

Tesis Doctoral

Rol de los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas del subtipo gamma el el cáncer de vejiga

Lodillinsky, Catalina

2010

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

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lodillinsky, Catalina. (2010). Rol de los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas del subtipo gamma el el cáncer de vejiga. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Lodillinsky, Catalina. "Rol de los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas del subtipo gamma el el cáncer de vejiga". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Rol de los Receptores Activadores de la
Proliferación de Peroxisomas del subtipo gamma
en el cáncer de vejiga.**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas**

Lic. Catalina Lodillinsky

Directora de tesis: Dra Ana Maria Eiján

Consejero de Estudios: Dr Norberto Iusem

**Lugar de trabajo: Área de Investigación,
Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"**

Buenos Aires, 2010



UNIVERSITY OF BUENOS AIRES

School of Exact and Natural Sciences

**Role of the Peroxisome Proliferator-Activated
Receptor subtype gamma in bladder cancer.**

Lic. Catalina Lodillinsky

Director: Dra Ana Maria Eiján

Career adviser: Dr Norberto Iusem

Place of work: Research Area. Instituto f Oncology “Ángel H. Roffo”

Buenos Aires, 2010

Agradecimientos

En el año 2003, cursando QB II, Haydee Fukuda me contactó con Ana para hacer mi trabajo de investigación. Me sentí muy afortunada de ir a trabajar al Instituto Roffo y más aún cuando la conocí a Ana. Cuando escribí los agradecimientos de ese trabajo, le agradecí a Ana por trabajar con el corazón en la mano. Hoy, varios años después sigo pensando lo mismo y más. Mi trabajo en el grupo fue muy productivo y eso se debe a que Ana fue y es una guía, por un lado, enseñándome a hacer ciencia, a ser objetiva, práctica y razonable, y al mismo tiempo creyendo en mi criterio, me dio espacio y confianza para crecer. Eso es más que valioso. Además de todo lo anterior, quiero agradecerle por ser compañera, por ser sensible, por contenerme en los momentos difíciles y por sobre todas las cosas por ser buena persona.

Eduardo es integrante del grupo, me acompañó desde el primer momento, con mucha paciencia. Siempre con un oído preparado para escuchar tanto mis inquietudes sobre los resultados, como personales o sobre cualquier otra cosa que yo necesitara charlar. Una y mil veces gracias. Fue muy divertido y reconfortante trabajar con vos.

Quiero agradecer a Yanina, por el empujón que me dio en ésta última etapa de la tesis. Realmente fue y es un placer trabajar con ella. Gracias por la paciencia y por tanta energía! Gracias también a Denise, estoy segura que al igual que Yani harán un excelente trabajo de tesis.

Muchas gracias a Ruth y a Ariel por todo el esfuerzo dedicado.

La forma de ser de cada uno de los integrantes de este grupo hizo que sea muy productivo trabajar en equipo, siempre construyendo una muy buena atmósfera de trabajo. Gracias.

Quiero agradecer a Madela, por todas sus sugerencias, correcciones, colaboraciones y milongas. Es muy gratificante contar con ella siempre que sea necesario.

Quiero agradecer a Elisa, por haberme abierto las puertas del área que dirige. Gracias por confiar en mí. Es muy estimulante encontrar diariamente una persona llena de energía dedicada al trabajo.

A Alberto Casabé y el Servicio de Urología del Instituto, gracias por brindarnos siempre su apoyo.

Quiero agradecer a todo el sector de Inmuno, Gracias Lucas por darme una mano siempre que está a tu alcance y más también, por ser muy buen compañero. A Andrea, Gabriel, Ada, July y Pablo por compartir conmigo toda esta etapa. Hicieron que el trabajo y los almuerzos se hagan muy amenos.

Quiero agradecer a todos los becarios e investigadores jóvenes del piso por siempre estar dispuestos a responder cualquier pregunta y a aconsejarnos. Gracias a Ova, Diego, Pao, Ceci, Jopi, Rocío, Inés, Damián, Amparo, Laura M y Valeria. Mil veces gracias a Martín quien infinitas veces me ayudó con todo lo que podía. Siempre dispuesto y sin esperar retribución alguna. Gracias a Paula y María José, fue un placer compartir mates con ustedes. Quiero agradecer a Guillermo, de quien aprendí mucho, a Alejandro, Laura, Marina y Giselle por compartir conmigo su lugar de trabajo.

Gracias a Lidia, Dori, Marta y Pedro. Gracias por poner su grano de arena para que el Área de Investigación progrese.

Quiero agradecer muy afectuosamente a toda la gente del bioterio. Gracias a Danka, Miriam, Lili, Romina, Cande, Ezequiel, Ana, Rivero, Juan y especialmente a Vanina quien con mucha paciencia me transmitió sus conocimientos y a Andrea por tanta energía y buena onda.

A todo el personal del piso, quienes contribuyeron invaluablemente en este trabajo. Gracias a Mirta, Alicia, Leo, Gabita, Cata, Antonia y Silvina. Gracias por la paciencia y por la buena onda. Muchas, muchas gracias.

A Berta Roth y a todo el personal del Instituto, siempre dispuesto a colaborar. A Lina Marino y Fernanda del departamento de Patología.

Quiero agradecer a la UTG. Gracias Gerardo y Liliana por abrirme las puertas de su laboratorio. A Maria Doris, Graciela y Úrsula. Cuando nos conocimos con Marce, supimos desde el primer momento que íbamos a ser amigas. Y así fue. Un poquito más tarde pasó lo mismo con Lour. Gracias a Manchu y Lour por ser compañeras, amigas, por alegrarse de mis logros como si fueran propios. Están dentro de las cosas más lindas de esta tesis.

A todas las personas que colaboraron conmigo fuera del Instituto. Gracias Sebastián Giusti, por tanta buena predisposición para dar una y cien manos.

A Victoria Fabris, quien me ayudó en pleno fin de año con el cariotipo del modelo. Gracias por compartir conmigo su pasión por el trabajo.

Al laboratorio de A. Baldi, especialmente a Adrián Góngora quien colaboró con nosotros con mucha eficiencia e idoneidad.

