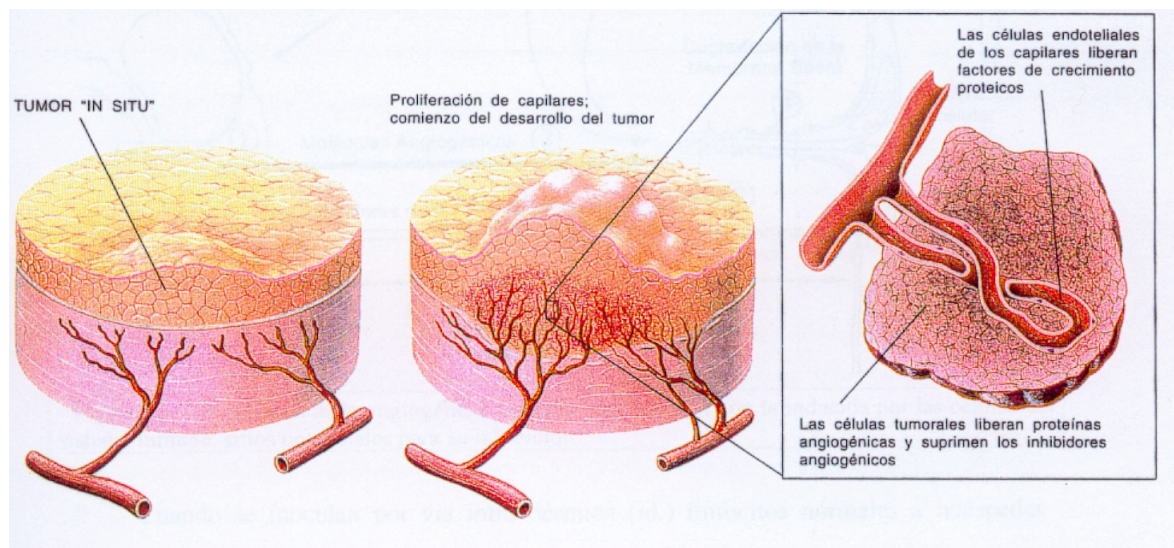
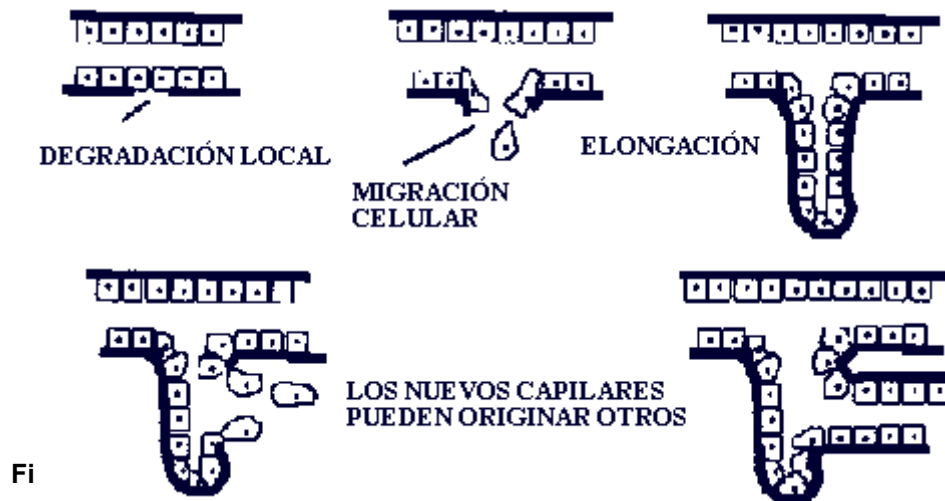


Figura 6: angiogénesis tumoral.

También las proteínas de la matriz extracelular del estroma del tumor pueden contribuir a este fenómeno al ejercer un efecto angiogénico directo o por proveer sustratos de adhesión para las células endoteliales infiltrantes. Ello determina que algunas de las células endoteliales de una vénula cercana se estimulen y comiencen a secretar el factor activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y metaloproteasas que lisan una porción de la membrana basal subendotelial que permite su extrusión, generando así la discontinuidad vascular. Otras células endoteliales migran a través de la discontinuidad vascular de la membrana basal a continuación de las primeras que actuarán como guía hacia la masa tumoral. Este proceso de migración, es acompañado por la proliferación de algunas células endoteliales por la acción de factores de crecimiento y continúa hasta que se forma un brote vascular que se ahueca y adquiere configuración tubular. Finalmente dos brotes vasculares funden sus terminaciones con lo que se

forma un circuito por el cual puede circular sangre. Pericitos derivados de células de músculo liso arterial se posicionan en la membrana basal que recubre los nuevos capilares. Esta cobertura de pericitos dará lugar a la formación del músculo liso que rodea un nuevo capilar llevándolo a su maduración. Todo este proceso se repite ramificándose hasta formar toda una red vascular alrededor de la cual crecerá el tumor o la metástasis (Fig. 7).



En general, los tumores no invasivos secretan bajos niveles de inductores de angiogénesis y altos niveles de moléculas que inhiben la neovascularización y no generan estímulo para la formación de nuevos vasos, por lo tanto, el tumor se encuentra en homeostasis con su microambiente. En cambio los tumores invasivos secretan factores inductores de la angiogénesis y así se estimula el proceso.

El proceso de neovascularización tumoral que comienza con la formación de nuevos vasos a partir de otros preexistentes, es el producto de un desbalance entre la producción de factores angiogénicos y antiangiogénicos por parte de las células normales y tumorales.

Una molécula importante en el proceso angiogénico es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) originalmente llamado factor de permeabilidad vascular (Senger 1983). Es una proteína homodimérica capaz de inducir la mitosis de células endoteliales e incrementar la permeabilidad vascular. Se han descrito por lo menos 5 isoformas distintas de 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos que son producidas por “splicing” alternativo desde un único gen que contiene 8 exones. El VEGF-A es el primer miembro de esta familia de factores integrada también por VEGF-B, C, D, E (este último de origen viral) y el factor de crecimiento placentario (PlGF) (Maglione 1991). VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅ son las isoformas más abundantes. Existen 3 subtipos de receptores para VEGF en células endoteliales: VEGF-R1, VEGF-R2 y VEGF-R3 (flt-1, ftk-1 y flt-4 en ratones, respectivamente) (Augustin 1998). El crecimiento del tumor que depende de la angiogénesis y de la expresión del gen del VEGF está regulado por distintos mecanismos. En condiciones fisiológicas, la expresión del VEGF está regulada positivamente y su mensajero está estabilizado sólo después de la hipoxia. En el tejido tumoral, en cambio, el VEGF está constitutivamente sobreexpresado independientemente de la presión de oxígeno del ambiente, aunque puede aumentar su expresión por la hipoxia. El VEGF es un blanco atractivo en la terapia antiangiogénica porque sus receptores están presentes, casi exclusivamente, en

células endoteliales y sobreexpresado en los vasos tumorales en comparación con el endotelio normal.

3.6.- Cáncer de mama

3.6.1.- Generalidades

La mama está compuesta por distintos tipos de tejidos que están circunscriptos por una membrana denominada fascia que se encuentra directamente debajo de la piel. La fascia profunda separa el tejido mamario de los músculos pectorales mayor y menor. Dentro de cada mama se distribuyen en forma radial aproximadamente 20 lóbulos que se subdividen en lobulillos, que terminan en acinos pequeños productores de leche. Los lóbulos, lobulillos y acinos se conectan con el pezón por una red compleja de conductos. Tanto el pezón como la areola tienen terminales nerviosas, vasos sanguíneos y linfáticos que drenan en los ganglios linfáticos axilares y de la cadena mamaria interna (NIH 1989). La transformación maligna de células normales de mama genera células cuyo fenotipo puede ser positivo para G (capacidad de crecer), I (invasivo) y/o M (metastásico).

Si el tipo celular transformado en la mama es glandular se trata de un adenocarcinoma (que puede ser invasivo o no invasivo) y si es epitelial se trata de un carcinoma. Los sarcomas son menos frecuentes y provienen del tejido conectivo. Histopatológicamente los tumores de mama pueden clasificarse según el tipo celular que los compone (tubular, medular, mucinoso, papilar, etc.) aún cuando la mayoría contiene más de un tipo celular simultáneamente (Pradier 2000).

El carcinoma mamario es uno de los tumores con mayor frecuencia de aparición en la mujer. Presenta una tasa de mortalidad del 20,4% (período 1997/2001 en Argentina), ocupando el primer lugar en las causas de defunción por cáncer en la mujer adulta en nuestro país (Matos 2003).

Los tumores de mama humanos metastatizan en pulmón, ganglios linfáticos, hígado, hueso o cerebro. Estas metástasis son responsables de la mayor parte de las muertes y pueden aparecer muchos años después del tratamiento del tumor primario. Se conoce poco acerca del comportamiento del tumor entre el momento del tratamiento del tumor primario y la aparición de las metástasis. La diseminación tumoral puede producirse por vía: a) hematológica; b) linfática y c) local (invasión). Algunas observaciones clínicas muestran que los carcinomas se diseminan fundamentalmente por vía linfática hacia los ganglios drenantes siendo el ganglio centinela el primero en recibir el drenaje del tumor. Los tumores mesenquimales de tejido conectivo, se diseminan por vía hematológica. Hay que considerar que los sistemas linfáticos y vasculares poseen numerosas conexiones que permiten que la diseminación de las células tumorales pase rápidamente de un sistema a otro (Schirrmacher 1985).

4.- Drogas antineoplásicas

4.1.- Generalidades

En general los drogas antineoplásicas actúan en fases específicas del ciclo celular y en consecuencia tienen actividad sólo contra células que están en división, actuando en procesos como la síntesis de ADN y la transcripción.

Una gran variedad de compuestos han sido investigados en animales de experimentación y unos pocos han probado ser eficaces para el tratamiento de neoplasias humanas.

Los tumores pueden no responder a los agentes quimioterápicos *de novo* o pueden volverse resistentes al tratamiento después de una respuesta inicial. Distintos cambios bioquímicos caracterizan a las poblaciones de células tumorales resistentes a un fármaco: alteraciones en el transporte de la droga, incremento en la concentración de la enzima blanco, cambios en su afinidad por un inhibidor, aumento en la capacidad de inactivar la droga, etc. (Goodman 1998).

4.2.- Tratamiento de tumores de mama con antineoplásicos

El ácido fólico es el principal intermediario en la síntesis de purinas, que son algunas de las bases nitrogenadas necesarias para la síntesis de los ácidos nucleicos. Las células tumorales son altamente proliferativas, requiriendo ácidos nucleicos para la síntesis de ADN. Allegra y col. (1987) utilizaron antifolatos, inhibidores de la síntesis de purinas, como citotóxicos en neoplasias humanas, lo que sugirió la utilidad del metotrexato, derivado del ácido fólico, como primer

quimioterápico en el tratamiento del cáncer de mama. Actualmente existen otros agentes antineoplásicos: la ciclofosfamida, la ifosfamida y el melfalán, tres mostazas nitrogenadas; la tiotepa, agente alquilante, y los agentes naturales, tenipósido, doxorubicina, vinblastina y taxol (Tx), que pueden utilizarse en el tratamiento de carcinomas mamarios (Fig. 8) (Goodman 1998).

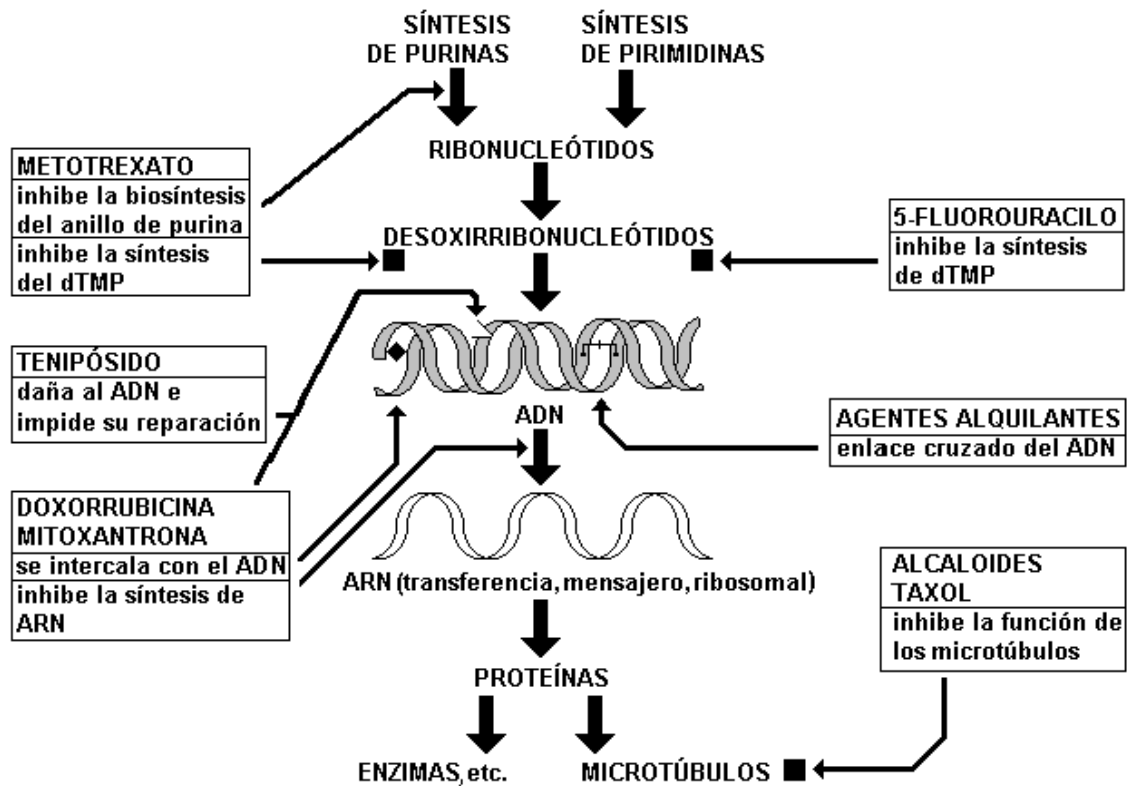


Figura 8: mecanismos y sitios de acción de los principales agentes quimioterápicos útiles en neoplasias

4.3.- Taxol

El Tx es uno de los tantos citostáticos que interfieren en el desarrollo normal del ciclo celular. Es un alcaloide extraído de la corteza de un árbol llamado *Taxus brevifolia*, que interactúa con el sistema de microtúbulos, favoreciendo su agregación, polimerizándolos en forma irreversible, con lo cual se bloquea el ciclo celular en la fase G₂/M (Schiff 1980). Por otro lado, concentraciones bajas de Tx inhiben la proliferación celular sin bloquear la mitosis (Giannakakou 2001) .

Se han descrito diversos mecanismos de acción de Tx a concentraciones que coinciden con dosis terapéuticas (μM) y a concentraciones subterapéuticas (nM) en distintos tipos celulares (Jordan 1993; Jordan 1996). El Tx no sólo inhibe el ciclo celular, sino que parece afectar la migración de las células metastásicas, disminuyendo las propiedades quimiotácticas y la síntesis de proteínas y enzimas necesarias para la invasión de otros tejidos como las colagenasas y gelatinasas. También se ha descrito que el Tx en Mfs promueve mecanismos citotóxicos dependientes de NO (Mullins 1997). En el tratamiento del cáncer de mama con Tx se obtuvieron evidencias de respuesta positiva en el 60% de los pacientes con metástasis (Cheng 2002).

Teniendo en cuenta que los receptores para neurotransmisores del SNA y particularmente los RCM podrían expresarse en células derivadas de adenocarcinomas mamarios murinos, LM2 y LM3, y al activarse regular el comportamiento biológico de dichas células nos proponemos

- a) Estudiar la expresión de RCM
- b) Investigar la funcionalidad de los RCM
- c) Evidenciar la modulación que el SNAP ejerce sobre:
 - La proliferación / apoptosis celular
 - La angiogénesis in vivo
 - El crecimiento tumoral

Objetivos específicos:

Mediante ensayos in vitro en cultivos en monocapa de las líneas antes mencionadas nos proponemos:

- Caracterizar la expresión de los distintos subtipos de RCM por ensayos de unión específica con ^3H -QNB.
- Identificar el subtipo predominante con ensayos de desplazamiento de la unión de ^3H -QNB con antagonistas muscarínicos (atropina, pirenzepina, metoctramina, 4-DAMP).
- Caracterizar la expresión de los subtipos de RCM por Western blot.
- Caracterizar la expresión de las distintas isoformas de las enzimas acopladas a los RCM (NOS, arginasas y COX) por Western blot.

- Cuantificar la producción de mediadores producidos por las enzimas efectoras de los RCM (inositol trifosfato, óxido nítrico, urea y prostaglandina E₂) por acción del agonista CARB.
- Evaluar efectos proliferativos/citotóxicos del CARB.

Mediante ensayos in vivo nos proponemos:

Investigar la participación de los RCM y de sus enzimas efectoras en:

- la angiogénesis tumoral.
- el crecimiento tumoral.

1.- Reactivos

1.1.- Reactivos generales

- Hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de sodio (NaCl), fluoruro de sodio (NaF), ácido clorhídrico (HCl), nitrato de sodio (NaNO₂) y azida sódica de Merk.
- Tritón X-100 y bicarbonato de sodio (NaHCO₃) de J.T. Baker.
- Estándares de peso molecular de Bio Rad.
- Éter etílico y ácido tricloroacético de Biopack.
- Dextrano de Pharmacia Fine Chemicals.
- L-arginina (L-arg) de Fluka.
- Solución de centelleo biodegradable de Hisafe, Wallac.
- Azul de nitrotetrazolio; 5-bromo, 4-cloro, 3-indolil fosfato-p-toluidina; ditiotreitól; tripsina; EDTA; EGTA; Tween 20; α -isonitrosopropiofenona y Azul Trypan de Sigma-Aldrich, St. Louis. USA.
- Medio de cultivo y suero fetal bovino (SFB) de GIBCO.

1.2.- Drogas de acción muscarínica

Agonistas

- Cloruro de carbamilcolina (carbacol) (CARB) de Sigma-Aldrich. St. Louis. USA.

Antagonistas

- Atropina (AT), antagonista no selectivo; pirenzepina (PIR), antagonista selectivo M₁; y metoctramina (MET), antagonista selectivo M₂, de Sigma-Aldrich. St. Louis. USA.
- Metabromuro de 4-difenilacetoxi-N-metil-piperidina (4-DAMP), antagonista selectivo M₃, de ICN Biomedicals Inc. USA.

1.3.- Inhibidores enzimáticos

- 2-nitro-4-carboxifenil-N,N-difenilcarbamato (NCDC), inhibidor de PLC; N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) bloqueante no selectivo de NOS; N^ωhidroxi-L-arginina (NOHA), bloqueante de arginasas; indometacina (INDO), inhibidor no selectivo de COX; y valina (Val), aminoácido que interfiere la vía de la arginasa; genisteína (GEN), inhibidor de tirosinas quinasas; tirfostina (TIR), inhibidor de quinasas asociadas a factores de crecimiento; PD 098,059, inhibidor de las quinasas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKK); SB 203580, inhibidor de la p38 MAPK, de Sigma-Aldrich. St. Louis. USA.
- NS-398, inhibidor selectivo de COX-2, de ICN Biomedicals Inc.
- Inhibidores de proteasas: de tripsina tipo Soybean, aprotinina, leupeptina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y benzamidina, de Sigma-Aldrich. St. Louis. USA.
- Inhibidores de fosfatasa: NaF y ortovanadato de sodio, de Sigma-Aldrich. St. Louis. USA.

1.4.- Buffers

- Buffer A: Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Tritón X-100 1%, NaF 50 mM, ortovanadato 0,1 mM, aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml, PMSF 5 mM, inhibidor de tripsina tipo Soybean 10 µg/ml; pH: 7,4.
- Buffer B: Hepes 20 mM, EGTA 0,5 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM, leupeptina 1 µM y PMSF 0,2 mM.
- Buffer C: Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, Tritón X-100 1%, PMSF 1 mM, leupeptina 1 mM; pH: 8,0.
- Buffer citrato: ácido cítrico monohidratado 0,105%, citrato de sodio dihidratado 0,147%; pH: 3,0.
- Buffer D: NaH₂PO₄ 10 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, albúmina bovina 0,01%, azida sódica 0,1%; pH 7,4.
- Buffer de bloqueo (TBST): Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 0,05%, leche descremada 5%.
- Buffer de transferencia: Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v); pH: 8,2.
- Buffer E: Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, aprotinina 2 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml, DTT 10 µg/ml, inhibidor de tripsina tipo Soybean 100 µg/ml, benzamidina 1 mg/ml; pH: 7,4.
- Buffer F: Tris-HCl 25 mM, Tritón X-100 0,1%, MnCl₂ 5 mM; pH: 7,4.

- Buffer G: Hepes 20 mM, Tritón X-100 1%, aprotinina 10 $\mu\text{g/ml}$, leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$, DTT 1 mM, PMSF 1 mM; pH: 7,4.
- Buffer H: Tris-HCl 1,514%, Brij 35 (30%) 0,625%; pH: 7,5.
- Buffer muestra: Tris-HCl 0,075 M, SDS 23%, azul de bromofenol 0,06%; pH: 6,8.
- Buffer sustrato: Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,1M, MgCl_2 5 mM; pH: 9,5.

1.5.- Radioactivos

- Bencilato de quinuclidinilo tritiado ($[^3\text{H}]\text{-QNB}$) (act. esp. 42 Ci/mmol) de NEN, Life Science Products, Boston. USA.
- U^{14}C L-arginina (U^{14}C L-Arg) (act. esp. 5 Ci/mmol) de NEN, Life Science Products, Boston. USA.
- Prostaglandina E_2 tritiada ($[^3\text{H}]\text{-PGE}_2$) (act. esp. 154 Ci/mmol) de NEN, Life Science Products, Boston. USA.
- Timidina tritiada ($[^3\text{H}]\text{-timidina}$) (act. esp. 5 Ci/mmol) de Amersham-Pharmacia. UK.

1.6.- Anticuerpos

- policlonales contra los subtipos de RCM de Santa Cruz Biotechnology. USA.
- policlonal contra IgG de cabra de Sigma-Aldrich. St. Louis. USA.
- policlonal contra IgG de conejo de Sigma-Aldrich. St. Louis. USA.

- policlonales contra NOS1, NOS2 y NOS3 de Santa Cruz Biotechnology. USA.
- policlonales contra COX-1 y COX-2 de Cayman Chemical. USA.
- policlonal contra arginasa I de Transduction Laboratorios. BD Biosciences.
- policlonal contra arginasa II cedido por los Dres. T. Gotoh y M. Mori de School of Medicine. Kumamoto University. Japón
- policlonal contra VEGF de Santa Cruz Biotechnology. St. Louis. USA.

2.- Cultivos de líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares tumorales, LM2 y LM3, derivadas de dos adenocarcinomas mamarios murinos diferentes, de aparición espontánea en nuestro Instituto (Urtreger 1997; Galli 2000) y la línea de epitelio mamario murino normal NMuMG (ATCC). Se realizaron pasajes seriados de las mismas por despegado de monocapas confluentes con PBS o con una solución de tripsina 0,25% y EDTA 0,02% en PBS libre de calcio y magnesio respectivamente, reemplazándose todos los días el medio de cultivo (MEM) con 5% de SFB. La viabilidad celular se evaluó por el test de exclusión de azul Trypan y sólo se utilizaron suspensiones con una viabilidad mayor al 90 %. La ausencia de micoplasma se determinó por el método de Hoechst.

3.- Identificación de receptores colinérgicos muscarínicos

3.1.- Ensayos de unión

Los ensayos de unión del antagonista muscarínico tritiado ($[^3\text{H}]\text{-QNB}$) se llevaron a cabo siguiendo una modificación del método previamente descrito (Sales 1997).

Para los ensayos de unión específica las células LM2, LM3 o NMuMG se sembraron en MEM con 5% de SFB en placas de 24 pozos (5×10^4 células/pozo). Cuando las células alcanzaron un 70-80% de confluencia se reemplazó el medio por MEM fresco durante 24 hs y luego se agregaron concentraciones crecientes de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ (0,05-1 nM) por duplicado. Las incubaciones se realizaron a 25 °C con agitación durante 90 minutos, en un volumen final de 200 μl .

Luego de 3 lavados con 300 μl de MEM a 4 °C, la reacción se detuvo por agregado de NaOH 0,2 M. Al contenido de cada pozo se agregaron 3 ml de solución de centelleo biodegradable. La radioactividad se cuantificó en un contador manual (Triathler Hidex) con una eficiencia (η) del 50%. Para la transformación de cuentas por minuto (cpm) en femtomoles (fmoles) se sustituyeron los valores en la siguiente ecuación:

$$\text{fmol } [^3\text{H}]\text{-QNB} = \frac{[^3\text{H}]\text{-QNB unido (cpm)} \times 10^{12} \text{ fmol/mmol}}{\eta \text{ (cpm/dpm)} \times 2,22 \times \text{dpm/Ci} \times \text{Act. Esp. (Ci/mmol)}}$$

Los resultados se expresaron en fmoles de [³H]-QNB unido por 10⁶ células (fmol/10⁶ cél.), o en número de sitios por célula (N° sitios/cél.).

La unión específica del ligando radioactivo se calculó como la diferencia entre cpm unidas totales y las que se unen en presencia de un exceso de AT (10⁻⁵M), antagonista muscarínico no radioactivo. La unión inespecífica nunca superó el 25% de la unión total a las concentraciones de ligando radioactivo empleadas.

3.1.1.- Ensayos de saturación

El objetivo de los ensayos de saturación fue determinar parámetros que caracterizan la relación entre las variables, B_{máx.} y K_d:

- B_{máx.}: máxima capacidad de unión o número máximo de sitios de unión específica/ 10⁶ células.
- K_d: constante de disociación para el complejo ligando radioactivo-receptor.

Estas variables pueden calcularse a partir del análisis de curvas de saturación mediante el método de Scatchard (Scatchard 1949) por la siguiente expresión:

$$B/F = B_{máx.} \times 1/K_d - 1/K_d \times B$$

Donde B corresponde a la concentración del ligando unido y F a la concentración del ligando libre.

Así se calculan $B_{\text{máx}}$ como la intersección con el eje de las abscisas y K_d como la inversa negativa de la pendiente.

El análisis de regresión lineal para los cálculos se realizó según Munson y Rodbard (1980).

3.1.2.- Ensayos de desplazamiento

Se realizaron ensayos de desplazamiento de la unión de [^3H]-QNB con antagonistas muscarínicos selectivos: PIR, antagonista M_1 ; MET, antagonista M_2 ; 4-DAMP antagonista M_3 y AT. Las células se cultivaron en placas como en el punto 3.1, a 25 °C durante 90 minutos con agitación en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de los antagonistas mencionados en medio MEM con 1 nM de [^3H]-QNB. Los resultados se expresaron como % de [^3H]-QNB unido con respecto a la unión del ligando radioactivo en ausencia de antagonistas (100 % de unión).

4.- Inmunodetección de receptores colinérgicos muscarínicos

4.1.- Preparación de lisados celulares

Las células LM2, LM3 y NMuMG (2×10^7) se cultivaron en placas de Petri de 100 mm de diámetro y luego de 2 lavados con PBS se lisaron en 1 ml de buffer A. Los lisados se dejaron durante 1 h a 0 °C, se sonicaron 30 segundos a 4 °C y luego se centrifugaron durante 20 minutos a 10000 rpm. Por el método de Lowry

(1971), se determinó la concentración de proteínas en los sobrenadantes y éstos se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

4.2.- Ensayos de Western blot

Las muestras obtenidas en el punto **4.1** se diluyeron 1:4 en buffer muestra y se sembraron $30\text{ }\mu\text{g}$ de proteína por calle en minigeles de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7,5%. También se sembraron estándares de peso molecular conocido. Las muestras se sometieron a una electroforesis a 180 volts en un gel concentrador (Tris-HCl 0,125 M, SDS 0,1%, acrilamida/bis acrilamida 13%, persulfato de amonio 0,1%, TEMED 0,1%; pH: 6,8), y luego en un gel separador (Tris-HCl 0,375 M, SDS 0,1%, acrilamida/bis acrilamida 25%, persulfato de amonio 0,1%, TEMED 0,1%; pH: 8,8) a 120 volts.

Luego de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas por el método semiseco a una membrana de nitrocelulosa durante 35 minutos a 24 volts en buffer de transferencia.

Para verificar la eficiencia de la transferencia las membranas de nitrocelulosa se colorearon con rojo Ponceau. Después de varios lavados en agua bidestilada, las membranas se incubaron en buffer de bloqueo (TBST) durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación. El procedimiento anterior se realizó para bloquear los sitios inespecíficos de unión antes de agregar el primer anticuerpo. Posteriormente las membranas se incubaron toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con anticuerpos específicos policlonales dirigidos contra los 5 subtipos de RCM (anti M_1 - M_4 obtenidos en cabra y anti M_5 obtenido en conejo) diluidos 1:500 en TBST. Luego

de 4 lavados de 10 minutos en TBST, las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo (IgG murina anti cabra o anti conejo según corresponda) conjugado con fosfatasa alcalina (diluido 1:4000 en TBST) durante 1 h a 37 °C. A continuación se realizaron 2 lavados en TBST y uno en buffer sustrato.

Las bandas se visualizaron con una solución de NBT/BCIP. Los pesos moleculares de las bandas proteicas se identificaron por comparación de sus Rf con los de estándares de peso molecular conocidos y se cuantificaron en un densitómetro computarizado conectado con un analizador de imágenes BIO-RAD GS 700. Los resultados se expresaron en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (DO/mm²) (Español 2003).

5.- Identificación de segundos mensajeros de la señalización muscarínica

5.1.- Producción de inositol trifosfato

Las células LM2, LM3 y NMuMG se sembraron en placas de Petri de 100 mm de diámetro (10⁷ células/placa) en MEM con 10% de SFB. Cuando alcanzaron un 70-80% de confluencia se reemplazó el medio por MEM fresco. A las 24 h las células se trataron durante 15 minutos con CARB en ausencia o en presencia de NCDC (5x10⁻⁶M) (inhibidor de la enzima PLC), AT, PIR, MET o 4-DAMP (10⁻⁵M) agregados 15 minutos antes que el CARB. Los sobrenadantes se descartaron y

las células se lavaron dos veces con PBS frío y se resuspendieron en 1 ml de MEM.

Para la extracción de IP₃, a 500 µl de cada muestra se agregó igual volumen de ácido tricloroacético (15% v/v) durante 20 minutos a 0 °C para precipitar las proteínas. Luego se centrifugaron a 2000 g durante 20 minutos y los sobrenadantes se trataron 3 veces con 10 volúmenes de una solución saturada de agua y éter etílico que se neutralizó con NaHCO₃ hasta pH: 7,5. Las muestras se conservaron a – 80 °C hasta su utilización. La concentración de IP₃ se determinó por radioinmunoensayo con un equipo comercial (Amersham-Pharmacia). La radioactividad de las muestras se midió como en el punto 3.1. Los resultados se expresaron en picomoles de IP₃ producidos por miligramo de proteína (pmol IP₃/mg de prot).

5.2.- Actividad e inmunodetección de óxido nítrico sintasa

5.2.1.- Producción de (U¹⁴C)-citrulina

La actividad de NOS se midió en células LM2, LM3 y NMuMG por la producción de citrulina ya que se produce en forma equimolecular con NO. Se utilizó (U¹⁴C) L-Arg de acuerdo con el procedimiento descrito por Bredt y Snyder (1989). En una placa de 24 pozos se incubaron 5x10⁵ células por pozo, con MEM conteniendo 0,5 µCi de (U¹⁴C) L-Arg por 10 minutos a 37 °C. Luego del agregado de los inhibidores L-NMMA (10⁻⁴M), Val (5x10⁻²M) o AT (10⁻⁵M), las células se incubaron por 20 minutos en presencia o ausencia de CARB y se lisaron en 1 ml

de buffer B a 4 °C. Los sobrenadantes se centrifugaron por 10 minutos a 10000 rpm y se sembraron en columnas de resina DOWEX AG 50 W X-8. La ($U^{14}C$)-citrulina obtenida se eluyó con 4 ml de agua destilada y la radioactividad de las muestras se midió como en el punto **3.1**. Los resultados se expresaron en picomoles de citrulina por millón de células ($\text{pmol}/10^6$ cél.).

5.2.2.- Medición de la concentración de nitrito

La producción de NO se determinó como concentración de nitrito por el ensayo de Griess. Las células (10^5) se sembraron por triplicado en 500 μl de MEM con 5% de SFB. Cuando alcanzaron un 70-80% de confluencia se reemplazó el medio por MEM fresco. A las 24 h las células se trataron durante 15 minutos con CARB en ausencia y en presencia de los antagonistas muscarínicos: AT, PIR, MET y 4-DAMP, todos ellos en una concentración 10^{-5}M ; L-NMMA (10^{-4}M), INDO (10^{-6}M) y NS-398 (10^{-5}M). Después del tratamiento se descartaron los sobrenadantes y se agregó medio fresco. La concentración de nitrito se evaluó luego de 24 h por agregado de igual volumen de reactivo de Griess (1% sulfanilamina en 30% de ácido acético con 0,1% de N-(1 naftil) etilendiamina en 60% de ácido acético) a 100 μl de los sobrenadantes de cultivos (Granger 1990). Después de 15 minutos se midió la absorbancia a 550 nm con un lector de ELISA (Bio Rad). La concentración de nitritos en las muestras se extrapoló de una curva estándar de NaNO_2 diluida en medio de cultivo. Los resultados se expresaron en nanomoles de nitrito por millón de células ($\text{nmol NO}_2^-/10^6$ cél.).

5.2.3.- Identificación de isoformas de óxido nítrico sintasas

5.2.3.1.- Preparación de lisados celulares

Las células LM2, LM3 y NMuMG (5×10^6) se sembraron en placas de 100 mm de diámetro y luego de 2 lavados con PBS se lisaron en 1 ml de buffer C. Los lisados se dejaron durante 1 h a 0°C, luego se sonicaron 30 segundos a 4°C y se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm. Por el método de Lowry (1971) se determinó la concentración de proteínas en los sobrenadantes que luego se conservaron a – 80 °C hasta su utilización.

5.2.3.2.- Ensayos de Western blot

Las muestras obtenidas en el punto **5.2.3.1** se sometieron al mismo tratamiento que en el punto **4.2**, pero utilizando anticuerpos policlonales específicos dirigidos contra las isoformas de NOS (anti NOS1 y anti NOS3 obtenidos en conejo y anti NOS2 obtenido en cabra) diluidos 1:100 en TBST. Luego de 4 lavados con TBST, las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo (IgG murina anti conejo o anti cabra según corresponda) conjugado con fosfatasa alcalina, diluido 1:4000 en TBST durante 1 h a 37 °C. Las bandas se visualizaron con una solución de NBT/BCIP.

5.3.- Actividad e inmunodetección de arginasas

5.3.1.- Producción de urea

Las células LM2, LM3 y NMuMG (10^5) fueron tratadas o no con inhibidores de la actividad enzimática: Val ($5 \times 10^{-2} \text{M}$) o N^ω hidroxil-L-arginina (NOHA) (10^{-4}M), y se lisaron con 0,5 ml de buffer F. Luego de calentar a 56 °C para activar la enzima, 25 μl del lisado activado se incubaron con igual volumen de arginina (0,5 M; pH: 9,7), durante 1 h a 37 °C. La reacción se detuvo en medio ácido y se agregaron 25 μl de α-isonitrosopropiofenona al 9% en etanol. La concentración de urea se midió a 540 nm con un lector de microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems). Los resultados se expresaron en micromoles de urea por h por millón de células ($\mu\text{mol/h. } 10^6 \text{ cél}$).

5.3.2.- Identificación de isoformas de arginasa

5.3.2.1.-Preparación de lisados celulares

Las células LM2, LM3 y NMuMG (5×10^6) se sembraron en placas de 100 mm de diámetro y luego de 2 lavados con PBS se lisaron en 1 ml de buffer G. Los lisados se dejaron durante 1 h a 0 °C, luego se sonicaron por 30 segundos a 4°C y se centrifugaron durante 15 minutos a 10000 rpm. En los sobrenadantes se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (1971) y luego se conservaron a – 80 °C hasta su utilización.

5.3.2.2.- Ensayos de Western blot

Las muestras obtenidas en el punto **5.3.2.1** se sometieron al mismo tratamiento que en el punto **4.2**, pero utilizando anticuerpos policlonales específicos dirigidos contra las isoformas de arginasa: anti arginasa I obtenido en cabra y anti arginasa II obtenido en conejo. Este último cedido gentilmente por los Dres. T. Gotoh y M. Mori de School of Medicine, Kumamoto University, Japón; diluidos 1:500 en TBST. Luego de 4 lavados con TBST, las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo (IgG murina anti cabra y anti conejo respectivamente) conjugado con fosfatasa alcalina, diluidos 1:2000 y 1:4000 respectivamente en TBST durante 1 h a 37 °C. Las bandas se visualizaron de igual forma que en el punto **4.2** (Gotoh 1996).

5.4.- Actividad e inmunodetección de ciclooxigenasas

5.4.1.- Radioinmunoensayo para prostaglandina E₂

Las células LM2, LM3 y NMuMG (10^6) se incubaron por 90 minutos a 37 °C en 1 ml de MEM con o sin CARB, en ausencia o en presencia de bloqueantes muscarínicos: AT, PIR, MET, 4-DAMP todos ellos en la concentración 10^{-5} M, y los inhibidores enzimáticos L-NMMA (10^{-4} M), INDO (10^{-6} M) y Val (5×10^{-2} M). La producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) se determinó por radioinmunoensayo (RIA) (Granstrom 1978). A 100 µl de muestra o valores estándares de PGE₂ se agregaron 500 µl de antisuero anti-PGE₂ hecho en conejo y 100 µl (5 pg) de [³H]-PGE₂. Todas las diluciones se hicieron en buffer D. Luego de incubar por 1 h a 4 °C se agregaron 200 µl de una suspensión de carbón-dextrano (carbón activado 0,1%; dextrano 0,01% en buffer D) para separar la fracción unida de la libre. El

sobrenadante obtenido después de la centrifugación a 3000 rpm de cada muestra, se combinó con 1 ml de solución de centelleo. Los resultados se expresaron en picogramos de PGE₂ por millón de células (pg/10⁶ cél.).

5.4.2.- Identificación de isoformas de COX

5.4.2.1.- Preparación de lisados celulares

Las células LM2, LM3 y NMuMG (5x10⁶) se sembraron en placas de 100 mm de diámetro y luego de 2 lavados con PBS se lisaron en 1 ml de buffer E. Los lisados se dejaron durante 30 minutos a 0 °C, luego se sonicaron por 30 segundos a 4 °C y se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm. En los sobrenadantes se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (1971) y luego se conservaron a – 80 °C hasta su utilización.

5.4.2.2.- Ensayos de Western blot

Las muestras obtenidas en el punto **5.4.2.1** se sometieron al mismo tratamiento que en el punto **4.2**, pero utilizando anticuerpos policlonales específicos dirigidos contra las isoformas de COX (anti COX-1 y anti COX-2 obtenidos en conejo) diluidos 1:300 en TBST. Luego de 4 lavados con TBST, las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo (IgG murina anti conejo) conjugado con fosfatasa alcalina, diluido 1:5000 en TBST durante 1 h a 37 °C. Las bandas se visualizaron de igual forma que en el punto **4.2** (Davel 2004).

6.- Proliferación celular

6.1.- Incorporación de timidina

Las células LM2, LM3 y NMuMG se sembraron en placas de 96 pozos (10^4 células por pozo) en 200 μ l de MEM con 5% de SFB. Se trataron con CARB 10^{-7} M durante 15 minutos, en ausencia o en presencia de diferentes antagonistas muscarínicos o inhibidores de enzimas.

Luego el medio se reemplazó por medio fresco y se agregaron 10 μ l de [3 H]-timidina diluida 1:25 a cada pozo. Las células se cultivaron por 48 hs a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de dióxido de carbono (CO_2). Luego se descartaron los sobrenadantes, y las células se lavaron dos veces con PBS y se lisaron en 200 μ l de NaOH 0,2 M.

El contenido de cada pozo se agregó a 1 ml de solución de centelleo biodegradable. La radioactividad se contó con una eficiencia (η) aproximada al 50%. Los resultados se expresaron como porcentaje de estimulación o inhibición de [3 H]-timidina incorporada respecto del valor basal (células sin tratamiento).

6.2.- Tinción con cristal violeta

Las células LM2, LM3 y NMuMG (2×10^4) se incubaron 15 minutos a 37 °C en MEM con CARB y/o Tx en ausencia o en presencia de bloqueantes muscarínicos: AT, PIR, MET y 4-DAMP todos ellos en la concentración 10^{-5} M. Luego de 3 lavados las células se incubaron por 10 minutos en 50 μ l/pozo de solución de tinción (cristal violeta 0,5%, formaldehído 4%, etanol 30%, NaCl 0,17%). Se lavó nuevamente y se dejó secar por una h a 50 °C. El precipitado se resuspendió en ácido acético al 33% y se midió la absorbancia a 595 nm que fue directamente proporcional al número de células. Los resultados se expresaron en porcentaje de proliferación respecto del basal (células sin tratamiento).

7.- Ensayos de angiogénesis in vivo

7.1.- Determinación de la angiogénesis inducida por células tumorales

Las células LM2 y LM3 (2×10^6 células) se resuspendieron en 1 ml de MEM. La viabilidad celular fue mayor al 90% y se determinó con azul Trypan. Las células se trataron durante 15 minutos a 37 °C con CARB (10^{-7} M), en ausencia o en presencia de bloqueantes muscarínicos: AT, PIR, MET y 4-DAMP todos ellos en la concentración 10^{-5} M, y los inhibidores enzimáticos L-NMMA (10^{-4} M), INDO (10^{-6} M) y NS-398 (10^{-5} M). Las células fueron lavadas con medio fresco y se inyectaron (2×10^5 cél./0,1 ml) en forma intradérmica (i.d.) con azul Trypan, para visualizar el

sitio de inoculación, en ambos flancos de ratones BALB/c normales singeneicos llamados ratones receptores (Fig. 9).

Los ratones receptores de las células se sacrificaron con éter cinco días después de la inyección i.d.. La piel fue cuidadosamente separada de los tejidos adyacentes y la respuesta vascular se observó en la cara interior de la misma con la ayuda de una lupa (aumento 6,4 X).

El método utilizado para cuantificar la respuesta angiogénica se basó en la determinación de la densidad de vasos (δ) expresada como número de vasos por mm^2 de piel de ratón. Para ello se fotografió la piel en el sitio de inoculación; las diapositivas se proyectaron sobre una pantalla reticulada, donde cada cuadrado equivale a 1 mm^2 de piel y se contó el número de vasos siguiendo el criterio de Auerbach (1976).

$$\delta = \frac{\sum \text{N}^\circ \text{ de vasos en cada cuadrado}}{\text{N}^\circ \text{ total de cuadrados}}$$

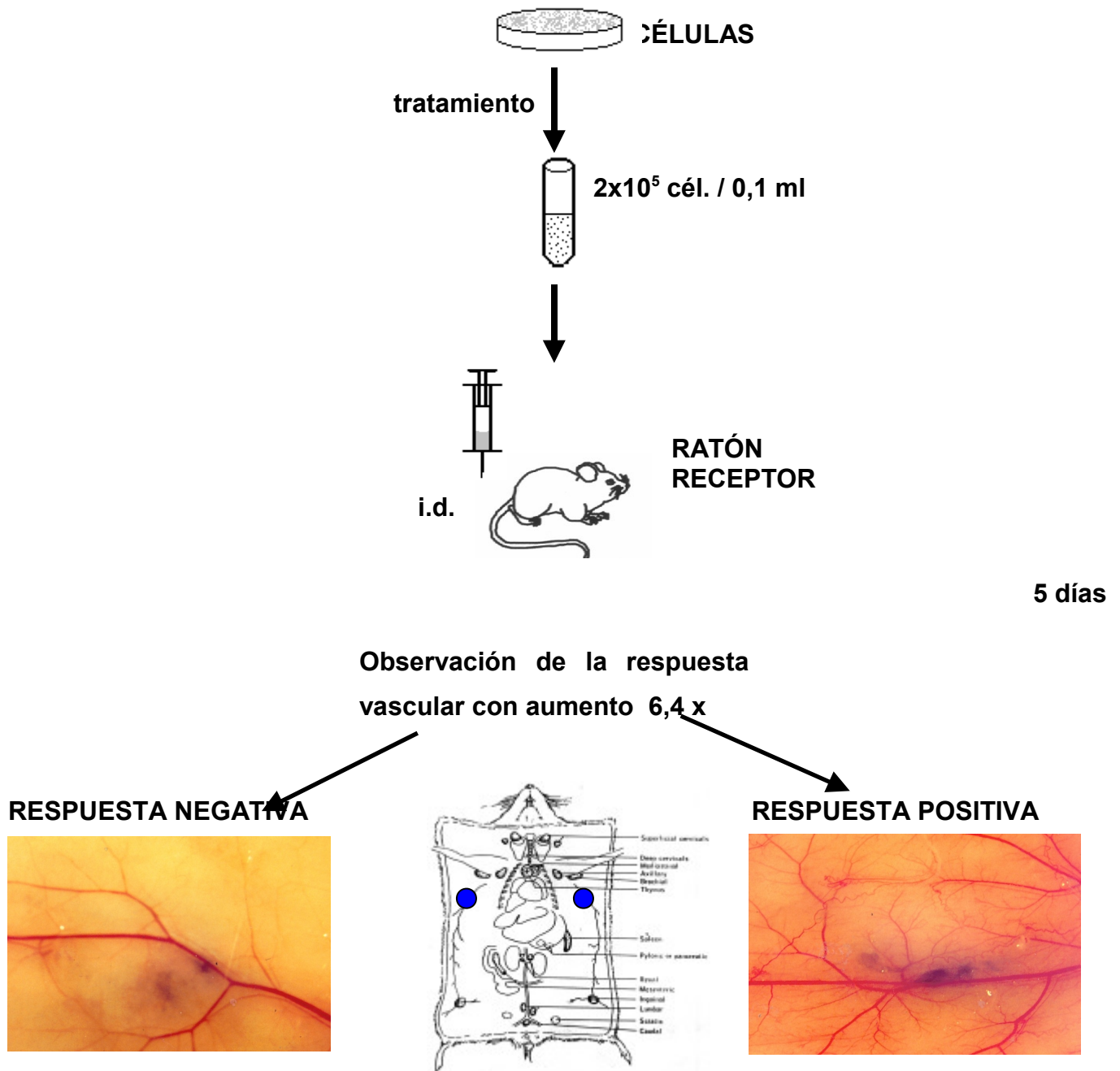


Figura 9: Esquema de ensayo de angiogénesis inducida por células tumorales (TIA).

7.2.- Determinación de los niveles de VEGF

7.2.1.- Obtención de las muestras

Las células LM2, LM3 y NMuMG (5×10^6) se sembraron en placas de 100 mm de diámetro y luego de 2 lavados con PBS se lisaron en 1 ml de buffer C. Los lisados se dejaron durante 1 h a 0 °C, se sonicaron por 30 segundos a 4 °C y se centrifugaron durante 15 minutos a 10000 rpm. En los sobrenadantes se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (1971) y se conservaron a – 80 °C hasta su utilización.

También se conservaron los sobrenadantes de cultivos celulares a fin de determinar la expresión de la forma soluble de VEGF en los mismos.

7.2.2.- Ensayos de Western blot

Las muestras obtenidas en el punto **7.2.1** se sometieron al mismo tratamiento que en el punto **4.2**, pero en presencia de un gel concentrador al 10% (Tris-HCl 0,375 M; SDS 0,1%; acrilamida/bis acrilamida 30%; persulfato de amonio 0,1%, TEMED 0,1%; pH: 8,8). Se utilizó un anticuerpo específico policlonal anti VEGF obtenido en cabra diluido 1:100 en TBST. Luego de 4 lavados con TBST, las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo (IgG murina anti cabra)

conjugado con fosfatasa alcalina, diluido 1:4000 en TBST durante 1 h a 37 °C. Las bandas se visualizaron de igual forma que en el punto 4.2. (Davel 2004).