Quiero agradecer a Claudia Arguelles y a Ruth Slimovich del Servicio Derivado de Micobacterias INPB- ANLIS Malbrán, por su inmensa disposición para colaborar con nosotros.

Gracias a la UBA y al CONICET, que confiaron en mí y me becaron para que todo esto fuera posible. Gracias K

Durante la realización de este trabajo tuve la oportunidad de viajar a París donde aprendí mucho. Quiero agradecer a Bunge y Born que financió el viaje, a Clotilde Thery y Sebastian Amigorena por aceptarme en su laboratorio. A Gael por enseñarme y a todos, por las críticas constructivas al trabajo. Durante esa estadía también sembré amigos, Virginia, Martín y Alejandro, tres personajes que tuve la suerte de conocer. Gracias!

Este viaje no hubiera sido posible sin Susana. Gracias Su, por tanto esfuerzo y dedicación.

A mis amigos de toda la vida, Virginia y Sebastián, Claudia, María Amalia, Eliana, Gisela, Fabián y Cristian por acompañarme en todos estos años, por darme fuerzas y permitirme contar con ustedes en cualquier momento. A Martín por las cenas con catarsis ó catarsis con cenas.

El paso por la facultad me dio más amigas. Gracias Mariví, Silvana, Nati, Paula y Mariela por bancarme todos estos años, por tanta paciencia, por compartir cada momento, por las cenas y los mails con buenas noticias.

A los nuevos integrantes de este planeta que me llenaron de alegría durante todos estos años. Morena, Franco, Agustín, Federico Santino, Leía, Juan Martín, Rocco, Lucas y bebé de Andrea y Edu, que está en camino. Cada uno de ellos ha sido una recarga de energía.

A lo largo de todos estos años, y durante toda la vida, mi familia fue un pilar fundamental para mí. Me siento muy contenida y acompañada por ellos. Quiero agradecer a mis hermanos, Vicky, Lucia, Clara e Ismael por demostrarme siempre que mi felicidad es la felicidad de ellos también, por bancarme, por escucharme y aconsejarme. Todo es realmente mucho más fácil con ustedes al lado mío.

Quiero agradecer a mi mamá, la mejor mamá del mundo. Gracias ma, porque me haces saber que siempre estás dispuesta a sostenerme y acompañarme. Gracias por educarme y amarme, por hacer de mi lo que soy hoy.

Quiero agradecer a mi papá, el mejor papá del mundo. Sos mi referencia. Gracias por enseñarme que todo tiene sentido si uno va detrás de su deseo. Gracias por trasmitirme tus valores, por contenerme y escucharme.

Por último quiero agradecer a Germán, quien me motiva día a día para seguir adelante. Gracias por escucharme, aconsejarme, abrazarme y acompañarme. La combinación de amor, energía, sensatez y paciencia, hicieron que el camino diario por esta tesis sea más sencillo. Gracias por compartir tu vida conmigo, mil y un veces gracias.

Índice

Abreviaturas	11
Resumen	12
Abstract	13
Introducción general	14
I-Aspectos generales de la biología tumoral.....	15
II –Cáncer de vejiga.....	16
1- Etiología	17
2- Manifestaciones clínicas, diagnóstico, estadificación y clasificación del CaV.	18
III-Receptores Activadores de la Proliferación de Peroxisomas del subtipo gamma....	22
1-Generalidades	22
2-PPAR g y sus ligandos	24
3-PPARg e inflamación.....	26
4-PPARg y NF-kB.....	27
5- PPARg y cáncer	29
6- PPARg y fibrosis.....	30
Hipótesis	31
Objetivos Generales	31
Materiales y métodos	32
Líneas celulares.	33
BCG.....	33
Análisis de la viabilidad celular por MTS	33
Evaluación de la producción de Óxido Nítrico	34
Evaluación de la capacidad fagocítica.....	34
Coloración de Zhiel Neelsen	35
Ensayo de gen reportero	35
Immunofluorescencia	36
Inmunohistoquímica	36
Western Blot.....	37
Ensayo de crecimiento tumoral in vivo de la línea MB49	38
Generación de la línea celular de cáncer de vejiga invasora MB49-I	39

Ensayo de crecimiento tumoral in vivo de las líneas MB49 y MB49-I	39
Implantación ortotópica de líneas tumorales de vejiga	40
Metástasis experimentales	41
Preparación de medio condicionado (MC) y homogenato de tumor.....	41
Determinación de la actividad de MMPS y uPA.....	41
Ensayo de invasión in Vitro	42
Determinación de la actividad enzimática de CB.....	43
Ensayo de angiogénesis	43
Análisis del Cariotipo. Citogenética.....	44
Análisis estadístico	44
Capítulo 1	45
Rol de PPARg en el cáncer de vejiga bajo tratamiento con BCG.....	45
Objetivos:	45
Introducción	46
1-Tratamiento: inmunoterapia con BCG.	47
2- Macrófagos.....	49
3-Óxido nítrico en el cáncer de vejiga.....	50
4-Rol del estroma en la biología tumoral	51
4.1 Fibroblastos	52
4.2 Efectos de BCG y NO sobre el estroma tumoral.....	53
Resultados	55
PARTE I -Mecanismos de acción de BCG in vitro-	56
BCG induce la expresión de PPARg en células de cáncer de vejiga.	56
BADGE, antagonista de PPARg revierte la inhibición de la viabilidad inducida por BCG.....	59
Ligandos de PPARg potencian el efecto inhibitorio de BCG en células de CaV ..	59
BCG induce la actividad transcripcional de PPARg.	61
BCG induce la activación del factor de transcripción NF-kB.....	62
BCG induce la expresión de iNOS en la línea celular MB49.	64
Los ligandos de PPARg inhiben la producción de óxido nítrico inducido por BCG	65
PARTE II –Mecanismos de acción de BCG in vivo-	67