8.- Crecimiento tumoral

Las células LM2, LM3 y NMuMG se resuspendieron en MEM (10^6 células/ml). La viabilidad de la suspensión fue mayor del 90% y se determinó con el método de exclusión de azul Trypan.

La suspensión celular se incubó por 15 minutos a 37 °C en 1 ml de MEM con o sin CARB (10^{-7} M), en ausencia o presencia de bloqueantes muscarínicos: AT, PIR, MET y 4-DAMP todos ellos en la concentración 10^{-5} M, y los inhibidores enzimáticos L-NMMA (10^{-4} M), INDO (10^{-6} M), NS-398 (10^{-5} M) y NOHA (10^{-5} M). Después de la incubación el medio se cambió por medio fresco.

Las suspensiones celulares se inyectaron en forma subcutanea (s.c.) en ratones BALB/c normales singeneicos. Cada animal recibió una inyección en el flanco izquierdo de 4×10^5 células en 0,1 ml de MEM. El crecimiento tumoral se expresó como diámetro promedio del tumor en milímetros y se calculó por medio de la fórmula siguiente que corresponde al promedio geométrico.

$$\bar{d} = \sqrt{d_1 \times d_2}$$

Donde d_1 y d_2 son los dos diámetros perpendiculares de la masa tumoral que se determinaron mediante mediciones realizadas 3 veces por semana con un calibre.

9.- Ensayos de determinación de la apoptosis

9.1. Técnica de TUNEL modificada

El rasgo fundamental bioquímico que sufre una célula en apoptosis es la fragmentación del ADN como consecuencia de la activación de endonucleasas, que lo clivan en el sitio de unión entre los nucleosomas originando fragmentos. La técnica de TUNEL se basa en la detección de estos fragmentos por el marcado con digoxigenina catalizada por la enzima TdT (Transferasa deoxinucleotidil Terminal) de los extremos OH-3' libres con los nucleótidos trifosfato modificados unidos a moléculas de digoxigenina. Estas últimas son detectadas por un anticuerpo anti-digoxigenina biotinilado conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) que cataliza la reacción de descomposición de peróxido de hidrógeno, generando moléculas de oxígeno que producen la oxidación de un sustrato cromogénico, la diaminobenzidina, originando un precipitado.

Las células LM2, LM3 y NMuMG (2×10^4) se incubaron 15 minutos a 37 °C en MEM con CARB y/o Tx a fin de determinar la presencia de células apoptóticas mediante un kit comercial (Apop Tag® Plus Peroxidase in Situ Apoptosis Detection Kit S7101 - Intergen). Las células fijadas con adhesivo a portaobjetos se lavaron 3 veces con buffer fosfato 1M y con buffer citrato a 97 °C. Se lavaron nuevamente en agua, buffer fosfato y autobuffer y se cubrieron con buffer de equilibrio por 1 minuto (Kit Intergen). Los preparados se secaron y se cubrieron con WS-TdT con agitación durante 1 h, en cámara húmeda a 37°C. Luego se sumergieron en un

buffer de lavado para detener la reacción durante 30 minutos a 37 °C, se bloquearon con albúmina bovina y se incubaron toda la noche con el anticuerpo anti digoxigenina biotinilado en cámara húmeda a 4°C.

Posteriormente se sumergieron en buffer H por 20 minutos, se secaron y se agregó el anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado para amplificar la señal, durante 45 minutos en cámara húmeda. Seguidamente se agregó StreptAB Complex/HRP por 45 minutos en cámara húmeda. Los preparados se secaron, se agregó el sustrato de HRP y se realizó una contratinción con verde de metilo. (Cuello Carrión 1999).

9.2.- Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio

Se sembraron 10^5 células LM2, LM3 y NMuMG sobre microvidrios a 37 °C en 500 μ l de MEM en presencia o ausencia de CARB y/o Tx en concentraciones crecientes. Su efecto se evaluó en ausencia y en presencia de diversos antagonistas e inhibidores enzimáticos. Luego de la incubación se retiró el medio de cultivo y se lo reemplazó por una solución de 10 μ g/ml de naranja de acridina y 10 μ g/ml de bromuro de etidio en PBS. A continuación se montaron las muestras sobre portaobjetos en una solución de glicerina:PBS (1:1). La observación se realizó en un microscopio de fluorescencia con emisión a 480 nm (filtro FICT) a 400X, discriminándose las células vivas (verdes) de las apoptóticas (amarillas). (Spector 1998).

10.- Estadística

Se utilizaron los análisis del test “t” de Student y ANOVA para determinar los niveles significación. Diferencias entre medias se consideraron significativas si $p \leq 0,05$. Los datos experimentales de los ensayos de saturación se analizaron utilizando el método de Sagripanti y col.(1984).

1.- Expresión y función de RCM en células tumorales

1.1.- Expresión de receptores colinérgicos muscarínicos en células mamarias murinas.

Considerando que el SNA puede regular múltiples funciones tanto en estados fisiológicos como patológicos y que particularmente el SNAP, por medio de los RCM, puede estar involucrado en la etiopatogenia de enfermedades infecciosas como el SIDA, o degenerativas como el Alzheimer, investigamos el papel del SNAP en el cáncer de mama. Para esto caracterizamos la expresión y función de los RCM en las líneas celulares derivadas de adenocarcinomas mamarios murinos LM2 y LM3 y en la línea de mama normal NMuMG.

En la Figura 1 se muestran los resultados de los ensayos de unión específica del antagonista muscarínico [³H]-QNB en células tumorales. La curva de saturación se muestra en el panel A y la linealización de las mismas en el panel B. Las células LM3 muestran un mayor número máximo de sitios de unión que las células LM2 ($B_{\text{máx}}$: fmol/ 10^6 cél. ó N° de sitios/cél.) (LM3: $13,10 \pm 0,30$ ó 7886 ± 180 ; LM2: $2,87 \pm 0,25$ ó 1727 ± 150 ; $n=4$; $p < 0.05$) sin presentar diferencias significativas en los valores de las constantes de disociación (K_d : nM) (LM3: $2,35 \pm 0,41$; LM2: $1,39 \pm 0,38$; $n=4$). No se observó unión específica del antagonista muscarínico tritiado a las células NMuMG.

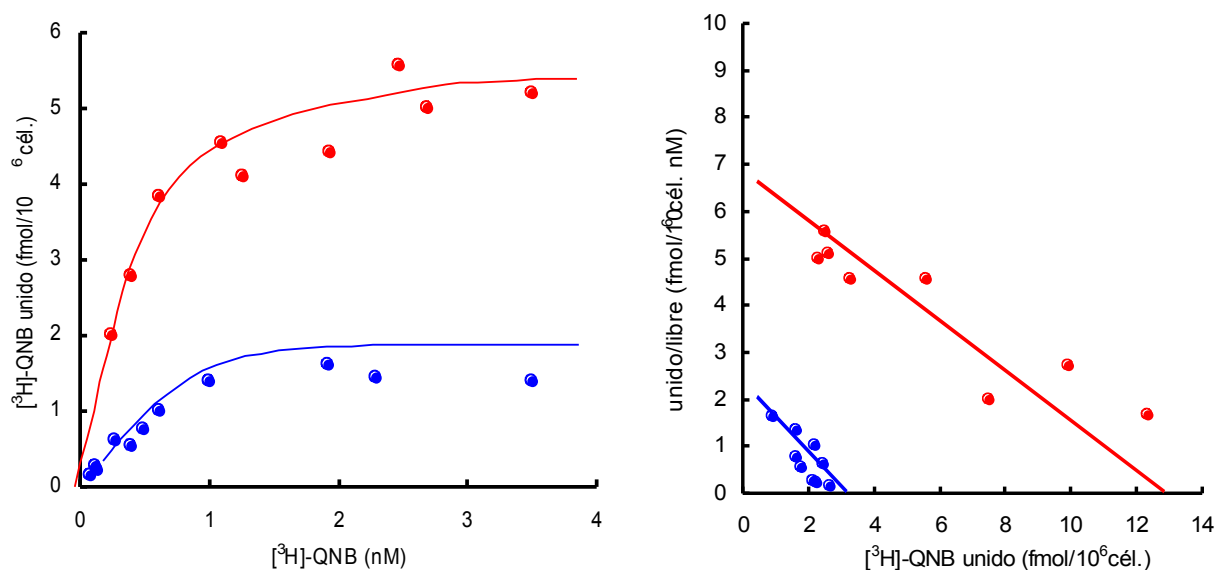


Figura 1: Curvas de saturación (A) y análisis de Scatchard (B) de ensayos de unión específica con $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ en células LM2 (●) y LM3 (●). Los datos graficados corresponden a los valores de 1 experimento representativo de 4 similares, realizados por duplicado.

También se realizaron ensayos de desplazamiento de la unión del $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ con concentraciones crecientes de AT y antagonistas muscarínicos con selectividad diferencial por los distintos subtipos de RCM, PIR, AF-DX116 y 4-DAMP, en las líneas LM2 y LM3 (Fig. 2). El orden de potencia de los antagonistas para desplazar la unión del radioligando fue $\text{AT} > \text{AF-DX116} > \text{4-DAMP} > \text{PIR}$, lo que indica una expresión mayoritaria del subtipo M_2 .

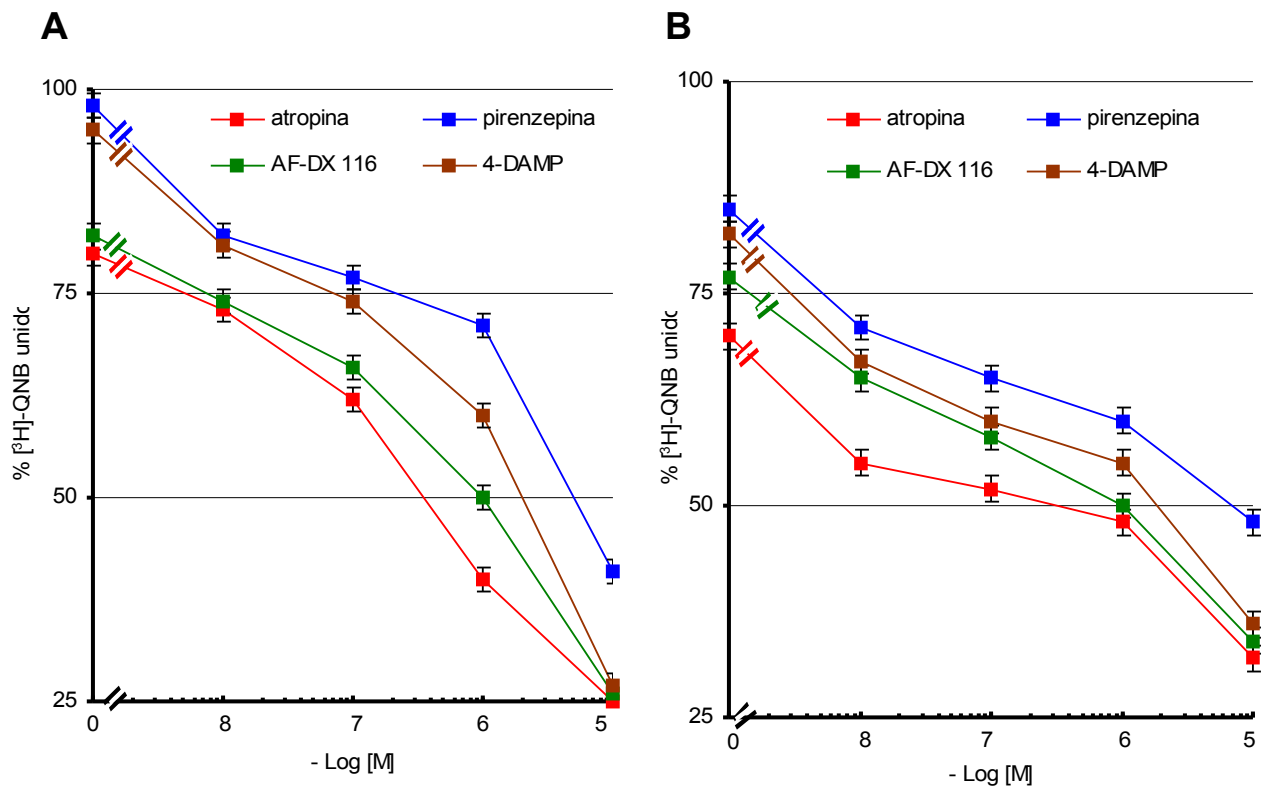


Figura 2: Ensayos de desplazamiento de la unión de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ en células LM2 (A) y LM3 (B) en presencia de concentraciones crecientes de antagonistas de los RCM. Los puntos graficados corresponden a los promedios \pm E.S de 4 experimentos.

1.2.- Inmunomarcación de receptores colinérgicos muscarínicos en líneas celulares mamarias murinas

Para corroborar los resultados obtenidos en los ensayos de unión específica con [³H]-QNB, realizamos ensayos de inmunomarcación de RCM en las células tumorales y normales. Detectamos expresión de los distintos subtipos de RCM en las células tumorales como se muestra en la Figura 3A. La cuantificación de las bandas por análisis densitométrico (DO/mm²) (Fig. 3B) indica que las células LM3 expresan mayoritariamente el subtipo 2 (M₂:0,705; M₄:0,420; M₃:0,369; M₁:0,173; M₅:0,039). Las células de la línea LM2 que también expresan mayoritariamente el subtipo 2 (M₂:0,222; M₄:0,220; M₃:0,184; M₁:0,118; M₅:0,022) tienen relativamente menores niveles proteicos de todos los subtipos en comparación con las células LM3. Las células NMuMG expresan niveles escasamente detectables de los subtipos 2 y 3 (M₂:0,031; M₃:0,054).

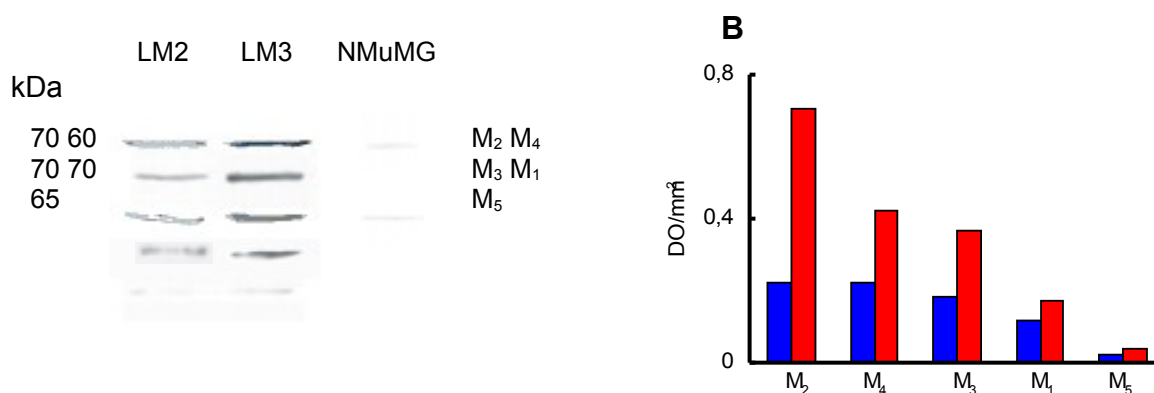


Figura 3: A: Ensayos de Western blot para caracterizar la expresión de RCM en células LM2 ■, LM3 ■ y NMuMG. B: DO/mm²: unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado. Se muestra un ensayo representativo de 4 similares.

1.3.- Participación de fosfolipasa C

Para investigar la funcionalidad de los RCM expresados en las células tumorales estudiamos la actividad de algunas de las enzimas efectoras que clásicamente se acoplan a dichos receptores. La actividad de la enzima PLC fue evaluada midiendo la producción de IP_3 (pmol/mg prot.) por RIA en presencia de concentraciones crecientes de CARB (Fig. 4A). En las células LM3 observamos que el agonista estimula en forma concentración dependiente la producción de IP_3 (basal: $0,55 \pm 0,16$; CARB $10^{-7}M$: $1,39 \pm 0,12$; $n=5$).

El efecto del agonista fue revertido por el pretratamiento de las células con NCDC ($10^{-5}M$) ($0,52 \pm 0,17$; $n=5$), AT ($10^{-5}M$) ($0,28 \pm 0,18$; $n=5$) y 4-DAMP ($10^{-5}M$) ($0,80 \pm 0,21$; $n=5$) (Fig. 4B).

En las células LM2 el tratamiento con CARB no modificó los niveles basales de IP_3 en ninguna de las concentraciones utilizadas (basal: $1,30 \pm 0,15$ CARB $10^{-7}M$: $1,03 \pm 0,16$; $n=5$).

Las células NMuMG no mostraron niveles detectables de IP_3 .

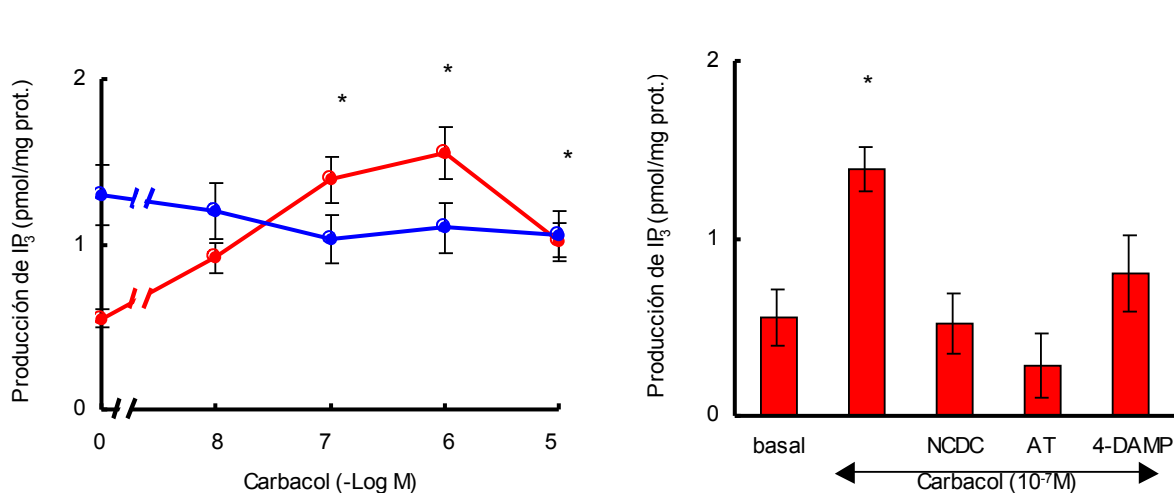


Figura 4: A: Curvas concentración respuesta de carbacol sobre la producción de IP_3 en células tumorales LM3 (●) y LM2 (●). B: efecto de diversos bloqueantes sobre la producción de IP_3 en células LM3. Los valores graficados son promedios \pm E.S. de 5 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0,05$ respecto del basal.

1.4.- Participación de óxido nítrico sintasas

1.4.1.- Producción de U¹⁴C-citrulina

La arginina es sustrato de la enzima NOS, que clásicamente se ha asociado a la activación de RCM. La NOS produce NO y citrulina en forma equimolecular. Cabe destacar que la arginina puede ser también metabolizada por la arginasa que produce urea y ornitina, esta última puede a su vez ser biotransformada en citrulina, por lo que al evaluar la actividad de NOS como la conversión de U¹⁴C-arginina a U¹⁴C-citrulina es probable estar evaluando también la actividad de arginasa. Por esta razón medimos la producción de U¹⁴C-citrulina (pmol/10⁶ cél.) en ausencia y en presencia de inhibidores selectivos de ambas enzimas, agregados previamente al agonista CARB. La Figura 5 muestra el efecto de concentraciones crecientes de CARB sobre la producción de U¹⁴C-citrulina en las células mamarias murinas estudiadas. Observamos que sólo una concentración 10⁻⁷ M del agonista estimula significativamente la producción de U¹⁴C-citrulina (LM2, basal: 20,4±1,8; CARB 10⁻⁷M: 30,0±1,9; LM3, basal: 8,3±0,9; CARB: 13,6±1,1; n=4). El pretratamiento con AT (10⁻⁵M) revirtió el efecto del agonista ya que redujo los niveles de producción de U¹⁴C-citrulina a los valores basales (LM2: 20,9±2,1; LM3: 8,1±0,7; n=4) (Fig. 6A y B). En las células LM2 la preincubación con NOHA (10⁻⁵M) inhibidor de arginasa, revierte el efecto del agonista (17,3±1,5; n=4) (Fig. 6A), mientras que en las células LM3 el efecto de CARB se bloquea sólo por la preincubación con L-NMMA (10⁻⁴M) inhibidor de NOS (9,0±1,1; n=4) (Fig. 6B).

No se observó efecto del CARB sobre células NMuMG, en ninguna de las concentraciones estudiadas (Fig. 5).

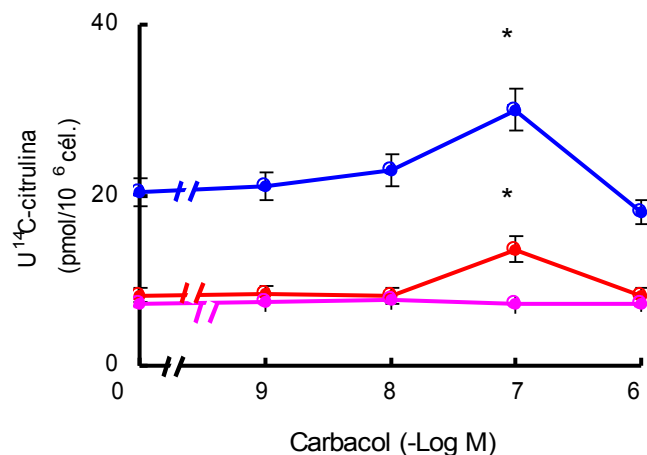


Figura 5: Curvas concentración-respuesta de carbacol sobre la producción de U¹⁴C-citrulina en células LM2 (●), LM3 (●) y NMuMG (●). Los valores son promedios ±E.S. de 5 experimentos. * p < 0,05 respecto del basal sin carbacol.

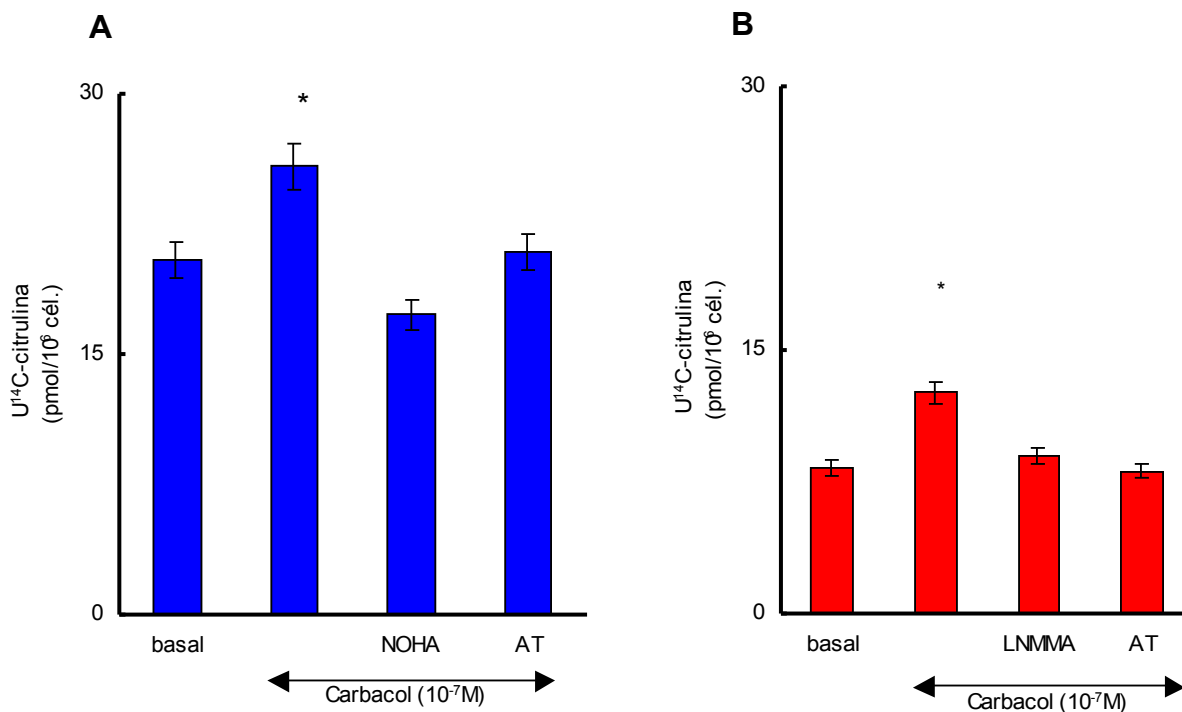


Figura 6: Producción de U¹⁴C-citrulina en células de la línea LM2 (A) y de la línea LM3 (B) incubadas con carbacol en presencia o en ausencia de diversos bloqueantes. Los valores son promedios ± E.S. de 4 experimentos realizados y duplicado. * p < 0,05 respecto del basal.