BCG inhibe el crecimiento tumoral mientras que la administración de RO se opone a dicho efecto en ratones singeneicos.....	67
BCG induce PPARg in vivo	68
BADGE revierte el efecto inhibitorio de BCG in vivo.	69
Rol de los macrófagos en el crecimiento del tumor MB49	70
RO inhibe la actividad transcripcional de NF-kB y la fagocitosis en una línea de macrófagos murinos.	72
BCG no genera efecto sobre el crecimiento tumoral en ratones atímicos.....	74
Rol de los fibroblastos en el crecimiento del tumor MB49.....	76
BCG induce la proliferación de fibroblastos mientras que RO se opone a dicho efecto.	76
BCG induce la expresión de moléculas asociadas a la reparación de tejidos y RO se opone a dicho efecto.	77
Discusión capítulo I	82
Capítulo 2	86
Caracterización de un modelo ortotópico con distinto grado de invasión de cáncer de vejiga murino y evaluación de la expresión de PPARg en éste modelo y en pacientes con CaV.....	86
Objetivos	86
Introducción	87
1-Invasión tumoral y metástasis	88
2-Enzimas proteolíticas involucradas en el proceso de invasión y metástasis	90
3 - Catepsina B y microambiente tumoral	92
3.1- Catepsina B y cáncer de vejiga.	93
4-Angiogénesis	94
5- Transición epitelio mesenquimática.....	95
5.1- Transición epitelio mesenquimática y cancer	96
6- Modelos animales en cáncer de vejiga.....	96
7-Alteraciones cromosómicas y genéticas.....	97
Resultados	99
PARTE I -Caracterización de un modelo ortotópico con distinto grado de invasión de cáncer de vejiga murino.....	100
Obtención del nuevo modelo de estudio	100

Análisis del Cariotipo	101
MB49-I presenta mayor actividad de enzimas proteolíticas y capacidad invasora in vitro que MB49.....	104
MB49-I presenta mayor velocidad de crecimiento que MB49 creciendo en forma subcutánea.	105
MB49-I desarrolla mayor número de metástasis experimentales pulmonares.....	106
MB49-I presenta mayor expresión de Vimentina.....	107
La línea celular MB49-I genera tumores de vejiga invasores.	109
El tumor MB49-I presenta mayor angiogénesis comparada con el tumor MB49.	113
El tumor inoculado con MB49-I presenta mayor expresión y actividad enzimática de CB comparada con los tumores MB49.	115
PARTE II- Evaluación de la expresión de PPARg en el modelo desarrollado y en pacientes con CaV.	118
Expresión de PPARg en un modelo ortotópico de cáncer de vejiga murino.....	118
Expresión de PPARg en pacientes con CaV	121
Discusión capítulo II	124
Conclusión	131
Bibliografía	134

Abreviaturas

BCG: Bacillus Calmette-Guerin

BADGE: bisfenol A diglicidiléter

CA: CA074-Me

CB: Catepsina B

CK: citoqueratina

CaV: cáncer de vejiga

iNOS: óxido Nítrico Sintasa inducible

iv: intravenoso

MEC: Matriz Extracelular

MC: Medio Condicionado

MMP: Metaloproteasa

NF-kB: Factor nuclear kB

NO: Óxido Nítrico

PPAR: Receptores Activadores de la Proliferación de Peroxisomas

PBS: buffer salino de fosfato

RO: Rosiglitazona

sc: subcutáneo

SFB: suero fetal bovino

SMA-alfa: Actina de músculo liso tipo alfa

TEM: Transición Epitelio Mesenquimática

uPA: Activador de Plasminógeno tipo Uroquinasa

VM: Vimentina

15-d-PGJ2: 15-deoxi-delta12,14-PGJ2

Resumen

Rol de los Receptores Activadores de la Proliferación de Peroxisomas del subtipo gamma (PPARg) en el cáncer de vejiga.

PPARg es miembro de la superfamilia de receptores nucleares que son factores de transcripción activados por su ligando. BCG es el tratamiento de elección para el cáncer de vejiga (CaV) que no invade músculo. Nos propusimos estudiar el rol de éste receptor bajo el tratamiento de BCG en ésta patología. Encontramos que BCG es capaz de inducir la expresión de PPARg en células de CaV murinas, MB49 y los ligandos de PPARg potencian este efecto. La actividad transcripcional de PPARg también es aumentada por BCG y potenciada por 15-d-PGJ2, ligando de PPARg. Al mismo tiempo BCG induce en las líneas de CaV la expresión de iNOS y la consecuente producción de óxido nítrico (NO). Los ligandos de PPARg inhibirían la producción de NO inducida por BCG, por un mecanismo PPARg independiente pero dependiente de la vía de NF-kB. In vivo, BCG inhibe el crecimiento de tumores, efecto bloqueado por BADGE, antagonista de PPARg indicando que parte del mecanismo de acción de BCG es a través de PPARg. BCG induce la expresión de colágeno, SMA-alfa y FGF-2, al mismo tiempo induce la proliferación de los fibroblastos in vitro. RO revierte el efecto inhibitorio ejercido por BCG, inhibiendo diferentes funciones de macrófagos y fibroblastos. BCG media su mecanismo de acción antitumoral, en parte, a través de PPARg pero su activación in vivo con agonistas exógenos puede ser contraproducente dado su funcionalidad en el sistema inmune.

Obtuvimos una nueva línea celular, MB49-I y desarrollamos un modelo murino ortotópico con distinto grado de invasión. Al evaluar la expresión de PPARg en éste modelo, observamos que PPARg está aumentado en tumores superficiales comparado con la vejiga normal, mientras que se pierde en vejigas portadoras de tumor invasor. En tumores vesicales de pacientes observamos que un mayor número de pacientes con tumores invasores expresa bajos niveles de PPARg comparado con aquellos pacientes con tumores no invasores, sugiriendo que PPARg podría estar involucrado en la progresión de tumores de vejiga.

Palabras claves: PPARg, BCG, cáncer de vejiga.

Abstract

Role of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor subtipo gamma in bladder cancer.

Peroxisome proliferatoractivated receptor gamma (PPAR γ) is a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcription factors that is involved in cell growth and differentiation as well as inflammatory processes.

We found that BCG is able to induce PPAR γ expresión in bladder murine cell line MB49. Transcriptional activity of PPAR γ is also increased by BCG and it is enhanced by 15-d-PGJ2, a PPAR γ ligand. At the same time, PPAR γ ligands enhance BCG-induced cell death. BCG also induces iNOS expression and NO production. PPAR γ ligands inhibits NO production induced by BCG. In vivo, BCG inhibits tumor growth, but RO reverses that effect. RO inhibits different functions associated to activated macrophages induced by BCG. In vitro, BCG induces fibroblast proliferation and in vivo, induces collagen, FGF-2 and alpha-SMA expresión. RO decreases that induction. We have generated a new cell line, MB49-I and we developed a new murine orthotopic model with different levels of invasion. PPAR γ is increased in superficial tumors compared to normal bladder, meanwhile, this expression is reduced in invasive tumors.

In patients, we observed that invasive tumors express low level of PPAR γ compared to those with non-invasive tumors.

PPAR γ is involved in the mechanism of action of BCG, but his activation could be not recommended in vivo, since it has a relevant role in the immune system.

PPAR γ expression is decreased in invasive tumors, which suggests that this transcription factor plays a key role during progresion in bladder tumors.

Keywords: PPAR γ , BCG, bladder cancer.

Introducción general

I-Aspectos generales de la biología tumoral

El cáncer es una patología caracterizada por el crecimiento descontrolado de células en un determinado tejido que puede colonizar órganos distantes. En éste proceso tienen lugar múltiples etapas en las cuales existen alteraciones en el control de diferentes eventos celulares como la proliferación, la interacción célula-célula y la muerte celular. Estas etapas biológicas se caracterizan por un incremento progresivo de la agresividad clínica que se asocia a patrones histológicos y biológicos específicos.

El estudio de los mecanismos que promueven la progresión tumoral es de fundamental importancia para diseñar terapias y/o medidas de prevención adecuadas. Aun que se realizan intensas investigaciones aún no se conocen completamente estos mecanismos ya que ellos varían dependiendo del origen tumoral como así también de los modelos utilizados durante las investigaciones.

Entre los factores que regulan el comportamiento de una célula tumoral se reconocen aquellos que son producto de la propia célula maligna y aquellos que son producto del tejido no tumoral en donde se desarrolla la neoplasia denominado estroma. El microambiente tumoral, en los tumores sólidos, está formado por diferentes células como fibroblastos, células del sistema inmune y matriz extracelular. El vínculo entre las células tumorales y el estroma está dado tanto por las interacciones célula-célula y/o célula-matriz extracelular, como por factores solubles que interactúan con receptores específicos y activan respuestas que inducen la expresión de proteínas relacionadas con el control de la proliferación, la modulación de la síntesis de componentes de la matriz extracelular (MEC) y/o la producción de enzimas proteolíticas para su degradación. Estos estímulos también pueden generar cambios fenotípicos de la célula tumoral disminuyendo su capacidad de adhesión y aumentando su movilidad, lo cual capacita a la célula neoplásica para ser más invasora y metastásica.

A su vez éstas interacciones pueden actuar modulando la respuesta de las células del estroma (o no tumorales) favoreciendo la angiogénesis, degradando la MEC o bloqueando la respuesta inmune [1,2]. Esto determina que el tumor proliferen en forma no controlada, colonice el propio órgano (invasión) y colonice órganos alejados (metástasis), eventos que caracterizan a la progresión tumoral.

II –Cáncer de vejiga

El cáncer de vejiga (CaV) es el segundo tumor más frecuente del tracto urogenital masculino luego del de próstata y ocupa el quinto lugar entre los tumores sólidos en los Estados Unidos [3]. En el año 2006 hubo alrededor de 61.240 casos diagnosticados de cáncer de vejiga y aproximadamente 13.060 muertes atribuibles a esta enfermedad. En la Unión Europea es la cuarta causa de muerte por cáncer, representando el 7% de los tumores malignos en el hombre [4].

En nuestro país, ocupa el octavo lugar en mortalidad por cáncer en el hombre con una tasa de 4,8 por 100.000/año, mientras que en la mujer es de 0,9 por 100.000/año. El Registro de tumores de Concordia comunicó una tasa de incidencia para los varones del triple que para las mujeres (12,1 y 3,7 respectivamente). La edad de mayor incidencia es entre la quinta y séptima década de la vida, siendo la raza blanca más susceptible a padecerlo [5]. Al momento del diagnóstico el tipo histológico más frecuente es el carcinoma de células transicionales con más del 90 % de los casos. Luego le sigue el carcinoma de células escamosas con el 5-7 % en el mundo occidental, sin embargo, en Egipto asciende al 75 % de los casos. Este tipo histológico se encuentra asociado a procesos inflamatorios crónicos, como la infección por *Schistosoma haematobium*, permanencia de catéteres por largo tiempo, litiasis vesical o vejiga neurogénica, generalmente de peor pronóstico que el anterior. El adenocarcinoma de vejiga es un tumor menos frecuente, representa el 2 % de todos los tumores vesicales y se caracteriza por tener un pronóstico desfavorable y responder poco al tratamiento quimioterapéutico y quirúrgico [4].

1- Etiología

Las tres causas principales de CaV reconocidas desde hace cuatro décadas son: el hábito tabáquico, la exposición ocupacional a carcinógenos químicos y los procesos inflamatorios crónicos.

El mecanismo que relaciona el hábito de fumar con el riesgo de CaV no es claro, pero se cree que una de las causas es la presencia de bajos niveles de aminas aromáticas, como el 4-aminobifenilo, en el humo del cigarrillo. Estas arilaminas sufren transformación metabólica con producción de intermediarios reactivos que pueden formar aductos con el ADN, un paso esencial en el proceso de carcinogénesis. Los niveles de aductos de ADN por arilaminas están fuertemente correlacionados con la cantidad de cigarrillos consumidos y puede ser sustancialmente modificado por enzimas detoxificantes [6]. En nuestro país se ha observado una tendencia a la disminución de CaV asociado a una disminución del consumo de cigarrillo [7].

La primera causa bien establecida de CaV fue la relacionada con la exposición ocupacional: la industria textil (teñido de telas), la cosmética (fabricación de tinturas) y la del caucho son las actividades que generan más exposición a compuestos carcinógenos como las arilaminas y se estima que son responsables de un 20 % de los casos diagnosticados [6]. La mayoría de estas sustancias llevan varios años de acumulación y largos períodos de latencia antes del desarrollo de la patología tumoral. La exposición ocupacional a la 2-naftilamina fue eliminada hace tiempo en los EE.UU. luego del establecimiento de estándares regulatorios, disminuyendo la incidencia de la génesis del CaV.