1.4.2. Producción de nitrato

La actividad de la enzima NOS se evaluó en los sobrenadantes de cultivo de las distintas líneas celulares determinando la producción de nitrito (nmol/10⁶ cél.) por el ensayo de Griess. Observamos que la producción basal de nitrito de las células LM3 es significativamente mayor que la de las células LM2 (LM3:10,0±0,5; LM2: 0,11±0,02; n=4) (Fig. 7). El agregado de concentraciones crecientes de CARB incrementó significativamente la producción de nitrito en las células LM3, con un efecto máximo a la concentración 10⁻⁷M (15,2±0,7; n=4).

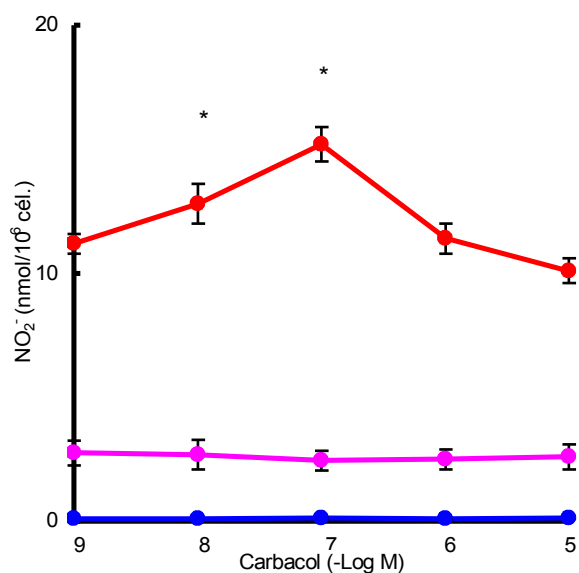
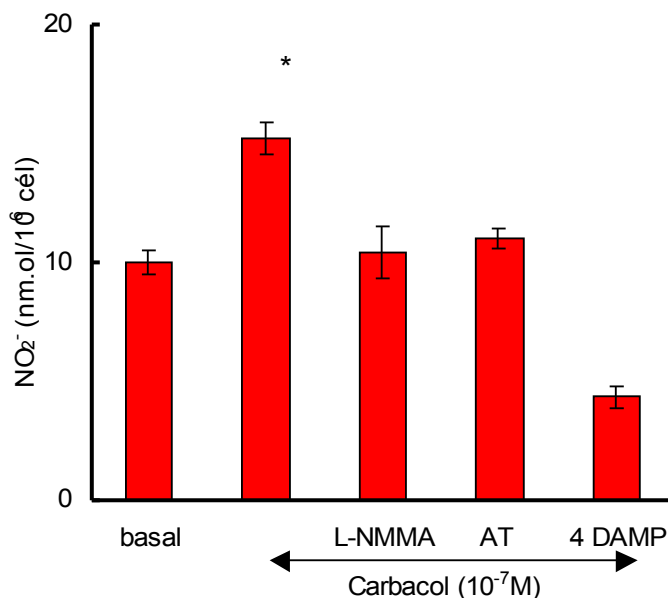


Figura 7: Curvas concentración-respuesta de carbacol sobre la producción de nitrito en las células, LM3 (●), LM2 (●) y NMuMG (●). Los valores son promedios ± E.S. de 4 experimentos.

* p<0,05 respecto del basal.

En estas células el efecto estimulante del CARB se bloqueó por la preincubación con AT (10^{-5}M) ($11,0\pm 1,1$; $n=4$) y 4-DAMP (10^{-5}M) ($4,3\pm 0,4$; $n=4$) lo que demuestra la participación de los receptores M_3 (Fig. 8). La producción de



nitrito se redujo por el agregado del inhibidor no selectivo L-NMMA (10^{-4}M), en forma previa al agonista, ($10,4\pm 1,1$; $n=4$).

Las células LM2 y las NMuMG, que mostraron bajos niveles basales de nitrito (LM2 basal: $0,11\pm 0,02$; CARB: $0,13\pm 0,03$; NMuMG basal: $2,7\pm 0,3$; CARB: $2,45\pm 0,4$; $n=4$) no respondieron al CARB en ninguna de las concentraciones utilizadas (Fig. 7).

Figura 8: Producción de nitrito en células de la línea LM3. Tratamiento con el inhibidor selectivo de NOS, LNMMA, y con antagonistas muscarínicos. Los valores son promedios \pm E.S. de 4 experimentos. * $p<0,05$ respecto del basal.

1.4.3.- Expresión de isoformas de óxido nítrico sintasa en células mamarias murinas

La producción de niveles basales detectables de nitrito en las células estudiadas (LM2: $0,11 \pm 0,02$; LM3: $10,0 \pm 0,5$; NMuMG: $2,7 \pm 0,3$) nos llevó a investigar qué isoformas de NOS se encontraban expresadas en las mismas. Los resultados de los ensayos de Western blot con anticuerpos específicos para NOS1, NOS2 y NOS3, en lisados de células LM2, LM3 y NMuMG, se muestran en la Figura 9.

Una banda a 155 kDa fue reconocida por el anticuerpo contra NOS1 en las células de la línea LM3 y en las de la línea NMuMG. La cuantificación de las bandas por análisis densitométrico (DO/mm^2) muestra que las células LM3 expresan mayores niveles de la proteína NOS1 (61%) que las células NMuMG (LM3: 1,050; NMuMG: 0,414). La preincubación de la membrana de nitrocelulosa con un péptido bloqueante específico para NOS1 anula la observación de las bandas detectadas (dato no mostrado). También detectamos una banda de 140 kDa que fue reconocida por el anticuerpo contra NOS3 sólo en las células LM2 (0,102). La preincubación de la membrana de nitrocelulosa con un péptido bloqueante específico para NOS3 elimina la banda detectada (dato no mostrado). No se observó expresión de NOS2 (130 kDa) en ninguno de los tipos celulares estudiados.

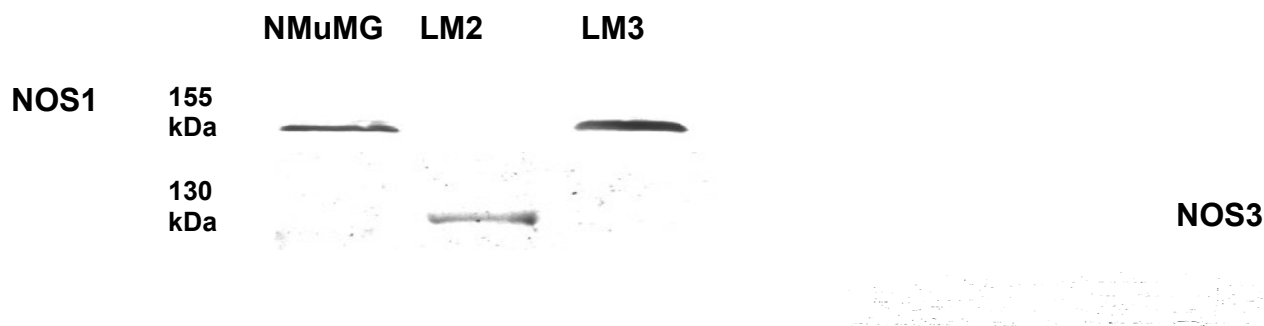


Figura 9: Ensayos de Western blot para identificar isoformas de NOS en células tumorales y normales. Se muestra un ensayo representativo de 4 similares.

1.5.- Participación de arginasas

1.5.1.-Actividad de arginasas

Teniendo en cuenta que en las células LM2 la producción de U¹⁴C-citrulina estimulada por CARB fue revertida por NOHA, un inhibidor de arginasa, estudiamos la actividad de dicha enzima evaluando la producción de urea en las células tumorales y normales. Observamos niveles basales detectables de urea ($\mu\text{moles /h.}10^6 \text{ cél.}$) en las células de las tres líneas estudiadas (LM2: 109 ± 1 ; LM3: 44 ± 6 ; NMuMG: 29 ± 3 ; $n=5$). El agregado de CARB estimuló la actividad de arginasas sólo en las células LM2, con un efecto máximo a la concentración 10^{-7}M (198 ± 22 ; $n=5$) (Fig. 10). La preincubación con NOHA (10^{-4}M) bloqueó el efecto del agonista (37 ± 14 ; $n=5$) (Fig. 11).

El pretratamiento de las células con AT (143 ± 16 ; $n=5$) y con el antagonista selectivo de receptores M₁, PIR (10^{-5}M) (150 ± 14 ; $n=5$) o de receptores M₂, MET (10^{-5}M) (136 ± 36 ; $n=5$) revirtió el efecto estimulante del CARB.

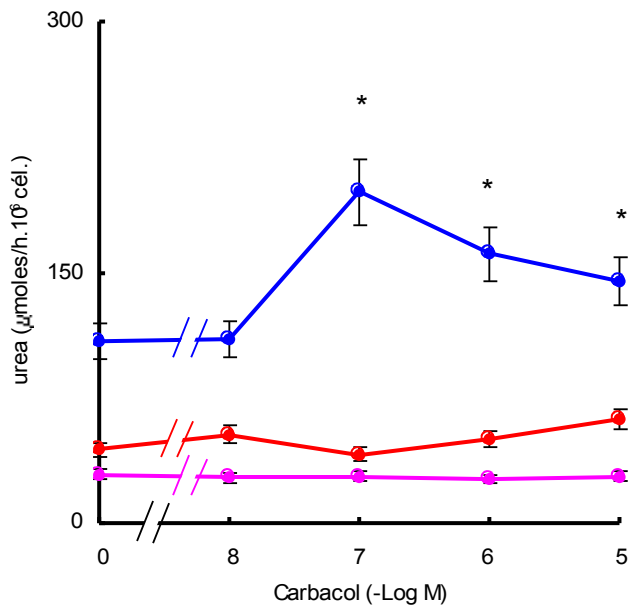


Figura 10: Curva concentración respuesta de carbacol sobre actividad de arginasa medida en células LM2 (●), LM3 (●) y NMuMG (●). Los valores son promedios \pm E.S. de 5 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0,05$ respecto del basal.

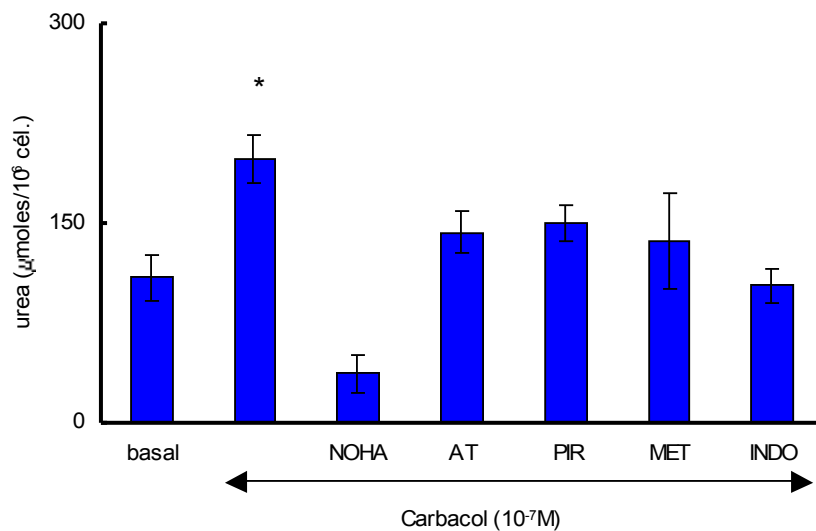


Figura 11: Producción de urea en células de la línea LM2 en ausencia o en presencia de carbacol, pretratadas con el inhibidor NOHA o con bloqueantes muscarínicos. Los valores son promedios \pm E.S. de 5 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0,05$ respecto del basal.

1.5.2.- Expresión de isoformas de arginasa en células mamarias murinas

Por ensayos de Western blot investigamos la expresión de las isoformas I y II de la enzima arginasa en células tumorales y normales. La Figura 12 muestra los resultados de la inmunomarcación con el anticuerpo contra arginasa I. Sólo en lisados de células LM3 se observa una banda de 35 kDa reconocida por este anticuerpo. El valor de la cuantificación de la misma por densitometría (DO/mm^2) es 0,011. En la parte inferior de la figura se observa que los 3 tipos celulares estudiados expresan la proteína arginasa II cuyo peso molecular se indica a la izquierda. El análisis densitométrico de las bandas muestra que las tres líneas celulares estudiadas expresan mayoritariamente la isoforma II (NMuMG:0,008; LM2:0,014; LM3:0,076).

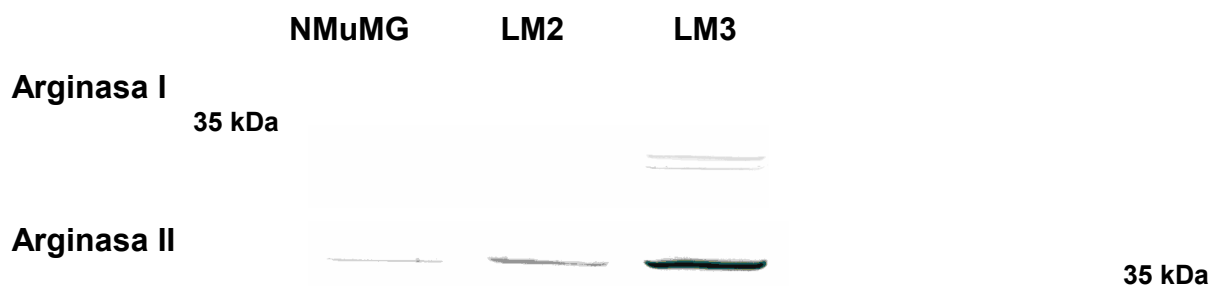


Figura 12: Ensayos de Western blot para identificar isoformas de arginasa en células tumorales y normales. Se muestra un ensayo representativo de 4 similares.

1.6.-Participación de ciclooxigenasas

1.6.1.- Producción de PGE₂

Otra de las enzimas que se asocia clásicamente a la activación muscarínica es la COX. La actividad de la misma fue evaluada midiendo la producción de PGE₂ por RIA (pg/10⁶ cél.). Observamos que el agregado del agonista produce una respuesta de tipo concentración dependiente muy potente sólo en las células LM2, con un efecto máximo a la concentración 10⁻⁷M (basal: 120±11; CARB 10⁻⁷M: 3171±178; n=6) (LM3: basal: 28±3; CARB 10⁻⁷M: 35±7; n=6) (NMuMG: basal: 440±10; CARB 10⁻⁷M: 430±20; n=6) (Fig. 13). La participación muscarínica fue confirmada por el pretratamiento de las células con AT (10⁻⁵M) (145±13) (n=6) y con el antagonista selectivo de M₂, MET (10⁻⁵M) (207±22; n=6). El efecto de la dosis máxima del agonista fue inhibido por el pretratamiento con el inhibidor no selectivo de COX, INDO (10⁻⁶M) (81±7; n=6) o con el inhibidor selectivo de COX-2, NS-398 (10⁻⁵M) (186±16; n=6) (Fig. 14).

Las células NMuMG producen altos niveles basales del prostanoide pero no responden al CARB en las concentraciones utilizadas (basal: 2513±153; CARB: 2604±141; n=6).

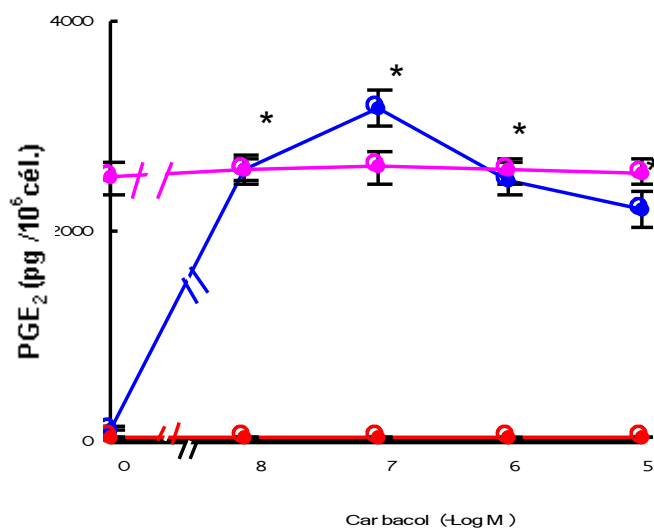


Figura 13: Curva concentración respuesta de carbacol sobre la producción de PGE₂ en células LM2 (●), LM3 (●) y NMuMG (●). Los valores son promedios ± E.S. de 5 experimentos realizados por duplicado. * p<0,05 respecto del basal.

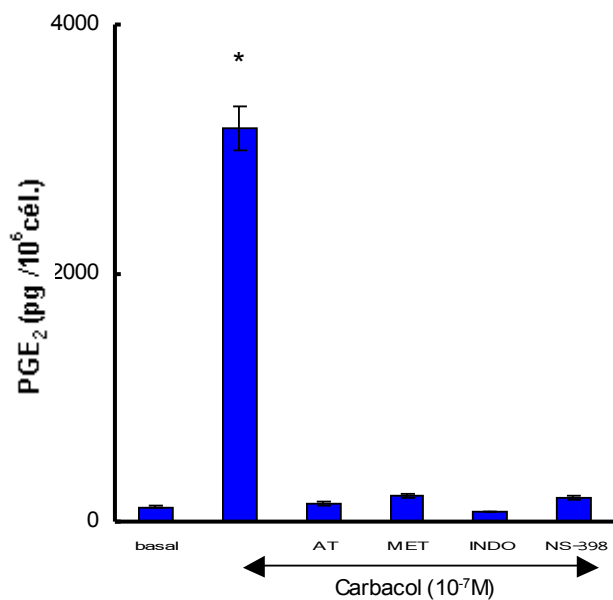


Figura 14: Producción de PGE₂ en células de la línea LM2 ■ tratadas con antagonistas muscarínicos y bloqueantes enzimáticos. Los valores son promedios ± E.S. de 6 experimentos realizados por duplicado. * p< 0,05 respecto del basal.

1.6.2.- Expresión de isoformas de ciclooxigenasa en células mamarias murinas

Investigamos la expresión de las isoformas 1 y 2 de COX por inmunomarcación en células tumorales y normales. En la Figura 15 se muestran las bandas de 74 y 72 kDa que fueron reconocidas respectivamente por los anticuerpos contra COX-1 y contra COX-2. Las tres líneas celulares estudiadas expresan ambas isoformas de COX. La cuantificación desintométrica (DO/mm²) muestra que las células constitutiva COX-1 (LM3:3,75; LM2: 2,046). La isoforma inducible COX-2 sólo se expresa con intensidad en las células LM2 (5,024) (Fig. 15).

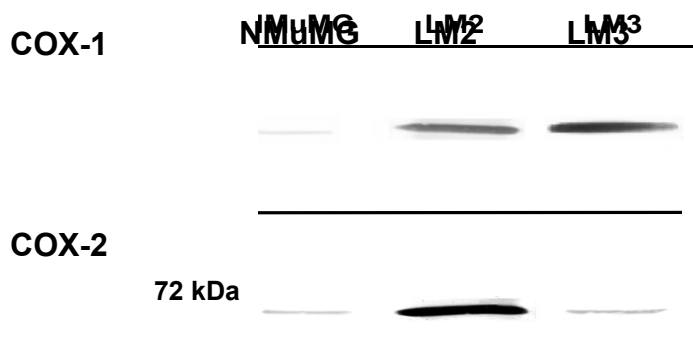


Figura 15: Ensayos de Western blot para identificar isoformas de COX en células tumorales y normales. Se muestra un ensayo representativo de 4 similares.

2.- Proliferación celular

2.1.- Efecto del carbacol

Luego de estudiar y caracterizar la expresión y función de los RCM en las células tumorales, decidimos investigar qué tipo de respuesta biológica se desencadena al activar dichos receptores con CARB. Para esto realizamos ensayos de proliferación in vitro utilizando la técnica de incorporación de [³H]-timidina.

En la Figura 16 se grafican curvas concentración-respuesta de CARB sobre la proliferación de las distintas células estudiadas. Observamos un incremento significativo en forma dependiente de la concentración de la incorporación de [³H]-timidina en células LM2 y LM3 considerando el % de estimulación respecto del basal. El efecto máximo se observó en ambas líneas celulares a la concentración 10^{-7} M del agonista (LM2: $23,7 \pm 2,4$; LM3: $33,1 \pm 3,1$; n=6). El CARB no estimuló significativamente la proliferación de las células NMuMG en ninguna de las concentraciones estudiadas.

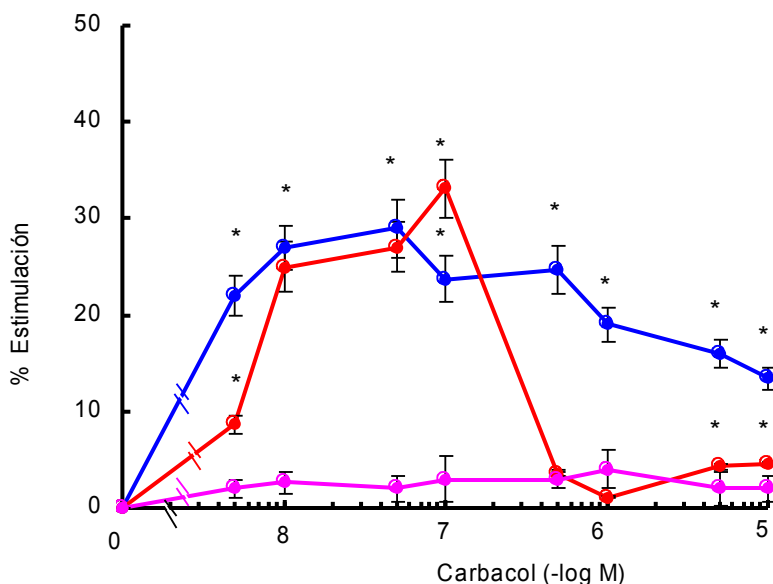


Figura 16: Ensayos de proliferación celular medida como incorporación de [^3H]-timidina, en células LM2 (●), LM3 (●) y NMuMG (●). Los valores son promedios \pm E.S. de 6 experimentos realizados por triplicado. * $p < 0,05$ respecto del basal.

A fin de determinar qué subtipos de RCM y mediadores de señalización estaban involucrados en la proliferación de las células tumorales realizamos ensayos utilizando la dosis efectiva máxima de CARB (10^{-7}M) en ausencia o en presencia de antagonistas selectivos de RCM e inhibidores de las enzimas efectoras acopladas a dichos receptores.

En la Figura 17A se observa que en las células LM2 el efecto estimulante del CARB ($23,7 \pm 7\%$) fue bloqueado por el agregado de AT (10^{-5}M) ($0,5 \pm 0,8$; $n=6$) y MET (10^{-5}M) ($1,2 \pm 0,3$; $n=6$) indicando que el efecto está mediado por la activación de receptores del subtipo M_2 . También observamos la reversión del efecto estimulante del CARB por la preincubación con el quelante de calcio, EGTA

(10^{-3} M) ($0,5\pm 0,3$; $n=6$), los inhibidores de COX, INDO (10^{-6} M) ($4,2\pm 1,4$; $n=6$), NS-398 (10^{-5} M) ($2,9\pm 2,3$; $n=6$) y el inhibidor de arginasa, NOHA (10^{-4} M) ($1,9\pm 1,2$; $n=6$).

Por otra parte en las células LM3 el efecto proliferativo del agonista ($33,1\pm 6,5\%$) está mediado por la activación de los receptores M_3 ya que es inhibido por el pretratamiento con AT (10^{-5} M) ($8,6\pm 2,9$; $n=6$) y 4-DAMP (10^{-5} M) ($8,3\pm 2,8$; $n=6$). Demostramos la participación de las enzimas PLC, NOS y PKC pues el efecto del agonista es bloqueado por el pretratamiento con NCDC (10^{-5} M) ($2,1\pm 0,5$; $n=6$), L-NMMA (10^{-4} M) ($2,4\pm 0,8$; $n=6$) y H-7 ($2,5\times 10^{-5}$ M) ($15,9\pm 3,9$; $n=6$) respectivamente, así como también por EGTA (10^{-3} M) ($14,4\pm 3,7$; $n=6$).

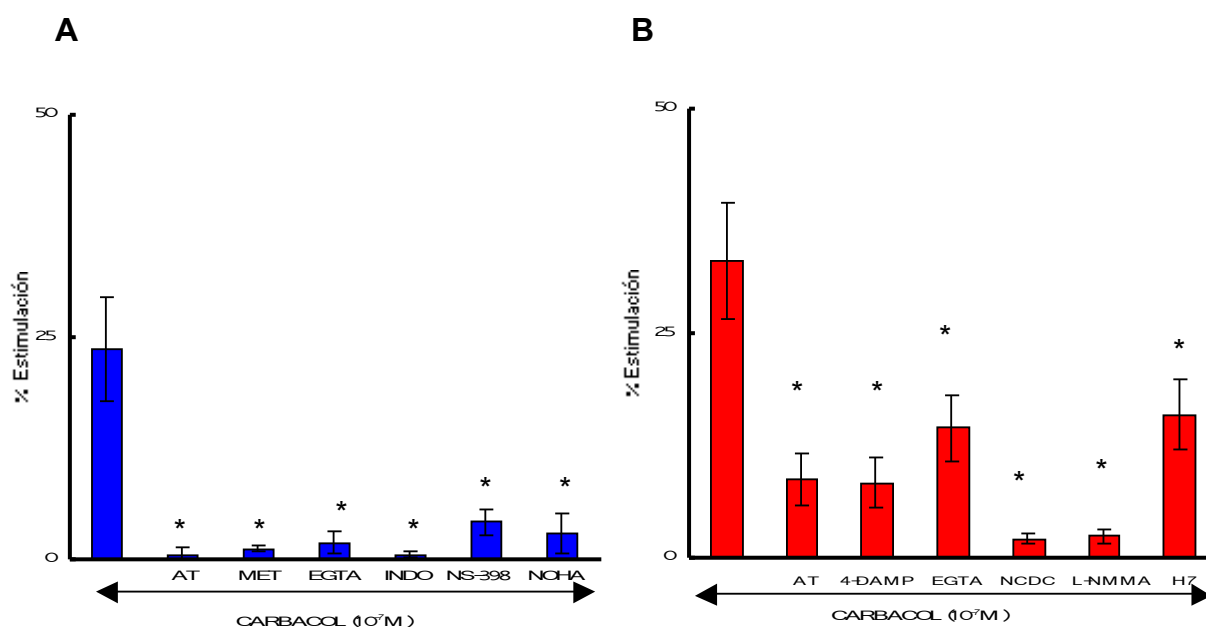


Figura 17: Ensayos de incorporación de [3 H]-timidina en células A) LM2 y B) LM3 tratadas con el agonista carbaccol en ausencia y en presencia de diversos bloqueantes muscarínicos o inhibidores enzimáticos. Los valores son promedios \pm E.S. de 6 experimentos realizados por triplicado. * $p < 0,05$ respecto del carbaccol.

2.2.- Participación de tirosinas quinasas en la proliferación celular

Ha sido previamente documentado que la activación de receptores para neurotransmisores puede desencadenar reacciones de fosforilación catalizadas por tirosinas quinasas (TK) tanto citosólicas como asociadas a receptores. Por esto investigamos si estas enzimas participan en la cascada de señalización muscarínica que media el efecto proliferativo del agonista. Observamos que el efecto del CARB ($10^{-7}M$) medido como porcentaje de estimulación (LM2: $26,0 \pm 5,1$; LM3: $29,7 \pm 5,4$; $n=6$) se revierte por el pretratamiento de las células LM2 y LM3 con un inhibidor de TK de amplio espectro como GEN en una concentración de $30 \mu g/ml$ (LM2: $2,5 \pm 1,5$; LM3: $4,7 \pm 2,1$; $n=6$), o con TIR, un inhibidor de la actividad de TK asociada a receptores ($6 \times 10^{-6}M$) (LM2: $5,3 \pm 2,3$; LM3: $0,2 \pm 1,4$; $n=6$). Por otra parte el PD 098,059 ($10^{-5}M$), un inhibidor de las MAPKK también inhibe el efecto proliferativo del agonista en ambos tipos celulares (LM2: $8,6 \pm 2,9$; LM3: $1,3 \pm 1,1$; $n=6$), mientras que el SB 203580 ($10^{-5}M$), inhibidor de la p38 MAPK sólo tiene efecto en células LM3 ($11,5 \pm 3,3$; $n=6$) (Fig. 18).

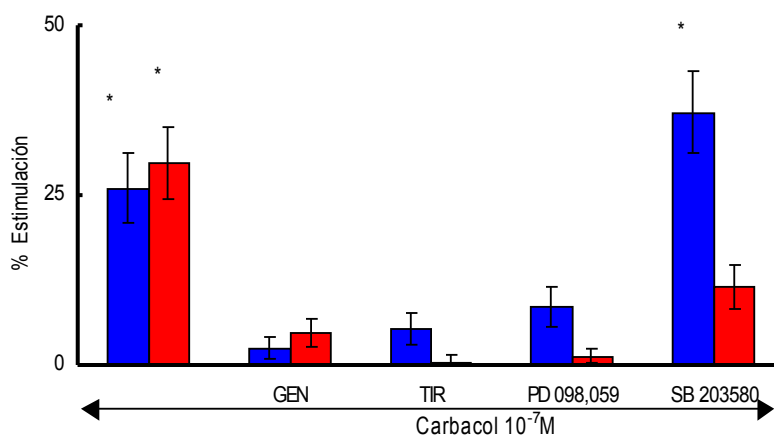


Figura 18: Ensayos de incorporación de $[^3H]$ -timidina en células LM2 (■) y LM3 (■) tratadas con el agonista carbacol en ausencia y en presencia de inhibidores de la actividad de tirosinas quinasas. Los valores son promedios \pm E.S. de 6 experimentos realizados por triplicado. * $p < 0,05$ respecto del basal (células sin tratamiento).

3.- Angiogénesis inducida por células tumorales

3.1.- Modulación parasimpática de la respuesta angiogénica

Es sabido que cuando un tumor supera un tamaño de 1-2 mm de diámetro, requiere de la formación de nuevos vasos sanguíneos, angiogénesis, para seguir creciendo. Teniendo en cuenta que el agonista muscarínico promueve la proliferación de las células tumorales, decidimos estudiar si el mismo también era capaz de estimular la neovascularización. Para esto las células tumorales se estimularon in vitro con la concentración efectiva máxima de CARB (10^{-7} M) durante 15 minutos en ausencia o en presencia de diversos bloqueantes muscarínicos e inhibidores enzimáticos y se evaluó la formación de neovasos por el ensayo de TIA.

En la Figura 19A se observa que las células tumorales inducen una respuesta angiogénica positiva medida como número de vasos/ mm^2 piel (LM2:2,82 \pm 0,3; LM3:2,73 \pm 0,48; n=6) con respecto al control (piel normal).

El tratamiento con CARB (10^{-7} M) potencia la respuesta angiogénica en ambos tipos celulares (LM2:4,73 \pm 0,6; LM3:4,82 \pm 0,28) (n=6). Este efecto del agonista involucra la activación de receptores de los subtipos M_1 y M_2 ya que la respuesta se bloquea en las células de ambas líneas tumorales por la preincubación con AT (10^{-5} M) (LM2:3,31 \pm 0,4; LM3:2,21 \pm 0,37; n=6), PIR (LM2:3,35 \pm 0,65; LM3: 3,11 \pm 0,45; n=6) y MET (10^{-5} M) (LM2:3,27 \pm 0,72; LM3:2,14 \pm 0,46; n=6). En las células LM3 también involucra la activación del

receptor del subtipo M₃ pues el efecto es bloqueado por la preincubación con 4-DAMP (10⁻⁵M) (4,17±0.27) (Fig. 19B).

Para determinar que enzimas efectoras de la señalización muscarínica participan en la respuesta angiogénica inducida por CARB, realizamos ensayos de TIA preincubando las células con diversos inhibidores.

En las células LM2 sólo la COX-2 está involucrada en el efecto proangiogénico del agonista pues se bloquea únicamente con NS-398 (10⁻⁵M) (3,09±0,66; n=8) (Fig. 20A). Además en las células LM2, el efecto proangiogénico del agonista está mediado por la activación de arginasas, pues el tratamiento con NOHA (10⁻⁴M) (3,19±0,71; n=8) revierte el efecto del CARB.

En las células LM3, el efecto del CARB involucraría, en cambio, la participación de PLC y NOS1 ya que este efecto se revierte por el pretratamiento con NCDC (10⁻⁵M) (3,86±0,18; n=8) y L-NMMA (10⁻⁴M) (2,28±0,36; n=8) respectivamente (Fig. 20B).

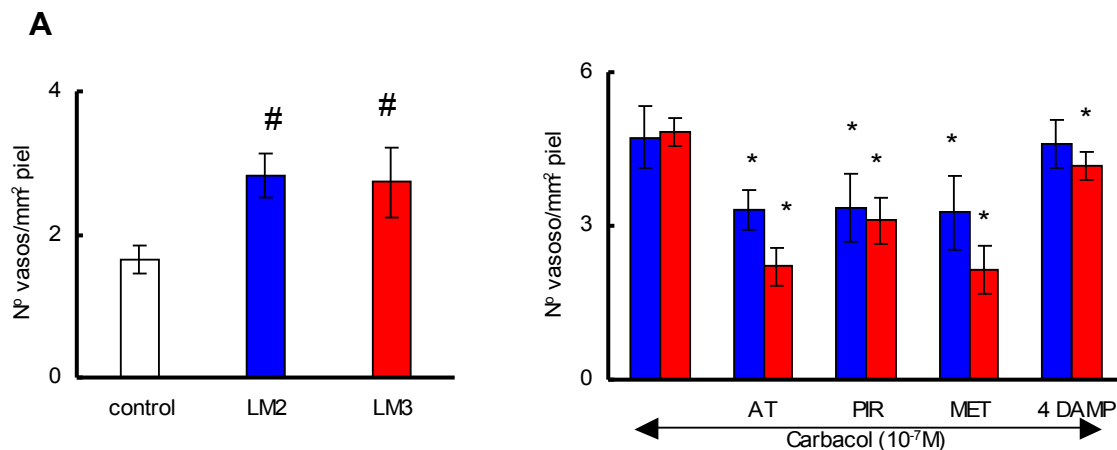


Figura 19: Respuesta angiogénica inducida por células LM2 (●) y LM3 (●) en ausencia A) y en presencia B) de CARB en células pretratadas o no con bloqueantes muscarínicos. Los valores son promedios \pm E.S. de 6 determinaciones. # $p < 0,05$ respecto del control (piel normal). * $p < 0,05$ respecto del CARB.

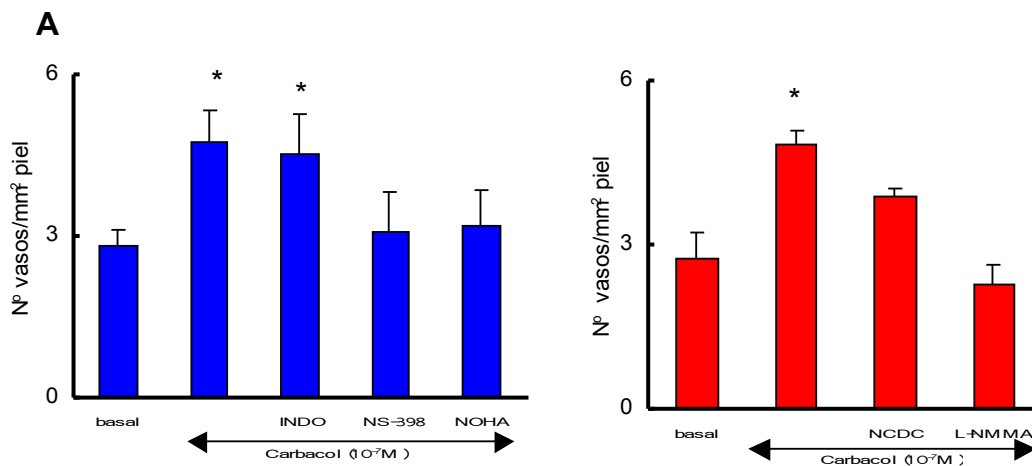


Figura 20: Respuesta angiogénica. Tratamiento con CARB en ausencia o en presencia de inhibidores enzimáticos. A: células LM2; B: células LM3. Los valores son promedios \pm E.S. de 8 determinaciones. * $p < 0,05$ respecto del basal.

3.2.- Producción del factor de crecimiento del endotelio vascular en células mamarias murinas

Existen numerosas evidencias que indican que el VEGF es una de las citoquinas proangiogénicas más importantes por lo que decidimos evaluar la producción de este factor en las células mamarias estudiadas.

Por Western blot detectamos expresión de VEGF tanto en sobrenadantes (Sn) como en lisados (Lis) de cultivo de las células tumorales. En la Figura 21A se observan bandas de 80 kDa reconocidas por el anticuerpo contra VEGF tanto en Sn, como en Lis de las células. La Figura 21B muestra el análisis densitométrico de estas bandas (OD/mm^2) e indica que las células LM2 producen mayores niveles de VEGF (Sn: 0,521; Lis:0,125) que las LM3 (Sn: 0,236; Lis: 0,063). Las células NMuMG expresan niveles escasamente detectables de VEGF (Sn:0,034; Lis:0,054) (Fig. 21).

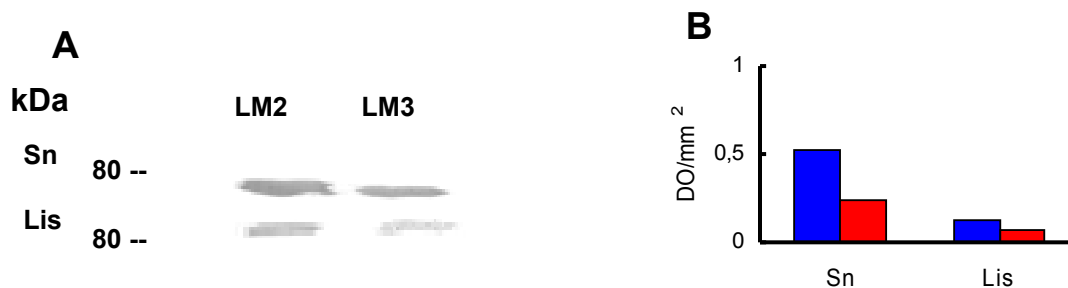


Figura 21: A: Ensayos de Western blot para caracterizar la expresión de VEGF en sobrenadantes (Sn) y lisados (Lis) de células LM2 (■) y LM3 (■). B: DO/mm^2 : unidades de densidad óptica por mm^2 . Se muestra un ensayo representativo de 4 similares.

El tratamiento de las células con CARB (10^{-7} M) aumentó la producción de VEGF tanto en Sn como en Lis de las células tumorales (LM2: Sn: 3,866; Lis: 1,736) (LM3: Sn: 3,904; Lis: 1,224) (Fig. 22).

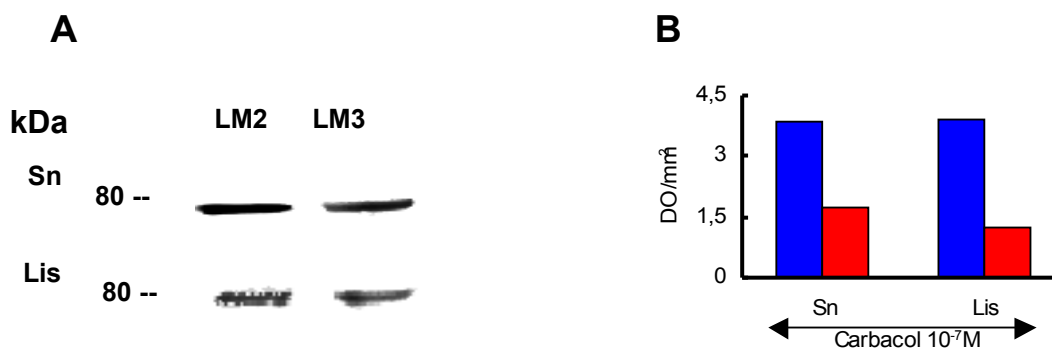


Figura 22: A: Ensayos de Western blot para caracterizar la expresión de VEGF en sobrenadantes (Sn) y lisados (Lis) de células LM2 (■) y LM3 (■) incubadas con CARB (10^{-7} M). B: DO/mm²: unidades de densidad óptica por mm². Se muestra un ensayo representativo de 4 similares.

4.- Modulación parasimpática del crecimiento tumoral

Nuestros resultados anteriores indican que el CARB estimula la proliferación de células tumorales “in vitro”, por activación de RCM. Por ello investigamos si el agonista estimula también el crecimiento tumoral; para esto las células tumorales se trataron “in vitro” con la dosis efectiva máxima de CARB y se inocularon s.c. en hembras BALB/c, controlando el crecimiento de los tumores durante 28 días. En la Figura 23 se observa que el CARB estimuló el crecimiento tumoral desde el día 17 en los portadores de LM2 (Fig. 23A) y desde el día 7 en los portadores de LM3 (Fig. 23B).

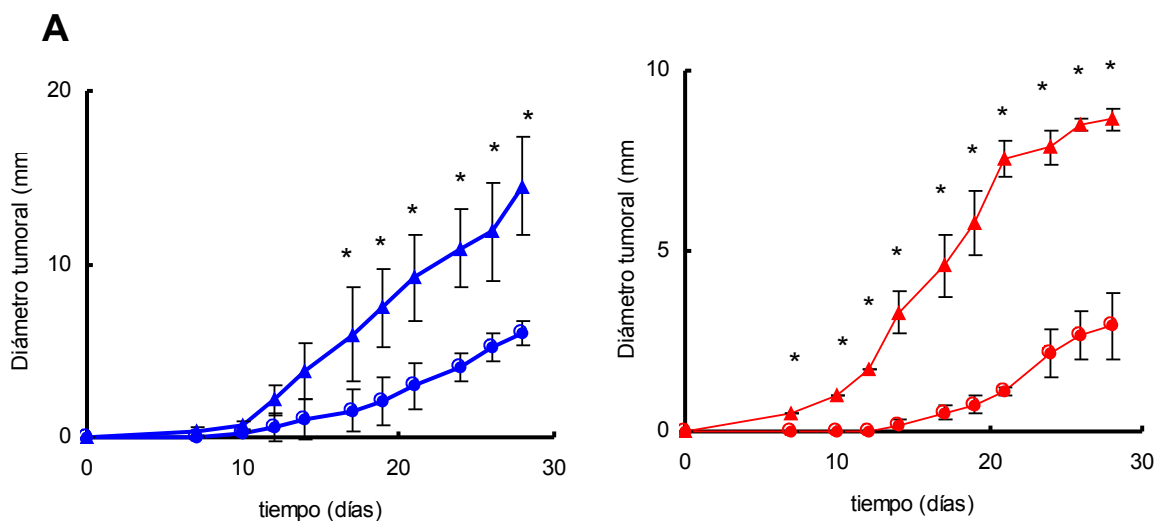


Figura 23: Crecimiento de tumores LM2 (A) y LM3 (B) en ausencia (●) o presencia (▲) de CARB ($10^{-7}M$). Los valores son promedios \pm E.S. $n=8$. * $p<0,05$ respecto del control (células LM2 y LM3 inoculadas sin tratamiento previo).

La Figura 24 muestra el efecto del pretratamiento de las células tumorales con diversos antagonistas muscarínicos. En el tumor LM2 el efecto estimulante del

CARB está mediado por receptores M_1 y M_3 pues, el mismo se inhibe con PIR ($10^{-5}M$) y 4-DAMP ($10^{-5}M$) (Fig. 24A). La estimulación muscarínica del crecimiento del tumor LM3, se revirtió totalmente con 4-DAMP ($10^{-5}M$) y parcialmente con MET ($10^{-5}M$), lo que evidencia la participación de receptores M_3 y M_2 respectivamente (Fig. 24B). El pretratamiento con AT ($10^{-5}M$) revirtió el efecto estimulante del crecimiento inducido por CARB tanto en LM2 como en LM3.

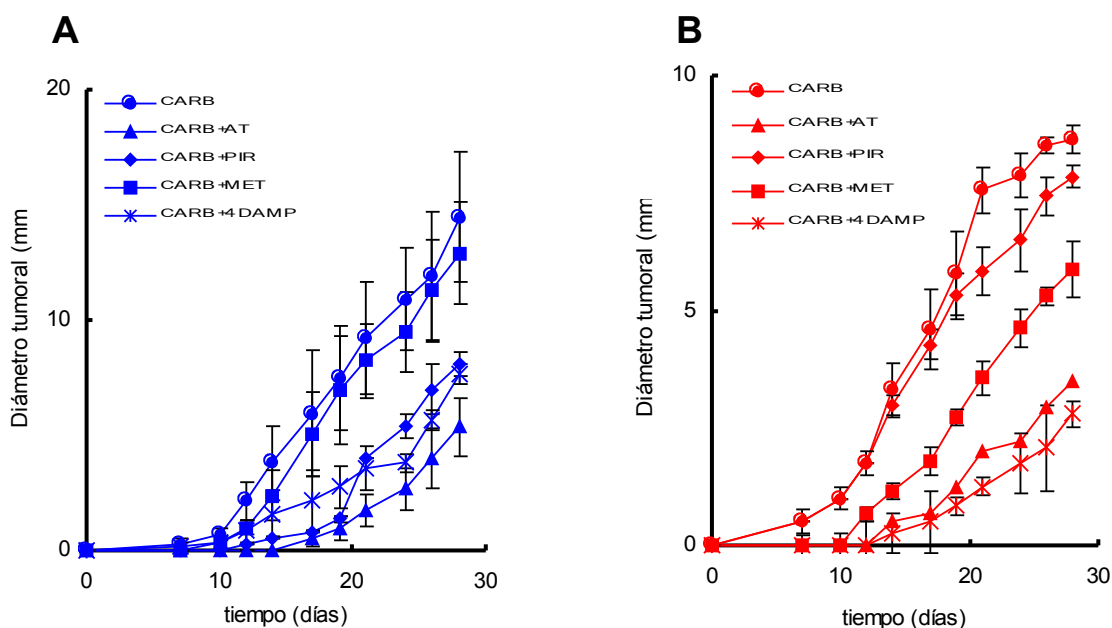


Figura 24: Efecto del CARB en ausencia y en presencia de bloqueantes muscarínicos, sobre el crecimiento de tumores LM2 (A) y LM3 (B). Los valores graficados corresponden a los promedios \pm E.S. (n=8).

Para determinar que enzimas efectoras de la señalización muscarínica participan en la estimulación parasimpática del crecimiento tumoral, incubamos las células LM2 y LM3 con inhibidores enzimáticos en forma previa al tratamiento con CARB ($10^{-7}M$). En la Figura 25A observamos que en las células LM2 este efecto

estimulante es bloqueado sólo por la preincubación con NS-398 (10^{-5} M); mientras que en las células LM3 se observa que el efecto del agonista muscarínico sobre el crecimiento tumoral fue inhibido por la preincubación con NCDC (10^{-5} M) (Fig. 25B).