Otras ocupaciones han sido relacionadas con el riesgo de CaV en estos años incluyendo camioneros, pintores y trabajadores del cuero, pero su contribución en la incidencia de CaV es mucho menor [8].

Los procesos inflamatorios también se han asociado con la incidencia de CaV. La cistitis por *Schistosoma haematobium*, patología endémica en Egipto, Irak y sudeste de África [4,9] está asociada con el desarrollo de CaV, principalmente asociado al carcinoma de células escamosas y en menor proporción al de células transicionales [9]. El mecanismo por el cual esta infección causa CaV no es claro, sin embargo, algunos investigadores han puesto la atención sobre el nitrito y los N-nitroso compuestos generados durante el proceso

inflamatorio [10]. Como consecuencia de la infección secundaria con bacterias nitratos reductores, que invariablemente acompañan a la esquistosomiasis vesical, se forman en la vejiga compuestos nitrogenados algunos como las nitrosaminas y las nitrosamidas con capacidad carcinogénica [6].

Otros procesos inflamatorios crónicos como la cistitis crónica causada por la utilización de catéteres Foley por largo tiempo o la presencia de cálculos vesicales también se asocian con un incremento en el riesgo de desarrollar carcinoma de células escamosas [11]. También en este caso algunos autores involucran al óxido nítrico y los N-nitroso compuestos con la inducción y progresión del CaV [12].

2- Manifestaciones clínicas, diagnóstico, estadificación y clasificación del CaV.

La manifestación clínica más frecuente es la hematuria, la que se observa en el 80 % de los pacientes, generalmente es intermitente pudiendo ser macroscópica o microscópica. En un 20 % de los pacientes se puede encontrar síntomas irritativos, como disuria y polaquiuria, los que están asociados frecuentemente con tumores vesicales más agresivos, tal como carcinoma in situ o tumores de alto grado histológico [13].

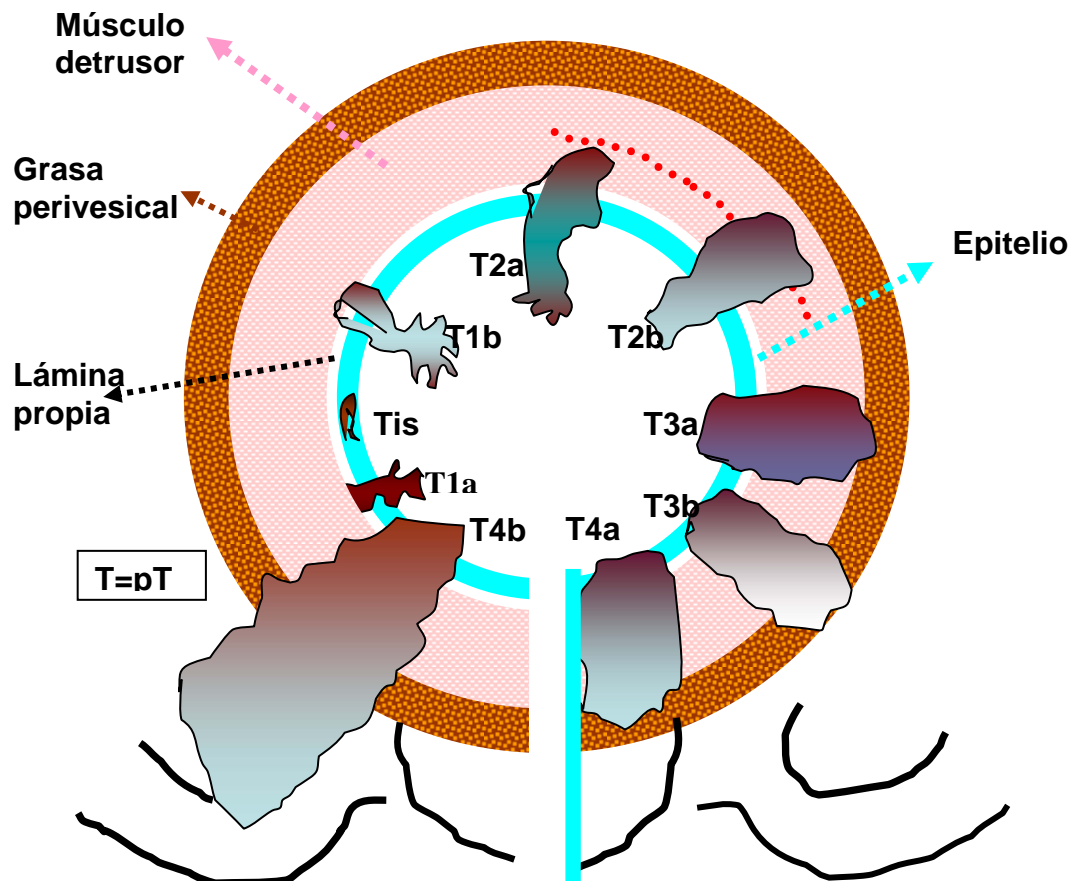
Manifestaciones menos frecuentes pero que hablan de una enfermedad avanzada son el dolor pelviano por compresión nerviosa, dolor en flanco por compromiso ureteral, edema de miembro inferior por obstrucción venosa o linfática y más raro aun dolor óseo por metástasis [4].

La estrategia diagnóstica más frecuentemente empleada al inicio es la ecografía en presencia de hematuria la indicación habitual es un urograma excretor o pielografía intravenosa, con este estudio se visualiza el tracto urinario completo desde la pelvis renal hasta la vejiga, los tumores uroteliales se detectan como defectos de relleno de la sustancia de contraste, asimetría de la vejiga por infiltración tumoral, hidronefrosis o dilatación ureteral por obstrucción del mismo. Luego del estudio radiológico, lo indicado es realizar una endoscopia diagnóstica que permite establecer la apariencia macroscópica,

localización, número y patrón de crecimiento (papilar, sésil, nodular o plano) de la o las lesiones, además se debe realizar una toma biopsia para diagnóstico histológico [4].