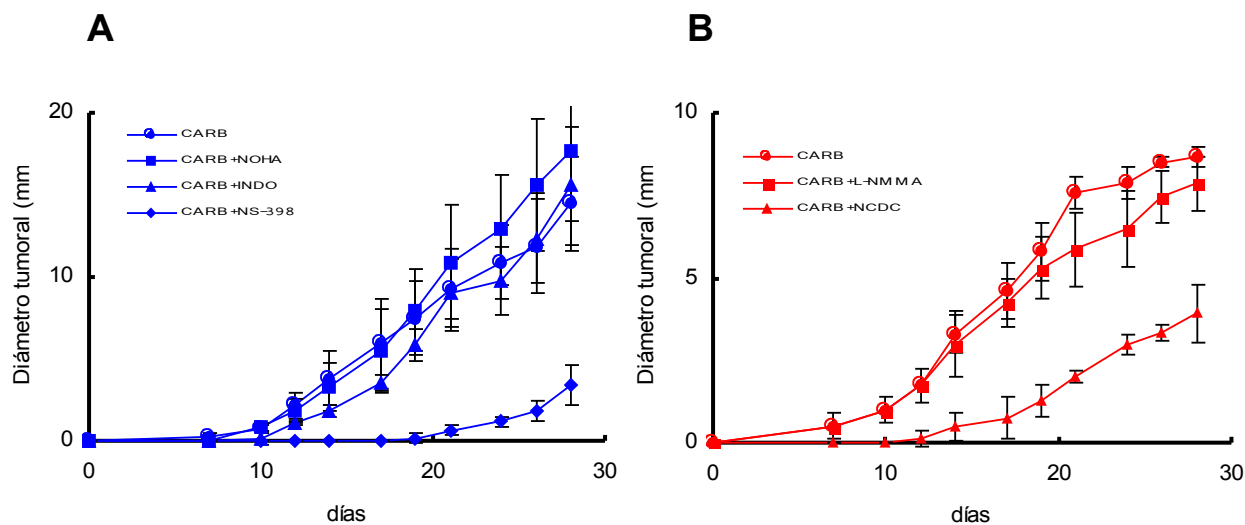


Figura 25: Efecto del tratamiento con CARB en ausencia y presencia de inhibidores enzimáticos sobre el crecimiento de tumores LM2 (A) y LM3 (B). Los valores graficados corresponden a los promedios \pm E.S (n=8).

5.- Modulación parasimpática del efecto de antineoplásicos

5.1.- Efecto del tratamiento prolongado con carbacol

Todos los efectos parasimpáticos en células tumorales hasta aquí investigados, fueron estudiados en ensayos en los que el agonista muscarínico fue utilizado en una concentración 10^{-7} M y agregado durante períodos cortos de tiempo (15-30 min). Por esto, fue de interés investigar las acciones del CARB a tiempos prolongados (hasta 24 hs).

Observamos que la misma concentración del agonista que estimula la proliferación de células tumorales con cortos tiempos de tratamiento, es capaz de ejercer un efecto inhibitorio de la proliferación a tiempos prolongados, medida por la incorporación de $[^3\text{H}]$ -timidina. En células LM2, el mismo es detectable luego de 5 hs. de incubación (Fig. 26). Mientras que en las células LM3, el efecto inhibitorio comienza después de las 11 hs. Resultados análogos se observaron utilizando concentraciones menores del CARB (10^{-8} M y 10^{-9} M) (datos no mostrados).

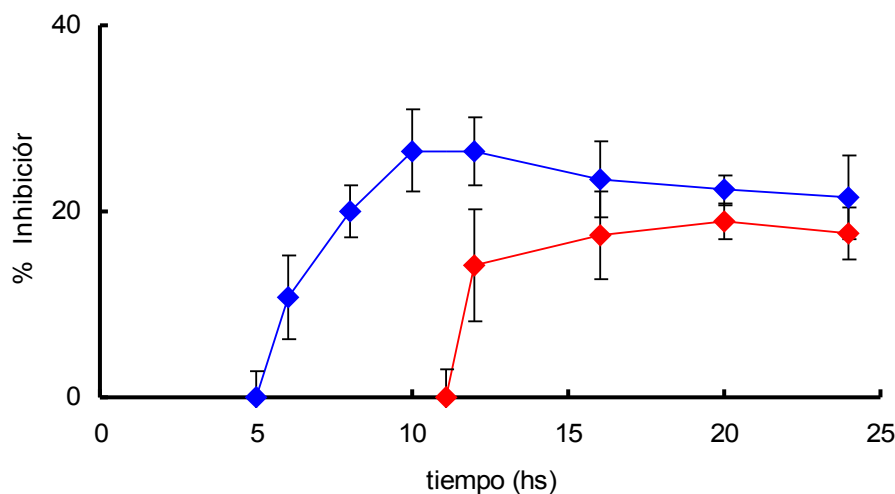


Figura 26: Efecto de CARB 10^{-7} M sobre la proliferación de células tumorales LM2 (♦) y LM3 (♦) en función del tiempo.

5.2.- Estimulación de la necrosis y la apoptosis por carbacol

Puesto que el efecto inhibitorio de la proliferación celular ejercido por diversas drogas, puede producirse a expensas de un incremento en el número de células necróticas o apoptóticas, investigamos estos efectos por medio de la técnica de TUNEL modificada y de la tinción con naranja de acridina. Observamos que en células LM2 y LM3 el CARB (10^{-7} M) produce un incremento tanto del número de células necróticas como apoptóticas con respecto a las células sin tratar (basal) (Fig. 27).

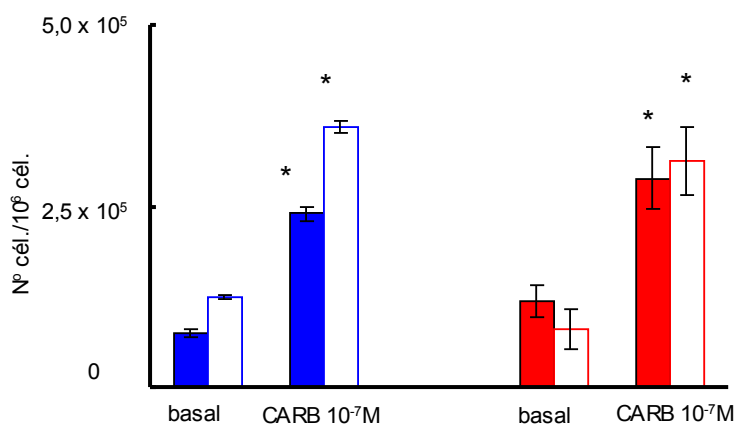


Figura 27: Efecto del CARB en la necrosis (■) y apoptosis (□) celular en las líneas LM2 (◆) y LM3 (◆). Los valores graficados representan los promedios de 3 experimentos \pm E.S. realizados por duplicado. * $p < 0,05$ respecto del basal de LM2 o LM3.

En la Figura 28 se observan fotografías de preparados de células LM2 y LM3 en necrosis (A) y en apoptosis (B) por la técnica de TUNEL, mientras que en (C) se observan las células en apoptosis, teñidas con naranja de acridina.

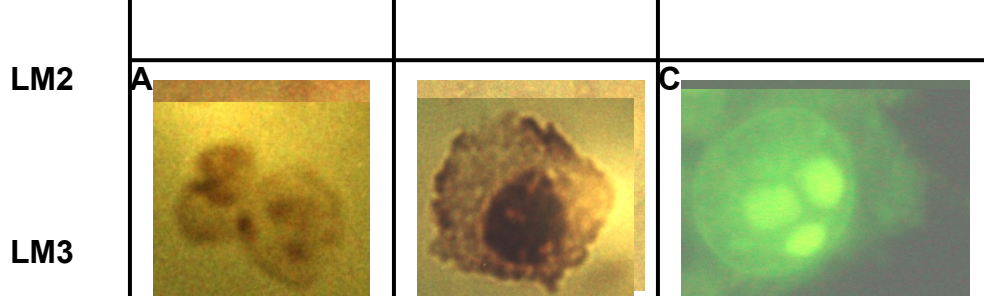


Figura 28: Morfología de células LM2 (panel superior) y LM3 (panel inferior) necróticas (A) y apoptóticas (B) observadas con la técnica de TUNEL y por la tinción con naranja de acridina (C) (aumento X 1000).

En la Figura 29 observamos que la apoptosis, medida como % con respecto al basal (células sin tratamiento) (LM2: $16,33 \pm 2,00$; LM3: $15,67 \pm 1,68$; $n=6$) se incrementa por el tratamiento con CARB ($10^{-7}M$) durante 20 hs (LM2: $25,45 \pm 3,45$; LM3: $29,64 \pm 3,59$; $n=6$). Este efecto es bloqueado en ambas líneas por la preincubación con AT ($10^{-5}M$) (LM2: $10,76 \pm 1,29$; LM3: $3,41 \pm 0,45$; $n=6$) y MET ($10^{-5}M$) (LM2: $17,11 \pm 2,05$; LM3: $11,11 \pm 1,33$; $n=6$). En las células LM2 este efecto también es bloqueado por la preincubación con PIR ($10^{-5}M$) ($10,33 \pm 1,24$; $n=6$) y 4-DAMP ($10^{-5}M$) ($12,70 \pm 1,52$; $n=6$).

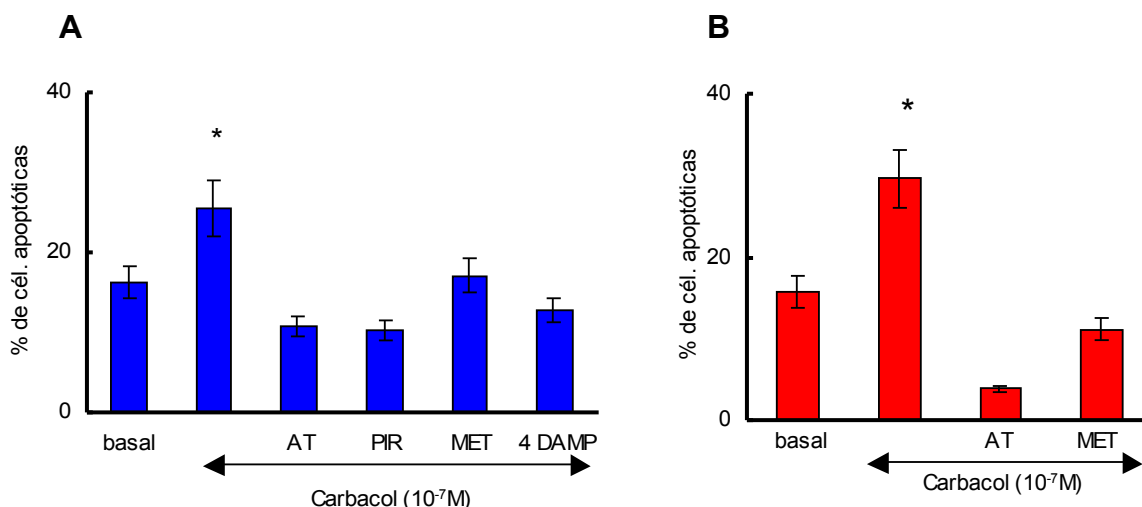


Figura 29: Efecto del CARB sobre la apoptosis de células LM2 (A) y LM3 (B) en ausencia y presencia de antagonistas muscarínicos, medido por tinción con naranja de acridina. Los valores graficados representan los promedios \pm E.S. de 6 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0,05$ respecto del basal.

5.3.- Interacción de taxol con receptores colinérgicos muscarínicos

El Tx es una de las drogas antineoplásicas de primera elección en el tratamiento del cáncer de mama. Si bien el efecto citotóxico del Tx se produce por polimerización de la tubulina lo que impide la formación del huso mitótico, poco se conoce acerca de su mecanismo de señalización intracelular. Por esto investigamos la participación de los RCM en el efecto citotóxico del Tx sobre células tumorales.

Por medio de ensayos de desplazamiento de la unión de [^3H]-QNB en células LM2 y LM3 demostramos que el Tx reduce la unión del radioligando en forma concentración dependiente. El efecto máximo obtenido es de 42,4% en células LM3 y de 28,7% en LM2. Estos resultados indican que el Tx, en el rango de concentraciones estudiadas, es capaz de interactuar con los RCM presentes en las células tumorales (Fig. 30).

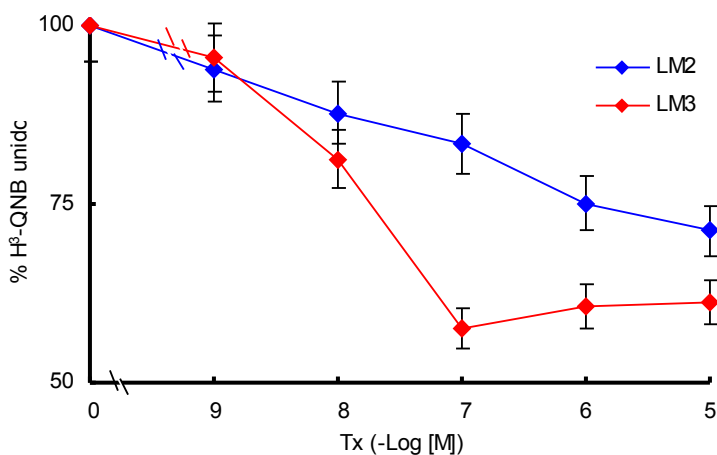


Figura 30: Ensayos de desplazamiento de la unión de [^3H]-QNB en células LM2 (◆) y LM3 (◆) con concentraciones crecientes de Tx. Los puntos graficados corresponden al porcentaje de unión del radioligando ([^3H]-QNB) en presencia de Tx con respecto al control (100%), células sin Tx. Se graficaron los promedios \pm E.S. (n=4).

5.4.- Efecto citotóxico de la combinación de taxol con carbacol

Teniendo en cuenta que al combinar dosis adecuadas de Tx y CARB podría mejorarse la eficacia citotóxica contra células tumorales y disminuir los efectos adversos de la droga antineoplásica, estudiamos el efecto del agregado de dosis crecientes de Tx en ausencia o en presencia de una concentración $10^{-7}M$ de CARB. Observamos que el antineoplásico ejerce un efecto inhibitorio de la proliferación, dosis dependiente, que se potencia en presencia de CARB tanto en células LM2 como en LM3 (Fig. 31).

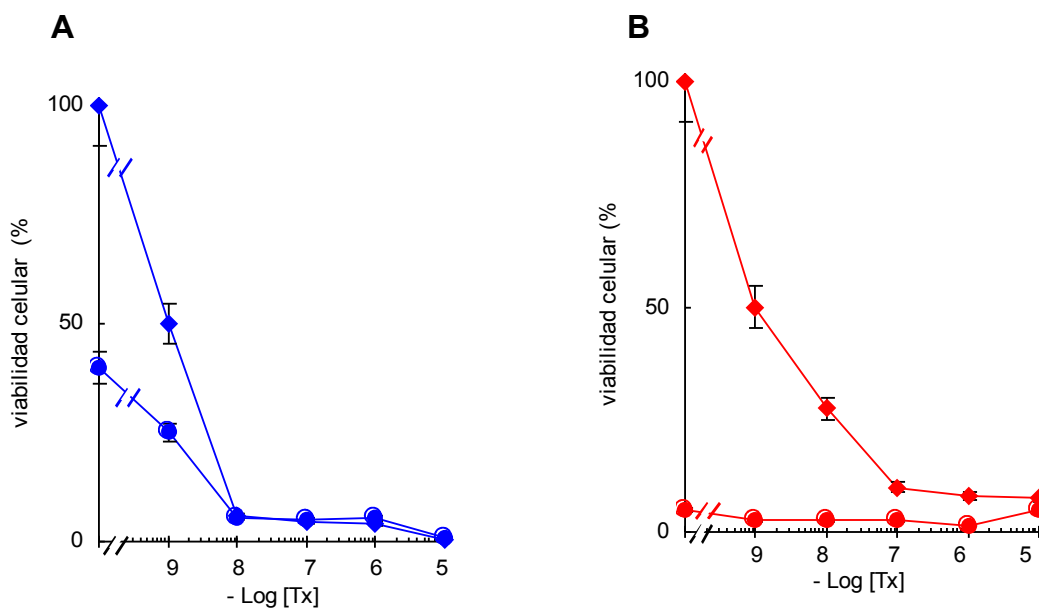


Figura 31: Curvas concentración respuesta de Tx sobre la viabilidad celular de las líneas LM2 (A) y LM3 (B) en presencia (●) y ausencia de CARB (◆). Los puntos graficados representan los valores promedio \pm E.S. de cuatro experimentos realizados por duplicado.

5.5.- Apoptosis inducida por la combinación de taxol con carbacol

Puesto que el efecto inhibitorio de la proliferación celular de diversas drogas puede producirse a expensas de un incremento en el número de células necróticas o apoptóticas, investigamos estos efectos por medio de la técnica de TUNEL modificada y de la tinción con naranja de acridina. Observamos que el Tx y el CARB, en las concentraciones estudiadas producen un incremento tanto de la necrosis como de la apoptosis de células LM2 y LM3 con respecto al basal (células sin tratamiento) (Fig. 32).

El agregado de una combinación de ambas drogas (Tx 10^{-9} M y 10^{-6} M; CARB 10^{-7} M) potencia la citotoxicidad a expensas de un aumento en la apoptosis de las células de ambas líneas (Fig. 32).

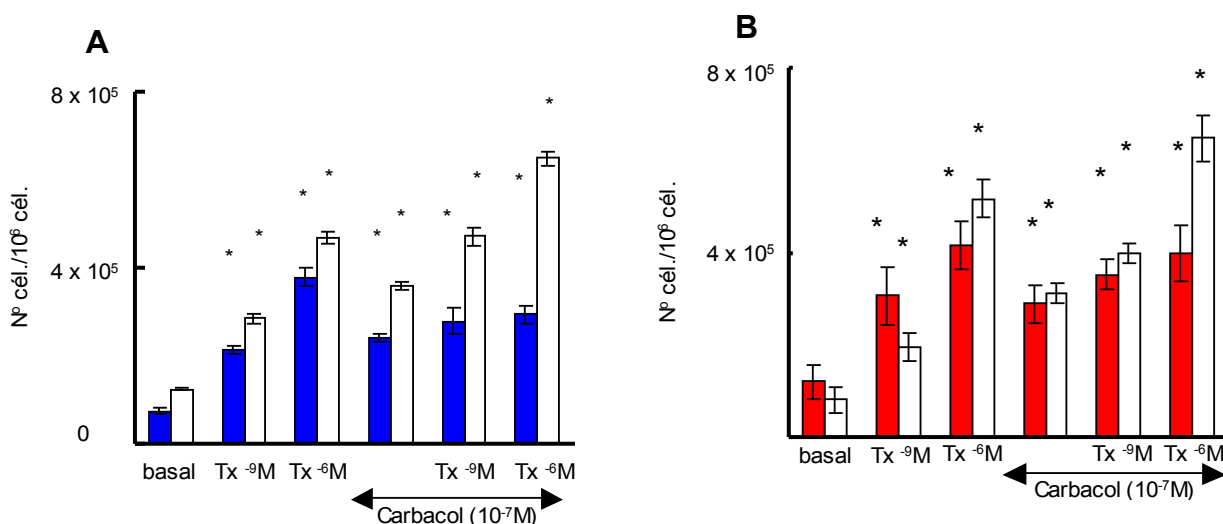


Figura 32: Efecto del Tx y CARB en la necrosis (■) y apoptosis (□) de células LM2 (A) y LM3 (B) valorado por la técnica de TUNEL. Los valores graficados representan los promedios \pm E.S. de 3 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0,05$ respecto del basal.

1.- Expresión y función de los receptores colinérgicos muscarínicos en células de adenocarcinomas mamarios murinos

Los RCM juegan un papel crucial mediando las acciones metabotrópicas de la acetilcolina. Es conocido que los 5 subtipos de RCM (M_1 - M_5) coexisten en la mayoría de los tejidos y células y a causa de esta heterogeneidad se pueden regular funciones fisiológicas disímiles como la motilidad del músculo liso, la neurotransmisión y la contractilidad cardíaca.

Al estudiar la expresión y función de los RCM en líneas celulares se encontraron resultados contradictorios. Estos receptores generalmente, no se expresan constitutivamente en líneas normales, por lo que usualmente se recurre a su transfección. Así Nicke y col. (1999) al inducir la expresión de receptores M_3 en fibroblastos murinos NIH3T3, demostraron que al activarlo se puede estimular o inhibir la proliferación de estas células según se encuentren quiescentes o en crecimiento exponencial respectivamente.

Spoonster y col. (1997) evidenciaron que la activación del receptor M_5 , transfectado establemente en células CHO con CARB, revertía el fenotipo maligno de estas células con capacidad de diseminarse, hacia un fenotipo fibroblástico no invasivo.

Estudios previos utilizando ensayos de unión con radioligandos, han reportado la presencia de RCM en diversos tipos de células transformadas

(melanoma, cáncer de colon, adenocarcinomas, etc.) y la ausencia de RCM en las células normales de la misma estirpe (Sailer 2000; Ukegawa 2003; Williams 2003).

Nuestros resultados de ensayos de unión específica con el antagonista muscarínico [³H]-QNB indican que las células de ambas líneas tumorales, LM2 y LM3, expresan constitutivamente una población homogénea de RCM, mientras que los mismos no son detectables en las células normales derivadas de epitelio mamario murino, NMuMG. El análisis de los resultados de los ensayos de saturación con [³H]-QNB demuestran que las células LM3 expresan un número máximo de sitios receptores 4,5 veces mayor que las células LM2.

Por otra parte los resultados de los ensayos de desplazamiento de la unión del radioligando con antagonistas muscarínicos selectivos y no selectivos, indican un orden de potencia que se corresponde con una expresión mayoritaria del subtipo M₂ en ambas líneas celulares. Por ensayos de Western blot con anticuerpos específicos contra los receptores M₁-M₅, confirmamos los resultados precedentes, ya que el análisis densitométrico de las bandas proteicas, muestra una mayor intensidad de las mismas en células LM3 que en LM2 y un orden de expresión: M₂>M₄>M₃>M₁>>M₅ para ambos tipos celulares. La inmunodetección de RCM en lisados celulares de NMuMG indica una débil expresión de receptores M₃ y M₂.

Luego investigamos la funcionalidad y la respuesta biológica de los RCM en presencia del agonista muscarínico CARB en las líneas tumorales. Observamos

que el tratamiento con el agonista durante 15 minutos es capaz de estimular la proliferación in vitro de células LM3 y LM2 en forma concentración dependiente, con un efecto máximo a la concentración 10^{-7} M. Las células NMuMG no respondieron al agonista en ninguna de las concentraciones utilizadas indicando que los receptores detectados podrían estar desacoplados de sus efectores.

En las células LM3 el efecto proliferativo del agonista se produce por activación del subtipo M_3 , que induce un aumento de la síntesis de IP_3 por PLC con incremento del Ca^{2+} intracelular y activación de PKC. De manera análoga el tratamiento con CARB de la línea de cáncer de colon T84, que expresa constitutivamente el subtipo M_3 , promueve su crecimiento y dicho efecto es bloqueado por el antagonista selectivo de dicho receptor, 4-DAMP (Ukegawa 2003). Quigley y col. (1998) demostraron que la activación con CARB del receptor M_3 , en distintas líneas celulares de carcinoma de pulmón (SCLC, SCC-9 y NCI-H345) promueve la activación de PKC, regulando la expresión de integrinas β_1 y la adhesión de dichas células a las proteínas de la matriz extracelular. También diversas líneas celulares humanas de cáncer gástrico (MKN-1, 5, 28, 74 y TMK-1) que expresan el receptor M_3 funcional, responden al CARB con incremento de los niveles de Ca^{2+} y activación de PKC (Frucht 1999).

En células LM3 el efecto proliferativo del agonista depende también de la participación de MAPK y MAPKK como se demuestra al revertirlo con los inhibidores específicos SB 203580 y PD098.059 respectivamente. Kodaira y col.

(1999) describen la activación de MAPK al estimular con CARB el receptor M₃ en células humanas de cáncer gástrico. No podemos descartar la transactivación por CARB de receptores de factores de crecimiento con actividad de TK, puesto que el efecto proliferativo se bloquea con TIR, un inhibidor selectivo de las quinasas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Resultados análogos se observaron en células T84, en las que el inhibidor de TK, AG 1478, selectivo para el receptor de EGF, revierte el efecto promotor de la proliferación del CARB sobre dichas células (Ukegawa 2003).

Por otra parte observamos que el agregado de CARB estimuló la transformación de arginina a citrulina en las células tumorales, siendo mayor el efecto en células LM3 que en LM2 probablemente porque las primeras expresan un mayor número de RCM que las segundas. Ha sido ampliamente documentado que la acumulación de citrulina puede provenir de la metabolización de arginina vía NOS y/o de la enzima arginasa (Moncada 1993; Wu G. 1998). Demostramos que el CARB estimula receptores M₃ promoviendo la activación de NOS1, única isoforma expresada en LM3, con liberación de NO, que también induce la proliferación de células LM3.

La producción de NO puede modular varias etapas de la progresión tumoral como el crecimiento, la migración y la angiogénesis (Wink 1998; Davel 2002). La concentración de NO juega un papel muy importante para determinar el fenotipo y comportamiento biológico de una célula maligna (Lala 1998; Davel 2002; Colasanti 2000). En la década del '90 numerosos autores asociaban el proceso de

malignización con la expresión de NOS2, pero posteriormente se demostró que no sólo NOS2 está presente en los tumores sino también las isoformas calcio dependientes como NOS1 y NOS3 (Wink 1998; Jadeski 2000). NOS2 está involucrada en la estimulación de la migración de células tumorales, invasividad y angiogénesis, mientras que NOS1 se expresa en células metastásicas de melanoma, apoyando la idea de que las isoformas constitutivas pueden estar actuando en la malignidad (Ahmed 1999). Este puede ser el caso de las células de la línea LM3, capaces de metastatizar espontáneamente en pulmón, que expresan constitutivamente NOS1 y que producen relativamente bajos niveles de NO que promueven su proliferación (Urtreger 1997).

Se han descrito distintas estrategias de proliferación que utilizan las células de carcinomas mamarios humanos. Por ejemplo, células MDA-MB-468, que producen bajos niveles de NO, proliferan utilizando arginina para sintetizar poliaminas vía arginasa (Singh 2000). Este podría ser el caso de las células LM2 que expresan la enzima NOS3, producen niveles escasamente detectables de NO y expresan la isoforma II de arginasa. El CARB estimula la proliferación a través de la activación de receptores M_2 que están acoplados a la enzima arginasa II, la que produce ornitina (sustrato en la síntesis de poliaminas necesarias en la proliferación celular) (Español 2002).

Existen diversos antecedentes que vinculan la sobreexpresión y función de COX-2 con la capacidad proliferativa de células malignas de adenocarcinoma esofágico, cáncer de pulmón y glioblastoma (Buskens 2003; Yang 2004; Kardosh

2004). Los autores le asignan a COX-2 un papel importante en el proceso inflamatorio que conduce a la malignización, en consecuencia también le atribuyen a los antiinflamatorios no esteroideos, inhibidores selectivos de dicha enzima, la capacidad de ejercer un efecto antitumoral. Por inmunodetección demostramos la sobreexpresión de COX-2 sólo en células LM2, las que producen muy altos niveles de PGE₂ al estimularlas con CARB. En las células LM2 el efecto proliferativo del CARB está mediado por receptores M₂ y se inhibe por INDO y NS-398, lo que indica la participación de ambas isoformas de COX en dicho efecto. Wu T. y col. (2002) evidenciaron que tanto PLA₂ de 85 kDa como COX-2 están involucradas en la proliferación de células de coriangiocarcinoma humano y Hansen-Petrik y col. (2002) documentaron que la PGE₂ puede ejercer acciones protumorigénicas a través de receptores EP1/EP3 que promueven la movilización de Ca²⁺ intracelular.

También observamos que las células LM2 proliferan por estimulación de receptores M₁, a través de la síntesis de poliaminas vía arginasas. Es probable que exista un mecanismo de “cross talk” entre COX y arginasas puesto que el efecto estimulante del CARB sobre la actividad de arginasa II en LM2, es bloqueado por la preincubación con INDO, indicando que la PGE₂ derivada de COX modularía positivamente la actividad de arginasa en estas células. Corraliza y Moncada (2002) han sido los únicos que describieron que macrófagos sinoviales de pacientes con artritis expresan arginasa II, cuya actividad es estimulada por PGE₂.

Cabe destacar que el efecto proliferativo del CARB sobre las células LM2 es también dependiente de la activación de TK, particularmente de MAPKK. En este sentido, Li y col. (2003) describen que la activación muscarínica de células de neuroblastoma SH-SY5Y, incrementa la expresión de Bcl-2 protegiendo a dichas células de la apoptosis. Este efecto se revierte por el pretratamiento de las células con el inhibidor de MAPKK, PD98059.

Podemos concluir que las células tumorales estudiadas pueden proliferar por estimulación muscarínica a través de diferentes mecanismos que involucran distintas señales intracelulares de acuerdo con el subtipo de receptor activado. Las células LM3 responden al CARB por estimulación del receptor M_3 , que incrementa la producción de IP_3 y NO. Las células LM2 en presencia de CARB, por activación de los receptores M_2 y M_1 incrementan la liberación de PGE_2 que a su vez regula la actividad de arginasa estimulando la síntesis de poliaminas necesarias para la proliferación celular.

2.- Angiogénesis tumoral: participación de los receptores colinérgicos muscarínicos

La angiogénesis constituye en la actualidad uno de los temas de investigación científica más relevante pues se la vincula con procesos fisiológicos como la ovulación y la gestación y patológicos como la retinopatía diabética, la aterosclerosis y el cáncer. La formación de la vasculatura tumoral es una reacción esencial del medio ambiente neoplásico y usualmente se asocia a la progresión y al desarrollo tumoral. Berges y col. (2003) describieron el fenómeno de “switch” angiogénico, que es un paso discreto que puede ocurrir en cualquier estadio de la progresión tumoral y depende del tipo de tumor y su microambiente. En particular lo que diferencia a la angiogénesis fisiológica (que está muy regulada) de la tumoral es la presencia de una estructura vascular aberrante, alteraciones en las interacciones entre pericitos y células endoteliales, flujo sanguíneo anormal, aumento de la permeabilidad y retardo en la maduración de los vasos. Estas anomalías de la vasculatura tumoral se deben a cambios en la expresión genética de citoquinas angiogénicas e inhibidores de la angiogénesis, llevando a un desbalance entre señales pro y antiangiogénicas que conduce a una angiogénesis sostenida.

Hemos demostrado que las células LM2 y LM3 son capaces de inducir respuesta angiogénica positiva por mecanismos distintos (Davel 2004). Mientras las primeras lo hacen fundamentalmente a través de la producción de PGE₂, y de productos metabólicos de arginasa necesarios para la proliferación de células

endoteliales, las segundas lo hacen, produciendo NO vía NOS1. Estas diferencias se deben a que a pesar de que ambas líneas celulares derivan de adenocarcinomas mamarios murinos, son genotípicamente distintas y por lo tanto expresan diferencialmente las enzimas involucradas en la neovascularización tumoral.

Recientemente, Kurzen (2004) describió que el sistema colinérgico, a través de la producción extraneuronal de acetilcolina en la piel se encontraría involucrado en la regulación de funciones fisiológicas como la diferenciación de queratinocitos, la formación sebácea, la circulación sanguínea, la angiogénesis relacionada con la psoriasis, etc. Nuestros resultados demuestran la relación existente entre la función del sistema colinérgico y la angiogénesis tumoral. Tanto en células LM2 como LM3, el agonista CARB estimula la angiogenicidad de estas células tumorales fundamentalmente por activación de receptores M_1 y M_2 . Sólo en las células LM3 se observa una contribución de los receptores M_3 en la respuesta inducida por el agonista.

Varios autores han evidenciado que las prostaglandinas derivadas de COX-2 contribuyen al crecimiento tumoral, al inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos que sustentarían la viabilidad y crecimiento de las células malignas en tumores gástricos, de piel y de mama (Uefuji 2000; Higashi 2000; Subbaramaiah 1996). Cabe destacar que las células LM2 expresan altos niveles de COX-1 y COX-2 mientras que las células LM3 sobreexpresan la isoforma COX-1. En las células LM2 la activación de receptores M_2 por CARB estimula la producción de

PGE₂ derivada de COX-2 y conjuntamente la producción de VEGF. En concordancia con nuestros resultados, Cheng y col. (2004) muestran una correlación entre la expresión de COX-2 y VEGF en el carcinoma hepatocelular, que se produce como consecuencia de la adquisición del virus de hepatitis B. Asimismo detectan un aumento en la expresión de CD34 por inmunohistoquímica, como medida de la densidad de microvasos en el estroma tumoral. Es importante destacar, que describimos por primera vez la modulación parasimpática de la expresión de VEGF en células tumorales, detectando una isoforma de dicho factor de 80 kDa. Duff y col. (2003) describen una isoforma de este peso molecular además de la clásica de 40-45 kDa, correspondiente a la isoforma VEGF-C en el suero humano de pacientes con cáncer colorrectal.

Dentro del paradigma de múltiples pasos en la progresión tumoral, casi todos los estadios parecen estar influenciados por la expresión de las distintas isoformas de NOS así como por los niveles de NO (Lala 1998). Resultados previos de nuestro laboratorio indican que el tratamiento de animales con L-NAME en el agua de bebida, pueden retardar el crecimiento del tumor mamario murino S13 (Davel 2002). En las células LM3, el NO derivado de NOS1, que promueve la proliferación celular inducida por el agonista, está también involucrado en la respuesta angiogénica inducida por el mismo; lo que evidencia la importancia de la vía de señalización PLC-Ca²⁺-NOS acoplada al receptor M₃.

Es importante tener en cuenta que la PGE₂ derivada de COX-1, participa en la angiogénesis inducida por las células LM3. Estos resultados indican que es

necesario reconsiderar el papel de la COX-1 en la angiogénesis tumoral. Únicamente, Sales y col. (2002) indicaron que la sobreexpresión de COX-1 en células Hela, está asociada con la sobreexpresión de receptores EP y al inicio de la producción de factores angiogénicos que al actuar de manera autócrina o parácrina, podrían potenciar y sostener la tumorigénesis en distintos tipos de neoplasias.

En los últimos años, ha adquirido relevancia en distintos procesos fisiológicos y patológicos, el metabolismo de la arginina por la enzima arginasa. En nuestro laboratorio se ha demostrado que los macrófagos peritoneales de animales portadores del tumor mamario murino LMM3 pueden regular positivamente el crecimiento tumoral, potenciando la angiogénesis, al proveer precursores de poliaminas, vía arginasa, a las células tumorales y/o endoteliales (Davel 2002). Además, estudios de diferentes líneas celulares de adenocarcinomas humanos evidencian una correlación positiva entre la expresión y actividad de arginasas y la proliferación de dichas células (Singh 2000). Aún cuando recientemente demostramos que la angiogénesis inducida por células LM3 y LM2 disminuye por el tratamiento con NOHA (Davel 2004) el efecto proangiogénico del CARB producido por activación de receptores M_1 y M_2 se revierte con dicho inhibidor sólo en células LM2, que expresan la isoforma II de esta enzima. Es importante tener en cuenta que en las células LM2 la arginina se metaboliza principalmente vía arginasa porque las mismas producen niveles casi indetectables de NO vía NOS3, enzima que utiliza el mismo sustrato.

Por otra parte, ha sido documentado que existen interacciones entre la producción de NO y la de VEGF, tales que la inhibición de los niveles de uno induce la disminución de los niveles del otro. En este sentido Papapetropoulos y col. (1997) y Shizukuda y col. (1999) encontraron que el agregado de inhibidores de NOS a células de vena umbilical humana, producía una inhibición de la proliferación celular inducida por el tratamiento con VEGF. Kroll y Waltenberger (1998) reportaron que la NOS puede mediar la angiogénesis inducida por VEGF-A que es la isoforma que clásicamente se relaciona con formación de vasos sanguíneos. Esto último podría estar ocurriendo en las células de la línea LM3 en las que observamos que el agregado de CARB induce un aumento de los niveles de VEGF y de la angiogénesis, que se revierte por la preincubación de las células con L-NMMA.

En conclusión en células LM2 el efecto proangiogénico del CARB estaría mediado por la activación de los receptores M_1 y M_2 , con participación de arginasa II, COX-1 y 2. Mientras que en LM3 el agonista activaría receptores M_3 que estimularían la producción de NO por NOS1 produciendo la neovascularización. El agonista estimula también los niveles de VEGF tanto en células LM2 como LM3.

3.- Crecimiento tumoral mediado por la activación de los receptores colinérgicos muscarínicos

Aún cuando numerosos resultados de otros autores y de nuestro laboratorio evidencian que la activación de los RCM por agonistas colinérgicos promueve la proliferación de células tumorales in vitro, no existen antecedentes de ensayos con agonistas de receptores para neurotransmisores con el objeto de estudiar el crecimiento de tumores in vivo (Quigley 1998; Nicke 1999; Ukegawa 2003; Español 2004). En cambio se han documentado efectos de neurohormonas y neuropéptidos como moduladores del crecimiento tumoral, produciendo distintos efectos. Así por ejemplo, Halmos y col. (2002) y Plonowski y col. (2002a) observaron que el factor liberador de la hormona de crecimiento (GHRH) estimula el crecimiento de cáncer de próstata humana al activar una variante de procesamiento alternativo del receptor para GHRH en osteosarcomas y sarcomas de Ewing.

Por otra parte se ha descrito la expresión de distintos subtipos de receptores para neuropéptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) en tumores endócrinos de intestino, cuya activación controla la hipersecreción hormonal y el crecimiento tumoral (De Herder 1996).

Por el contrario, se han reportado resultados que demuestran que algunos neuropéptidos pueden inhibir el crecimiento tumoral. Limonta y col. (2003) demostraron que la forma 1 del factor liberador de gonadotrofinas (GnRH-1) puede

unirse y activar un receptor de 7 dominios transmembrana en tumores del tracto reproductor (próstata, mama, ovario y endometrio) inhibiendo la proliferación celular al interferir la actividad mitogénica de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento insulínico (IGF), etc. También se ha observado que inhibe la migración e invasión de células tumorales por modificaciones de la expresión de moléculas de adhesión.

Algunos trabajos evidencian la posibilidad de utilizar los niveles de neuropéptidos o la expresión de sus receptores como marcadores de diagnóstico en pacientes oncológicos. Así, por ejemplo, se ha documentado que los niveles del péptido vasoactivador de la adenilil ciclasa (PACAP) se encuentran aumentados en pacientes con cáncer de mama (García-Fernández 2004).

Por otra parte, la sobreexpresión de receptores de somatostatina es característica en pacientes con tumores intestinales (De Herder 1996). En este sentido hemos demostrado una sobreexpresión significativa de RCM en células de adenocarcinomas mamarios murinos en comparación con células normales de la misma estirpe. La funcionalidad de estos receptores y su participación en el crecimiento tumoral se comprueba porque la activación de los mismos con el agonista aumenta significativamente el diámetro tumoral. En células LM2 el efecto del agonista está mediado por la activación de receptores M_1 y M_3 mientras que en células LM3 el crecimiento tumoral CARB dependiente, se bloquea totalmente sólo con el antagonista M_3 .

Además resultados preliminares de nuestro laboratorio indican sobreexpresión de RCM en muestras de tejido tumoral de mama humana en comparación con el tejido normal (datos no mostrados). Estos antecedentes permitirían asignarle un valor diagnóstico a la expresión muscarínica en tumores de mama y una función promotora del crecimiento tumoral. Precisamente en esta función están involucrados productos de enzimas transductoras de la señalización muscarínica como COX y PLC. Con respecto a la primera Hansen-Petrik y col. (2002) entre otros autores, observaron que la PGE₂ derivada de COX promueve el crecimiento de tumores intestinales murinos. Si bien durante mucho tiempo distintos autores asociaban el aumento en la expresión y función de COX-2 con el proceso de malignización en cáncer de esófago, estómago, colon, etc. como sucede en las células LM2 (Buskens 2003; Williams 1997; Kawamori 1998). Además, nosotros demostramos que la PGE₂ derivada de la isoforma COX-1 promueve la angiogénesis inducida por células LM3, revalorizando el papel de esta isoforma en una etapa fundamental de la tumorigénesis (Davel 2004).

Yoshida y col. (2004) trataron ratones portadores de células tumorales humanas A431 en forma intraperitoneal con amilodipina, bloqueante de los canales de calcio que impide la activación de formas de PLC dependientes de este ión y observaron reducción del crecimiento tumoral. Nosotros demostramos la participación de productos de activación de PLC en el crecimiento del tumor LM3, pues el estímulo del agonista es revertido por el inhibidor enzimático específico NCDC.

Concluimos que el crecimiento tumoral se potencia por activación parasimpática. En el tumor LM2 el agonista promueve la síntesis de PGE₂ derivada de COX-2 por activación de receptores M₁, mientras que en el tumor LM3 el efecto parasimpático se debe a un aumento de los niveles de NO producido por NOS1 y de productos de PLC vía M₃.

4.- Efectos antitumorales del carbacol

Nuestros resultados indican que el tratamiento de las células LM2 y LM3 con CARB en la misma dosis (10^{-7} M) que estimula la proliferación celular, la angiogénesis y el crecimiento tumoral, pero por intervalos de tiempo mayores (hasta 24 hs) inhibe (alrededor del 25%) la proliferación de células tumorales en forma tiempo dependiente, con un efecto máximo semejante para ambas líneas celulares. De manera análoga Williams (2003) describe que el tratamiento con CARB de células de la línea SCC-9 (derivada de un carcinoma de células pequeñas de pulmón), al activar receptores del subtipo M_3 , produce una inhibición de la incorporación de [3 H]-timidina, luego de 4 hs de incubación con el agonista, así como también un aumento de la adhesión célula-célula que inhibiría la capacidad metastásica de las mismas. Por su parte Shafer y col. (2004) demuestran que la activación con CARB, de células CHO normales, transfectadas con el receptor M_3 , inhibe la proliferación celular con participación de PLC y PKC.

Hemos demostrado que este efecto antiproliferativo del agonista se traduce en un aumento significativo del número de células necróticas y apoptóticas. Existen evidencias contradictorias en relación con la activación muscarínica y la apoptosis. Así resultados recientes indican que al estimular células CHO transfectadas con receptores M_1 , M_2 y M_3 se protege a las mismas de la apoptosis inducida por etopósido (Budd 2003). También células de neuroblastoma humano, SH-SY5Y, que expresan constitutivamente RCM al ser estimuladas con el

agonista colinérgico oxotremorina resisten la apoptosis mediada por caspasa 3 (De Sarno 2003). Es importante tener en cuenta que en los trabajos anteriores los agonistas fueron agregados por períodos no mayores de 30 min, tiempo de incubación utilizado por nosotros para estimular la proliferación de células tumorales. En cambio otros autores han reportado que la activación de RCM con CARB promueve la apoptosis de células SH-SY5Y por aumento de la expresión de Bcl-2 a través de la vía de señalización Ras-ERK 1/2 (Li 2003).

Nosotros demostramos que el CARB estimula la apoptosis en las células tumorales estudiadas. Así en células LM2 el efecto del agonista se debería mayoritariamente a la activación de los subtipos M_1 y M_3 de manera análoga a lo observado en los ensayos de crecimiento tumoral. En las células LM3, la activación del receptor M_2 por CARB media tanto el crecimiento in vivo (a tiempos cortos de tratamiento) como el efecto apoptótico (a tiempos largos de tratamiento).

Los taxanos son parte de un importante grupo de drogas antitumorales que estabilizan los microtúbulos. Los mismos están compuestos por polímeros de tubulina en equilibrio dinámico con heterodímeros de tubulina formados por subunidades alfa y beta. Su principal función es la formación del huso mitótico durante la división celular aunque también están relacionados con la motilidad, transducción de señales y transporte intracelular (Rowinsky 1990; Dustin 1980; Crossin 1981). A diferencia de otras drogas antitumorales que también actúan sobre los microtúbulos despolimerizándolos, el Tx promueve la polimerización sostenida de la tubulina (Jordan 1993). Esto inhibe la proliferación celular,

produciendo un incremento de la apoptosis en forma concentración dependiente (Torres 1998). Nosotros investigamos este efecto en las células LM2 y LM3 incubándolas con concentraciones clínicas y subclínicas de Tx (10^{-6} M y 10^{-9} M) y observamos un incremento tanto en la necrosis como en la apoptosis celular.

Por otra parte describimos la interacción de Tx con RCM en células LM3 y LM2. El tratamiento de las células con concentraciones crecientes Tx induce un desplazamiento de la unión del radioligando a los RCM en las células tumorales. Teniendo en cuenta que el efecto proapoptótico de Tx no se revirtió por el pretratamiento de las células con AT (datos no mostrados) es probable que este efecto sea comparable al observado por Fakamauchi y col. (1991) que trabajando en cultivos de células cerebelares, encontraron que el agregado de Tx produce una disminución del transporte de los receptores a los lisosomas para su reciclado, lo que se refleja en una disminución del número de RCM expuestos en la membrana plasmática y en consecuencia en una disminución del número de sitios de unión para el radioligando [3 H]-QNB.

Los efectos polimerizadores del Tx sobre la tubulina han sido ampliamente aprovechados a fin de inducir la citotoxicidad de las células del tejido tumoral. Teniendo en cuenta que la quimioterapia antineoplásica tradicional, basada en la administración de la dosis máxima tolerada, requiere interrupciones prolongadas del tratamiento, para paliar los efectos adversos de los citostáticos y que no es absolutamente exitoso para lograr el restablecimiento total de pacientes con cáncer o el tratamiento de metástasis, se han ensayado otras estrategias de

tratamiento. Una de ellas es la utilización de dosis metronómicas de fármacos, dosis pequeñas con intervalos cortos (diarios o semanales) por períodos prolongados. Nosotros observamos que dosis subclínicas de Tx (10^{-9} M) son eficaces para producir citotoxicidad en células tumorales y que lo mismo sucede con la combinación de Tx con CARB in vitro, observándose un aumento significativo de la apoptosis de células LM2 y LM3. Un beneficio adicional de este tipo de tratamiento podría observarse in vivo, puesto que ha sido reportado un efecto antiangiogénico, con apoptosis de células endoteliales humanas en un rango de dosis 0,1-100 μ M de Tx, que se potenciaría utilizándola con fármacos antiangiogénicos, como anticuerpos contra VEGFR-2 (Kerbel y Kamen 2004).

Conclusiones

- El SNAP modula el comportamiento biológico de células derivadas de adenocarcinomas mamarios murinos LM2 y LM3 que sobreexpresan RCM produciendo efectos distintos según el tiempo de tratamiento de las células tumorales.

Con tiempos cortos de tratamiento (Fig. 33)

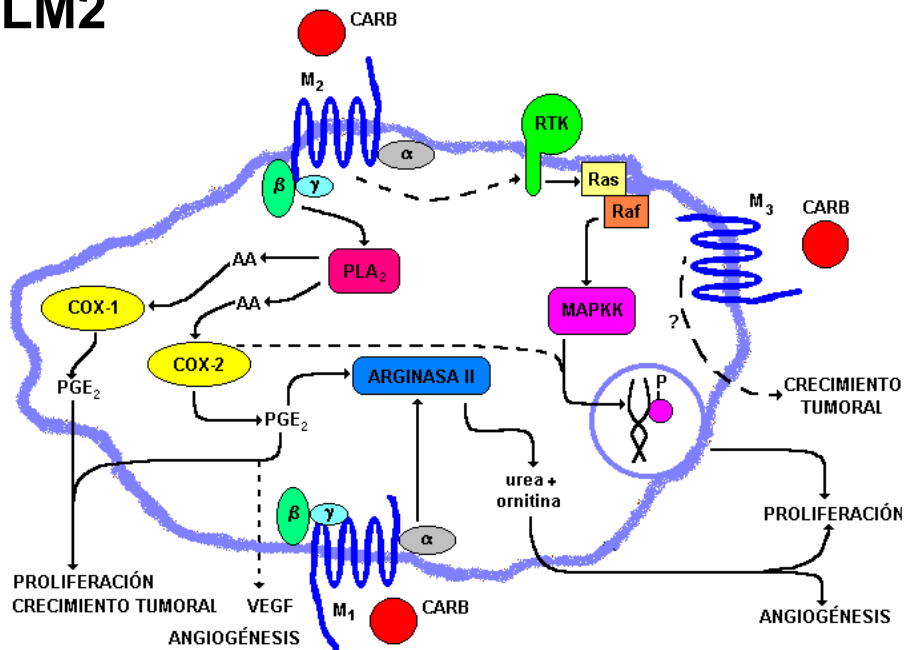
- El agonista muscarínico CARB estimula la proliferación de células LM3 por activación de receptores M_3 con incremento de los niveles de IP_3 y NO; y también de células LM2 por estimulación de receptores M_1 y M_2 que promueven un aumento en la liberación de PGE_2 y precursores de poliaminas. Asimismo las quinasas activadas por mitógenos parecen estar involucradas en las señales proliferativas del agonista.
- El CARB potencia la respuesta angiogénica in vivo inducida por células LM3 y LM2. En las primeras lo hace fundamentalmente a través de la producción de NO derivado de NOS1, por activación de los receptores M_1 y M_3 ; mientras que en las células LM2 la activación de receptores M_1 y M_2 median el efecto estimulante del CARB debido a un aumento en la producción de PGE_2 vía COX-2 y de productos de arginasa.