Los tumores uroteliales sufren exfoliación de células hacia la orina, el estudio citológico de una muestra seriada de orina o del lavaje vesical durante la cistoscopia, es de gran ayuda en aquellas lesiones de muy pobre definición macroscópica (carcinoma in situ) pero con células más indiferenciadas con bajo grado de cohesión. Tiene 15-20 % de falsos negativos atribuidos a tumores de bajo grado que descamarían menos y 2-5 % de falsos positivos consecuencia de infecciones urinarias, litiasis y radioterapia previa [14].

Los carcinomas de vejiga se estadian según T.N.M., donde T corresponde a tumor primario, N a ganglios regionales y M a metástasis a distancia. El valor de N dependerá de la presencia (Nx) o no (No) de ganglios regionales y del tamaño de los mismos y en el caso del M se determina la existencia o no de las metástasis en órganos a distancia [14]. A nivel patológico el CaV se clasifica según el grado de invasión de los tejidos y según el grado de diferenciación o grado histológico G. Según el grado de invasión la UICC clasifica a estos tumores en no músculo invasor (pTa y pT1 o bien Ta,T1), cuando el tumor compromete el epitelio vesical hasta la lámina propia, e **invasores** cuando alcanzan el músculo detrusor pT2 (o T2), invaden la totalidad de la pared vesical pT3 (o T3) o se han extendido a órganos adyacentes pT4 (oT4). El carcinoma in situ, que puede presentarse sólo o asociado a los tumores transicionales, presenta características muy invasivas, se denota con el subfijo *is* (Tis). Figura 1.



T = tumor N = nódulo M = metástasis

FIGURA 1: Los tumores superficiales (pTa-pT1) se caracterizan por comprometer el epitelio hasta la lamina propia, mientras los invasores corresponden a aquellos tumores que comprometen el músculo detrusor (pT2), alcanzan la grasa perivesical (pT3) o invaden órganos vecinos (pT4). Adaptado De Griffiths et al, 2004. [15]

Según el grado histopatológico se los clasifica en:

- Neoplasia papilar urotelial de bajo potencial maligno (PUNLMP)
- Carcinoma urotelial de bajo grado
- Carcinoma urotelial de alto grado

Esta clasificación que fue consensuada en el 2004 por la Organización Mundial de la Salud (WHO) relaciona el grado histológico, alteraciones en genética molecular y valor pronóstico [16]. **Figura 2.**



FIGURA 2: Grado histopatológico de tumores uroteliales: (A) Neoplasia papilar urotelial de bajo potencial maligno (PUNLMP); (B) Carcinoma urotelial de bajo grado, (C) Carcinoma urotelial de alto grado. Extraído de Mac Lennan GT et al, 2007 [17].

III-Receptores Activadores de la Proliferación de Peroxisomas del subtipo gamma.

1-Generalidades

Los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR) son factores de transcripción intracelulares activados por ligando, miembros de la superfamilia de receptores nucleares hormonales, que incluyen estrógenos, receptores de hormona tiroidea, ácido retinoico, vitamina D3 y receptores retinoicos X (RXRs). La superfamilia de PPAR consiste en tres subtipos codificados en genes distintos, denominados PPAR alfa (NR1C1), PPAR beta/delta (NR1C2) y PPAR gamma (PPARg) (NR1C3) los cuales son activados por ligandos selectivos [18]. Los tres subtipos de PPAR están distribuidos en diferentes tejidos que reflejan su función biológica. PPAR alfa está predominantemente expresado en hepatocitos, cardiomiocitos, células del tubo proximal de riñón, mientras que PPAR beta/delta, está más ampliamente distribuido con mayores niveles relativos en cerebro, tejido adiposo y piel [19]. PPARg está altamente expresado en adipocitos pero también se encuentra en células endoteliales y células del sistema inmune. Está altamente expresado en varios tumores incluyendo pulmón, próstata, colon, mama, duodeno, tiroide y vejiga. En humanos, PPARg es el subtipo más estudiado de los PPARs que, como otros receptores nucleares, posee una estructura compuesta por seis regiones definidas (A-F) en cuatro dominios funcionales. Tras la activación, PPARg forma heterodímeros con los receptores de ácido retinoico y el complejo une sitios de reconocimiento específicos, denominados elementos de respuesta a proliferador de peroxisomas (PPRE) localizados en la región del promotor de los genes que codifican a PPAR (Figura 3). Además del complejo heterodimérico, la unión del ligando agonista de PPARg genera un cambio conformacional que recluta coactivadores transcripcionales, que modifican la estructura de la cromatina y facilitan el ensamblaje de la maquinaria transcripcional al promotor. PPARg puede regular negativamente la expresión de genes en una manera ligando dependiente a través de la inhibición de la actividad de otros factores de transcripción, como los miembros de la familia de NF-KB y AP-1, mecanismo que ha sido denominado *transrepresión dependiente de ligando* [20]. Contrariamente a la activación y represión

transcripcional, la transrepresión no involucra la unión a elementos de respuesta específicos del receptor. Además, en ausencia de ligando, PPARg tiene el potencial de reprimir la transcripción vía *represión independiente de ligando*. En esta condición, PPARg y RXR están asociados a complejos corepresores transcripcionales como por ejemplo, receptores-corepresores nucleares (N-CoR) o mediadores de silenciamiento de retinoico y receptores tiroideos (SMRT), la cual funciona como antagonista del complejo coactivador. Los coactivadores y corepresores transcripcionales poseen o reclutan complejos multiproteicos que incluyen enzimas modificadoras de histonas, como acetiltransferasas (p300/CBP) e histonas desacetilasas (HDAC 3). La actividad de estas enzimas modificadoras de histonas afecta la transcripción de genes por alteración de la estructura de la cromatina y regulación del pegado de RNA polimerasa [18].

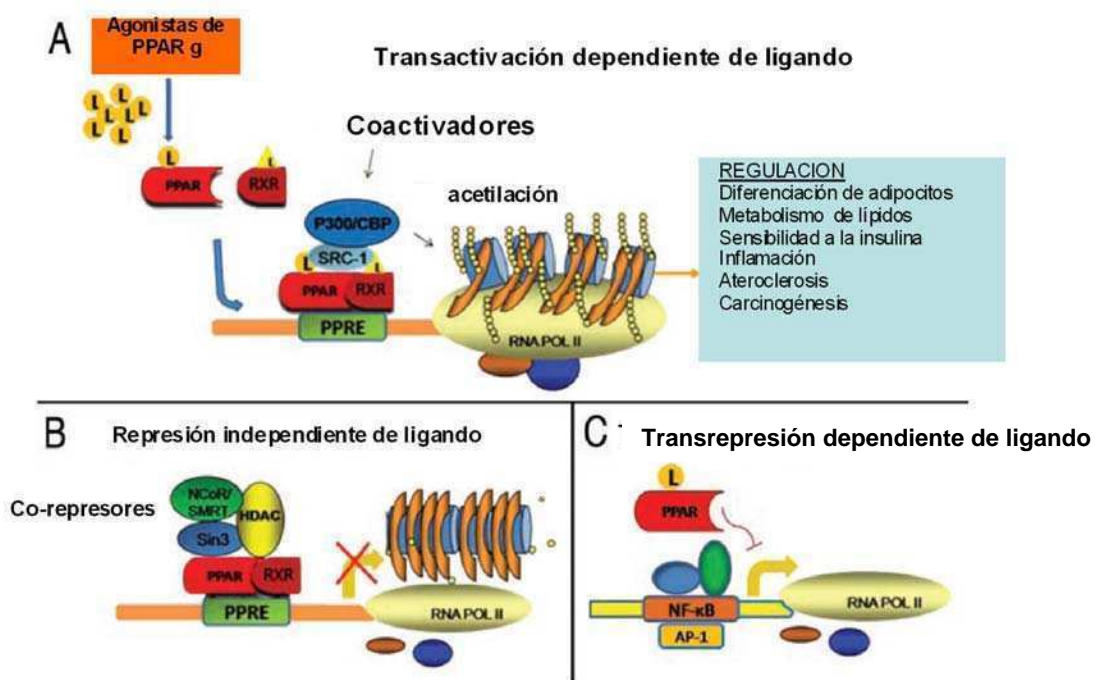


Figura 3: A. Vía de activación de PPARg y regulación transcripcional de genes blanco. En el estado activado, PPARg forma heterodímeros con el receptor de ácido retinoico (RXR) y forma un complejo que se une a sitios reconocidos específicamente, denominados elementos respondedores a PPARg (PPRE), localizados dentro de la

región promotora de los genes que responden a PPARg (transactivación dependiente de ligando). El complejo heterodimérico se une al ligando agonista generando un cambio conformacional que recluta coactivadores transcripcionales. B. En ausencia de ligando, PPARg y RXR están asociados con corepresores transcripcionales (por ej: N-CoR; SMRT) los cuales contienen actividad desacetilasa (HDAC) y median la represión transcripcional (represión independiente de ligando). C. PPARg reprime la transcripción por inhibición de la actividad de otros factores de transcripción, como miembros de la familia AP-1 y NF-KB (transrepresión dependiente de ligando). Figura adaptada de Mansure et al, 2009 [18].

2-PPAR g y sus ligandos

Los ligandos naturales de PPARg incluyen prostaglandinas, ácidos grasos y eicosanoides, componentes de lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas, fosfolípidos que incluyen ácido lisofosfatídico y nitrooleico. Las prostaglandinas son pequeñas moléculas lipídicas que regulan numerosos procesos en el cuerpo que incluyen funciones renales, agregación plaquetaria, liberación de neurotransmisores y modulación de la función inmunológica. La producción de prostaglandinas comienza con la liberación del ácido araquidónico de la membrana fosfolipídica por la fosfolipasa A₂ en respuesta a estímulos inflamatorios. El ácido araquidónico es convertido a PGH₂ por las enzimas ciclooxigenasas COX-1 y COX-2. En términos generales se considera que COX-1 está expresada en la mayoría de los tejidos y que COX-2 es inducible y está involucrada en la regulación de la inflamación. La PGH₂ es sustrato de las prostaglandinas sintetasas que producirán distintas formas de prostaglandinas: PGI₂, PGD₂, PGE₂ y PGD₂. La PGD₂ es metabolizada a 15-deoxy-delta^{12,14}-PGJ₂ (15-d-PGJ₂). Este derivado de la prostaglandina J₂, 15-d-PGJ₂, es el ligando endógeno más potente para PPARg y es el más comúnmente usado como agonista. Esta molécula es clave como mediadora en el proceso anti-inflamatorio. Por ejemplo, la 15-d-PGJ₂ es capaz de inhibir la producción de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) e interleuquina 1B (IL-1B) en macrófagos tanto humanos como murinos. Los mecanismos inhibitorios involucran la inhibición de

mitogen-activated proteína (MAP) quinasas, NF- κ B o la quinasa I κ B. También la 15-d-PGJ2 puede inducir apoptosis en linfocitos T y B murinos, disminuyendo así la respuesta inmune inflamatoria [21].

Otros compuestos sintéticos que pueden funcionar como ligandos incluyen el grupo de drogas anti diabéticas tiazolidinedionas (TZD), que incluyen troglitazona (TGZ), rosiglitazona (RO), pioglitazona, ciglitazona y ciertas drogas anti-inflamatorias no esteroideas (NSAIDs) como indometacina, ibuprofeno y fenoprofeno.

En forma similar a otros receptores nucleares, Los PPARs son fosfoproteínas y su actividad transcripcional está afectada por quinasas y fosfatasas en una manera tanto ligando dependiente como independiente. Los efectos de fosforilación sobre la actividad del receptor depende de varios aspectos, tales como el subtipo, el residuo modificado el estímulo y la quinasa. La unión del ligando a PPAR γ está regulado por comunicaciones intramoleculares entre su dominio amino terminal A/B y su dominio carboxi terminal de unión a ligando. La regulación de la actividad de PPAR γ por fosforilación es todavía una nueva área de estudio. Las modificaciones en el dominio A/B, por ejemplo por fosforilación fisiológica de MAP quinasa, reducen la afinidad de unión por el ligando, regulando negativamente la transcripción y por ende la función biológica de PPAR γ .