- El agonista colinérgico promueve el crecimiento de los tumores LM3 y LM2. En LM3 el efecto del agonista sólo se revierte totalmente por bloqueo de receptores M_3 con participación de productos de PLC y NOS1. El crecimiento del tumor LM2 depende de la producción de PGE_2 derivada de COX-2 vía receptores M_1 .

Con tiempos largos de tratamiento

- El CARB promueve la citotoxicidad de células tumorales a expensas de un incremento en la necrosis y apoptosis celular en forma análoga al Tx, droga antineoplásica de primera elección en el tratamiento del cáncer de mama.
- El efecto proapoptótico del CARB en las células LM3 se reduce totalmente por bloqueo de receptores M_2 , mientras que en las células LM2 parece depender de los receptores M_1 y M_3 .
- La asociación de Tx y CARB potencia el efecto apoptótico del agonista.

LM2



LM3

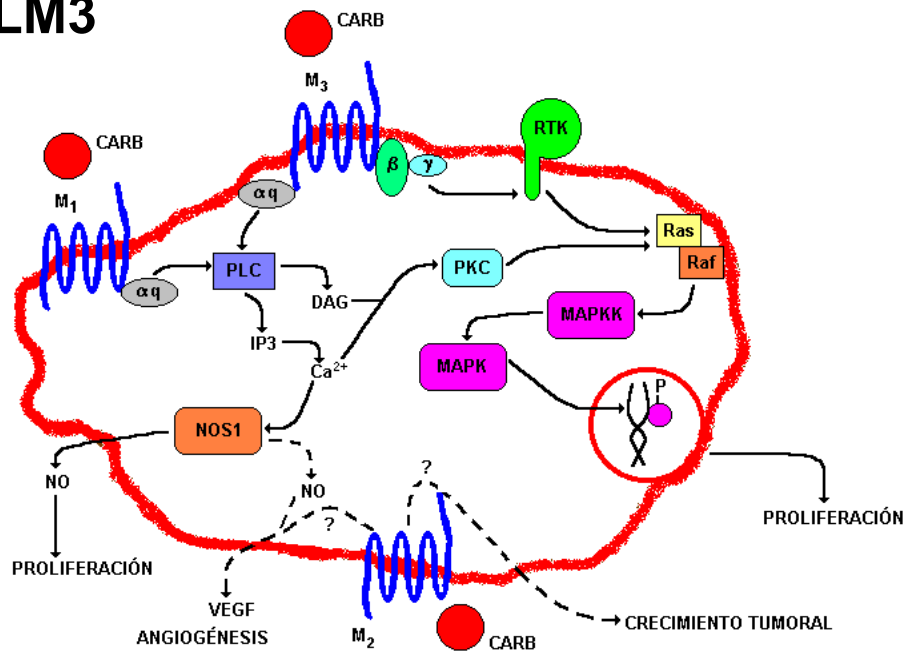


Figura 33: CARB (carbacol); M (receptor muscarínico); α , β , γ (subunidades de la proteína G), RTK (tirosinas quinasas asociadas a receptor); MAPKK (quinasa de la proteína quinasa activada por mitógenos), MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos); PLA₂ (fosfolipasa A₂); AA (ácido araquidónico); COX (ciclooxigenasa), PGE₂ (prostaglandina E₂); VEGF (factor de crecimiento de endotelio vascular); PLC (fosfolipasa C); DAG (diacilglicerol); IP₃ (inositol trifosfato); Ca²⁺ (calcio); NOS1 (óxido nítrico sintasa 1); NO (óxido nítrico).

- Ahmed B and Van Den Oord J. (1999). "Expression of the neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS) and its inhibitor, protein inhibitor of nNOS, in pigment cell lesions of the skin". *Br J Dermatol.* 141: 12-19.
- Allegra C, Hoang K, Chao Yeh G, Drake J and Baram J. (1987). "Evidence for direct inhibition of de novo purine synthesis in human MCF-7 breast cells as a principal mode of metabolic inhibition by methotrexate". *J Biol Chem.* 262: 13520-13526.
- Appenzeller O and Orise E. (1997). "The autonomic nervous system: an introduction to basic and clinical concepts." 5th ed. Elsevier New York. Health Science. Cap 1. Pp 20-25.
- Auerbach R, Kubai L and Sidky Y. (1976). "Angiogenesis induction by tumor, embryonic tissue and lymphocytes". *Cancer Res.* 36:3435-3440.
- Augustin H. (1998). "Antiangiogenic tumour therapy: will it work?". *TIPS.* 19: 216-222.
- Bennett M, Evan G and Schwartz S. (1995). "Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques". *J Clin Invest.* 95: 2266-2274.

- Berges G, Benjamín L. (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch". *Nature Cancer Rev.* 3: 401-410.
- Bernabo J y Kazanietz M. (1999). "Farmacología Molecular". Cap. 20. Pp 347-350.
- Bonfil R and Scharovsky O. (1998). "Bases de oncología molecular". Ed Dunken. Cap: Apoptosis vs. Inmortalidad celular. Pp 197-200.
- Bonner TI. (1989). "The molecular basis of muscarinic receptor diversity". *Trends Neurosci.* 12(4):148-151.
- Bredt DS and Snyder SH. (1989). "Nitric oxide mediates glutamate linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum". *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9030-9033.
- Budd D, McDonald J, Emsley N, Cain K and Tobin A. (2003). "The C-terminal tail of the M3-muscarinic receptor possesses anti-apoptotic properties". *J Biol Chem.* 278: 19565-19573.

- Buskens C, Ristimaki A, Offerhaus G, Richel D and Van Laschott J. (2003). "Role of cyclooxygenase-2 in the development and treatment of oesophageal adenocarcinoma". *Scand J Gastroenterol Suppl.* 239: 87-93.
- Caulfield M y Birdsall N. (1998). "International union of pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors". *Pharmacol Rev.* 50: 279-290.
- Cheng A, Chan H, To K, Leung W, Chan K, Liew C and Sung J. (2004). "Cyclooxygenase-2 pathway correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma". *Int J Oncol.* 24: 853-860.
- Cheng Jie-Guang and Horwitz S. (2002). "Differential mitotic responses to microtubule-stabilizing and -destabilizing drugs". *Cancer Res.* 62:1935-1938.
- Colasanti M and Suzuki H. (2000). "The dual personality of NO". *Trends Pharmacol Sci.* 21:249-252.
- Corraliza I and Moncada S. (2002). "Increased expression of arginase II in patients with different forms of arthritis. Implications of the regulation of nitric oxide". *Rheumatol.* 29: 2261-2265.

- Crossin K and carney D. (1981). "Microtubule stabilization to taxol inhibits initiation of DNA synthesis by thrombin and by epidermal growth factor". *Cell Biol.* 27: 341-350.
- Cuello Carrión D and Ciocca D. (1999). "Improved detection of apoptotic cells using a modified in situ TUNEL technique". *J Histochem Cytochem* 47:837-839.
- Davel L and de Lustig ES. (1993). "Cáncer y angiogénesis. La angiogénesis como terapia coadyuvante en Oncología". *Tumor.* 6:27-31.
- Davel L, Jasnias MA, de la Torre E, Gotoh T, Diamant M, Magenta G, Sacerdote de Lustig E, Sales ME. (2002). "Arginine metabolic pathways involved in the modulation of tumor-induced angiogenesis by macrophages". *FEBS Lett.* 532: 216-220.
- Davel L, Eijan AM, Sales ME, Español A, D'Agostino A, Piccardo I, Lauria L, De Lustig ES, Jasnias MA. (2002a). "Reactivity of tumor-draining lymph nodes and the nitric oxide pathway". *Int J Oncol* 20:59-67.

-
- Davel L, Rimmaudo L, Español A, de la Torre E, Jasnis M, Ribeiro M, Gotoh, T, Sacerdote de Lustig E and Sales ME. (2004). "Different mechanisms lead to the angiogenic process induced by three adenocarcinoma cell lines". *Angiogenesis*. 7:45-51.
 - De Herder W, Hofland L, Van Der Lely A and Lamberts S. (1996). "Peptide receptors in gut endocrine tumours". *Baillieres Clin Gastroenterol*. 10: 571-587.
 - De Sarno P, Shestopal S, King T, Zmijewska A and Song L. (2003). "Muscarinic receptor activation protects cells from apoptotic effects of DNA damage, oxidative stress, and mitochondrial inhibition". *J Biol Chem*. 278: 11086-11093.
 - Devouassoux-Shisheboran M, Mauduit C, Tabone E, Droz JP, Benahmed M. (2003). "Growth regulatory factors and signalling proteins in testicular germ cell tumours". *APMIS*. 111:212-224.
 - Duff S, Li C, Renehan A, O'Dwyer S and Kumar S. (2003). "Immunodetection and molecular forms of plasma vascular endothelial growth factor-C". *Int J Oncol*. 22: 339-343.
 - Dustin P. (1980). "Microtubules". *Sci Am*. 243: 66-76.

- Español A, Eijan A, Mazzoni E, Davel L, Jasniz M, Lustig E and Sales ME. (2002). "Nitric oxide synthase, arginase and cyclooxygenase are involved in muscarinic receptor activation in different murine mammary adenocarcinoma cell lines". *Int J Mol Med*. 9: 651-657.
- Español A, de la Torre E and Sales ME. (2003). "Parasympathetic modulation of local acute inflammation in murine submandibular glands". *Inflammation*. 27: 97-105.
- Español A and Sales ME. (2004). "Different muscarinic receptors are involved in the proliferation of murine mammary adenocarcinoma cell lines". *Int J Mol Med*. 13: 311-317.
- Fidler IJ. (1978). "Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis". *Cancer Res*. 38:2651-2658.
- Folkman J. (1990). "What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?". *J Natl Cancer Inst*. 82: 4-6.
- Frucht H, Jensen RT, Dexter D, Yang WL and Xiao Y. (1999). "Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor. *Clin Cancer Res* 9: 2532-2539.

- Fukamauchi F, Hough C and Chuang D. (1991). "Role of microtubule structure in the maintenance of m3-muscarinic acetylcholine receptor mRNA levels". *Mol Cell Neurosci.* 2: 123-129.
- Galli S, Colombo L, Vanzuli S, Daroqui C, Vidal M, Jasniz M, Sacerdote de Lustig E and Eiján A. (2000). "Characterization of a fibroblastoid mammary carcinoma cell line (LM2) originated from a mouse adenocarcinoma". *Int J Oncol.* 17: 1259-1265.
- García-Fernández M, Bodega G, Ruiz-Villaespesa A, Cortés J, Prieto J and Carmena M. (2004). "PACAP expression and distribution in human breast cancer and healthy tissue". *Cancer Lett.* 205: 189-195.
- Giannakakou, P., Robey, R., Fojo, T., and Blagosklonny, M. V. (2001). "Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity". *Oncogene*, 20:3806–3813.
- Gómez D y Alonso D. (1998). "Introducción a la Oncología Molecular". Cap.4. Pp: 69-83. *Biología Tumoral.* UNQ.

- Goodman G, Rall T, Nies A and Taylor P. (1998). Las bases farmacológicas de la terapéutica. Octava edición. Editorial Panamericana. Cap. 5. Pp 79-82; 89. Cap 12. Pp 1163-1169.
- Gotoh T, Sonoki A, Nagasaki K, Terada M, Takiguchi M and Mori M. (1996). "Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line". FEBS Lett. 395: 119-122.
- Granger D, Hidds J, Perfect J and Durack D. (1990). "Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages". Clin Invest. 85: 264-273.
- Granstrom E and Kindhal H. (1978). "Radioimmunoassay of Prostaglandins and Thromboxanes Research". In: Frolich, J.C. (ed) Advances in Prostaglandins. Pp,119-210. Raven Press, New York.
- Guyton A y Hall J. (1998). Tratado de fisiología médica. Editorial Interamericana. Cap.1,3 y 60.
- Haber D and Harlow E. (1997). "Tumour-supressor genes: evolving definitions in the genomic age". Nat Genet. 16: 320-322.

-
- Halmos G, Schally A, Czompoly T, Krupa M, Varga J and Rekasi Z. (2002). "Expression of growth hormone-releasing hormone and its receptor splice variants in human prostate cancer". *J Clin Endocrinol Metab.* 87: 4707-4714.
 - Hansen-Petrik M, McEntee M, Jull B, Shi H, Zemel M and Whelan J. (2002). "Prostaglandin E₂ protects intestinal tumors from nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced regression in Apc^{Min/+} mice". *Cancer Res.* 62: 403-408.
 - Higashi Y, Kanekur T, Kanzaki T. (2000). "Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cell: Evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression". *Int J Cancer.* 86: 667-671.
 - Jadeski L, Hum K, Chakraborty C and Lala P. (2000). "Nitric oxide promotes murine mammary tumour growth and metastasis by stimulating tumour cell migration, invasiveness and angiogenesis". *Int J Cancer.* 86: 30-39.
 - Jordan MA, Toso RJ, Thrower D and Wilson L. (1993). "Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations". *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 9552-9556.

- Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H and Wilson L. (1996). "Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death." *Cancer Res.* 56: 816-825.
- Kardosh A, Blumenthal M, Wang W, Chen T and Schobthal A. (2004). "Differential effects of selective COX-2 inhibitors on cell cycle regulation and proliferation of glioblastoma cell lines". *Cancer Biol Ther.* 3: 55-62.
- Kawamori T, Rao C, Seibert K and Reddy B. (1998). "Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis". *Cancer Res.* 58: 409-412.
- Kerbel R and Kamern B. (2004). "The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy". *Nat Rev Cancer.* 4: 423-436.
- Kodaira M, Kajimura M, Takeuchi K, Lin S, Hanai H and Kaneko E. (1999). "Functional muscarinic m3 receptor expressed in gastric cancer cells stimulates tyrosine phosphorylation and MAP kinase". *J Gastroenterol.* 34: 163-171.

- Kroll J and Waltenberger J. (1998). "VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor 2 (KDR)". *Biochem Biophys Res Commun.* 252:743-746.
- Kurzen H. (2004). "The extraneuronal cholinergic system of the skin. Basic facts and clinical relevance". *Hautarzt.* 55(5): 453-459.
- Lala P and Orucevic A. (1998). "Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors progression". *Cancer Metastasis Rev.* 17: 91-106.
- Li J, Jing Z and Yi H. (2003). "Effects of lithium on the activity of ERK-1/2 signal pathway and expression of Bcl-2 family proteins in the central nervous system in vivo". *Hunan. Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 28: 330-334.
- Limonta P, Moretti R, Marelli M and Motta M. (2003). "The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans". *Front Neuroendocrinol.* 24: 279-295.
- Liotta L, Steeg P and Stetler-Stevenson W. (1991). "Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation". *Cell.* 64: 327-336.

- Lowry O, Rosebrough N, Randall R and Farrar A. (1971). "Protein measurement with Folin phenol reagent". J Biol Chem. 193: 265-268.
- Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P and Persico M. (1991). "Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor". Proc Natl Acad Sci USA. 88: 9267-9271.
- Marinissen M and Gutkind S. (2001). "G-protein-coupled receptor and signaling networks: emerging paradigms". TRENDS Pharm Sci. 22:368-376.
- Matos E, Loria D and Zengarini N. (2003). "Atlas de Mortalidad por Cáncer en Argentina, 1997-2001". Pp 12. Ministerio de Salud, Buenos Aires. Argentina.
- Matsui M, Motomura D, Karasawa H, Fujikawa T, Jiang J, Komiya Y, Takahashi S, Taketo MM. (2000). "Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype". Proc Natl Acad Sci U S A. 97(17):9579-9584.
- McKinney M and Richelson E. (1989). "Muscarinic receptor regulation of cyclic GMP and eicosanoid production". The Muscarinic Receptors. Brown J Humana Press, Clifton N. Pp. 309-339.

- Moncada S, Palmer R and Higgs E. (1991). "Nitric oxide: physiology, pathology and pharmacology". *Pharmacol Rev.* 43:109-142.
- Mullins D, Alleva D, Burger C and Elgert K. (1997). "Taxol, a microtubule-stabilizing antineoplastic agent, differentially regulates normal and tumor-bearing host macrophage nitric oxide production." *Immunopharmacology.* 37: 63-73.
- Munson J and Rodbard D. (1980). "Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems". *Anal Biochem.* 107: 220-239.
- Nathanson N. (2001). "A multiplicity of muscarinic mechanisms: Enough signaling pathways to take your breath away". *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:6245-6247.
- Nicke B, detjen K y Logsdon C. (1999). "Muscarinic cholinergic receptors activates both inhibitory and stimulatory growth mechanisms in NIH3T3 cells". *J Biol Chem.* 31:21701-21706.
- NIH. National Cancer Institute. (1989). "The breast cancer digest. A guide to medical care, emotional support, educational programs and Resources". U.S. Department of Health, Education and Welfare. Pp 9-14.

- Ohara K, Uchiyama H, Ohara K, Haga T, Ichiyama A. (1990). "Interaction of deglycosylated muscarinic receptors with ligands and G proteins". *Eur J Pharmacol.*189(6):341-346.
- Papapetropoulos A, García-Cedeña G, Madri J and Sessa W. (1997). "Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells". *J Clin Invest.* 10(12): 3131-3139.
- Plonowski A, Schally A, Letsch M, Krupa M, Hebert F, Busto R, Groot K and Varga J. (2002a). "Inhibition of proliferation of PC-3 human prostate cancer by antagonists of growth hormone-releasing hormone: lack of correlation with the levels of serum IGF-I and expression of tumoral IGF-II and vascular endothelial growth factor". *Prostate.* 1:173-182.
- Plonowski A, Varga J, Schally A, Krupa M, Groot K and Halmos G. (2002b). "Inhibition of PC-3 human prostate cancers by analogs of growth hormone-releasing hormone (GH-RH) endowed with vasoactive intestinal peptide (VIP) antagonistic activity". *Int J Cancer.* 98: 624-629.

- Pradier R, García Salas C, R. Kirchuk y D. Loria. (2000). "Diagnóstico, tratamiento y seguimiento del cáncer. Pautas en Oncología". Instituto Angel H. Roffo. Tumores de mama. Pp 155-171.
- Puricelli L, Urtreger A, Vidal M, Lauría L, Daroqui C, Peters G, Adam A y Ranuncolo S. (2001). "Actualización en oncología clínica. Módulo 11: Biología Celular". Asociación Argentina de Oncología Clínica. Universidad Católica de Salta. Pp 179.
- Quigley R, Shafer S and Williams C. (1998). "Regulation of integrin-mediated adhesion by muscarinic acetylcholine receptors and protein kinase C in small cell lung carcinoma". Chest. 114: 839-846.
- Raedle J, Friedl W, Engels H, Koenig R, Trojan J, Zeuzem S. (2001). "A de novo deletion of chromosome 5q causing familial adenomatous polyposis, dysmorphic features, and mild mental retardation". Am J Gastroenterol. 96(10):3016-3020.

- Rosini P, Bonaccorsi L, Baldi E, Chiasserini C, Forti G, De Chiara G, Lucibello M, Mongiat M, Iozzo RV, Garaci E, Cozzolino F, Torcia MG. (2002). "Androgen receptor expression induces FGF2, FGF-binding protein production, and FGF2 release in prostate carcinoma cells: role of FGF2 in growth, survival, and androgen receptor down-modulation". *Prostate*. 53(4):310-321.
- Rowinsky E, Cazenave L and Donehower R. (1990). "Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent". *J Natl Cancer Inst*. 82: 1247-1259.
- Sagripanti J, Santa Coloma T and Calvo J. (1984). "A simple computer program for Scatchard plot analysis of hormone receptors including statistical analysis on a low cost desk top calculator". *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam*. 34: 45-53.
- Sailer M, Oppitz M and Drews U. (2000). "Induction of cellular contractions in the human melanoma cell line SK-mel 28 after muscarinic cholinergic stimulation". *Anat Embryol*. 201: 27-37.

- Sales K, Katz A, Howard B, Soeters RP, Millar RP, Jabbour HN, Soeters RP. (2002). "Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: Autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin E receptors and angiogenic factors by cyclooxygenase-1". *Cancer Res.* 62: 424-432.
- Sales ME, Sterin-Borda L, Rodriguez M and Borda E. (1997). "Intracellular signals coupled to different rat ileal muscarinic receptor subtypes". *Cell Signal.* 9: 373-378.
- Scatchard G. (1949). "The attractions of proteins for small molecules and ions". *Ann N.Y. Acad Sci.* 51: 660-672.
- Schiff P and Horwitz S. (1980). "Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells". *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:1561-1565.
- Schirrmacher V. (1985). "Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts, and impacts for treatment strategies". *Adv Cancer Res.* 43: 1-73.
- Senger D, Galli S, Dvorak A, Peruzzi C, Harvey V and Dvorak H. (1983). "Tumor cells secrete vascular permeability factor and that promotes accumulation of ascites fluid". *Science.* 219:983-985.

- Shafer S and Williams C. (2004). "Elevated Rac1 activity changes the M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated inhibition of proliferation to induction of cell death". *Mol Pharmacol.* 65: 1080-1091.
- Shizukuda Y, Tang S, Yokota R and Ware J. (1999). "Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase C delta activity". *Circ Res.* 85: 247-256.
- Singh R, Pervin S, Karimi A, Cederbaum S, Chaudhuri G. (2000). "Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells". *Cancer Res.* 60:3305-3312.
- Spector D. (1998). "Cells. Culture and biochemical analysis of cells. Molecular cloning, a laboratory manual". Ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cap15-6.
- Spoonster J, Masiero L, Savage S, Probst J y Kohn E. (1997). "Regulation of cell spreading during differentiation in the muscarinic M5 receptor tumor-suppressor model". *Int J Cancer.* 72:362-368.

- Subbaramaiah K, Telang N, Ramonetti J Araki R, DeVito B, Weksler BB, Dannenberg AJ. (1996). "Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells". *Cancer Res.* 56:4424-4429.
- Torres K and Band Horwitz S. (1998). "Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent". *Cancer Res.* 58: 3620-3626.
- Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. (2000). "Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer". *Clin Cancer Res.* 6: 135-138.
- Ukegawa J, Takeuchi Y and Mitamura K. (2003). "Growth-promoting effect of muscarinic acetylcholine receptors in colon cancer cells". *J Cancer Res Clin Oncol.* 129: 272-278.
- Urtreger A, Laeda VE, Puricelli L, Rivelli A, Vidal MC, Sacerdote de Lustig E and Bal E. (1997). "Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines". *Int J Oncol.* 11: 489-496.
- Van Koppen C and Nathanson N. (1990). "Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function". *J Biol Chem.* 265:20887-20892.

- Wess J. (1993). "Mutational analysis of muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand/receptor/G protein interactions". *Life Sci.* 53:1447-1463.
- Wess J. (1996). "Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors". *Crit Rev Neurobiol.* 10:69-99.
- Williams C, Smalley W and DuBois R. (1997). "Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention". *J Clin Invest.* 100: 1-5.
- Williams C. (2003). "Muscarinic signaling in carcinoma cells" *Life Sci.* 72: 2173-2182.
- Wink D, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst M and Mitchell J. (1998). "The multifaceted roles of nitric oxide in cancer". *Carcinogenesis.* 19: 711-721.
- Wu G and Morris S. (1998). "Arginine metabolism: nitric oxide and beyond". *Biochem J.* 336:1-17.

- Wu T, Han C, Lunz J, Michalopoulos G, Shelhamer J and Demetris A. (2002). "Involvement of 85-kDa cytosolic phospholipase A₂ and cyclooxygenase-2 in the proliferation of human cholangiocarcinoma cells". *Hepatology*. 36: 363-373.
- Yang P, Chan D, Felix E, Cartwright C, Menter D, Madden T, Klein R, Fischer S and Newman R. (2004). "Formation and antiproliferative effect of prostaglandin E3 from eicosapentaenoic acid in human lung cancer cells". *J Lipid Res*. 45:1030-1039.
- Yoshida J, Ishibashi T and Nishio M. (2004). "Antitumor effects of amlodipine, a Ca²⁺ channel blocker, on human epidermoid carcinoma A431 cells in vitro and in vivo". *Eur J Pharmacol*. 492: 103-112.