En cuanto a la funcionalidad de PPAR γ , su alto nivel de expresión en el tejido adiposo llevó a la caracterización de su rol en la diferenciación de adipocitos y la regulación del metabolismo lipídico. Investigaciones en este campo llevaron a postular que las drogas antidiabéticas tiazodinedionas (TZDs) son ligandos agonistas de alta afinidad de PPAR γ . En el tejido adiposo de rata, TZDs regulan la expresión de genes blanco, como la lipoproteína lipasa. Esta activación favorece la captación de ácidos grasos circulantes por parte del adipocito, llevando a un incremento neto de lípidos. Aún que el rol de PPAR γ en adipocitos sugirió una posible conexión entre su actividad y la sensibilidad a la insulina, el descubrimiento de PPAR γ como blanco biológico de TZD fue el que proveyó la primer evidencia en demostrar dicho enlace, al ser capaz de reducir directamente la resistencia a la insulina sistémica en los tejidos periféricos. La activación de PPAR γ resulta en una disminución significativa en la concentración de glucosa sérica en pacientes con diabetes lo que llevó a los agonistas PPAR γ a ser ampliamente utilizado en el ámbito clínico como medication anti-diabética. En la actualidad, dos compuestos de TZDs, RO y pioglitazona, se prescriben clínicamente para este propósito.

3-PPARg e inflamación

Ha sido descrito que mientras los receptores de glucocorticoides (GR) y receptores de ácido retinoico (RAR) están constitutivamente expresados en macrófagos, la expresión de PPARg se incrementa durante su diferenciación. Dicha expresión es aumentada durante la respuesta inflamatoria y puede ser inducida in vitro por IL-4 y otras moléculas inmunoreguladoras. En un estudio más reciente, se ha demostrado que macrófagos peritoneales infectados con BCG presentan una inducción de la expresión y actividad de PPARg, teniendo esto implicancias en la inflamación, en el metabolismo de lípidos, y la patogénesis. En este trabajo se demuestra que el uso de un antagonista de PPARg, GW 9662, mejora la capacidad microbicida de los macrófagos infectados con BCG, reforzando el concepto de que PPAR es un regulador negativo en macrófagos [22].

Los estudios más importantes que demuestran el efecto antiinflamatorio de los ligandos de PPARg han sido demostrados en macrófagos, sin embargo su funcionalidad también ha sido reportada en esplenocitos. Se demostró que ciglitazona, ligando de PPARg disminuye la producción de IFN-gamma y IL-12 en esplenocitos activados por mitógenos, e incluso se ha encontrado que afecta la proliferación de los esplenocitos [23]. En el mismo trabajo se ha demostrado que la expresión génica de PPARg está aumentada en los linfocitos T activados por mitógenos y es positivamente regulado por IL-4.

Otro componente del sistema inmunológico son las células dendríticas donde se ha observado expresión de PPARg y se ha demostrado que los ligandos de PPARg tienen varios efectos en la función inmune de éstas células, inhibiendo su maduración y reprimiendo la expresión de moléculas coestimuladoras, como CD80. Además los ligandos de PPARg también reprimen la producción de IL-12 y quemoquinas como CXCL10 y RANTES. Como resultado de estos cambios, las células dendríticas expuestas a estos ligandos reducen su habilidad de estimular la proliferación de linfocitos y la activación de la respuesta antígeno específica [24,25].

4-PPARg y NF-kB

El factor de transcripción NF-kB (nuclear factor-kB) regula genes involucrados en varios aspectos de la respuesta inflamatoria. En respuesta a diversos estímulos pro-inflamatorios, como citoquinas, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), estrés (estrés oxidativo o radiación UV), NF-kB induce genes que incluyen citoquinas, quemoquinas, y moléculas de adhesión, las cuales son esenciales tanto para la respuesta inmune innata como adaptativa [26].

La vía canónica de NF-kB, está caracterizada por la activación del heterodímero p50:p65 (Rel A), previa degradación de su inhibidor, IκB-alfa y beta. Para que el inhibidor sea degradado por el sistema de proteasoma debe ser fosforilado por una quinasa, denominada quinasa del inhibidor de NF-kB (Fig 4).

Los macrófagos son fenotípicamente heterogéneos, su fenotipo está determinado por el microambiente. Varias subpoblaciones de macrófagos han sido descritas, existiendo 2 fenotipos bien caracterizados. El clásicamente activado por IFN-gamma (M1) responsables de la actividad bactericida, que secretan altas cantidades de citoquinas proinflamatorias y promueven la respuesta inmune adaptativa. Por otro lado macrófagos activados “alternativamente” (M2), surgen en respuesta a IL-4 ó IL-13, y han sido asociados con la respuesta a distintos parásitos, anti-inflamación y reparación de heridas. Se ha demostrado que la actividad de la quinasa del inhibidor de NF-kB en macrófagos M1 en respuesta a infecciones es tejido específica [27]. IKK está involucrada en la supresión del fenotipo antiinflamatorio M1 y favorece el desarrollo de macrófagos de macrófagos antiinflamatorios M2, quienes están asociados a la promoción del cancer. Se ha demostrado también que la inhibición del IKK, en macrófagos asociados a tumor (TAM) genera un cambio en el fenotipo de un perfil M2 a un M1, caracterizado por un incremento de IL-12, inos y MHC II, y al mismo tiempo una disminución de IL-10 y Arginasa 1 [28].

Ricote y col describieron en 1998 [29] que PPARg es un regulador negativo en macrófagos. Allí, ellos demuestran que PPARg está marcadamente aumentado en macrófagos activados e inhibe la expresión de iNOS, MMP-9 en respuesta a 15-d-PGJ2 y ligandos sintéticos de PPARg. A su vez demostraron que PPARg inhibe la expresión génica en parte por antagonizar las actividades de factores de transcripción AP-1, STAT y

NF- κ B. Estos resultados sugieren la posibilidad de utilizar los ligandos sintéticos de PPAR γ como una herramienta terapéutica en enfermedades humanas como arteroclerosis y artritis reumatoidea donde macrófagos activados ejercen efectos patológicos.

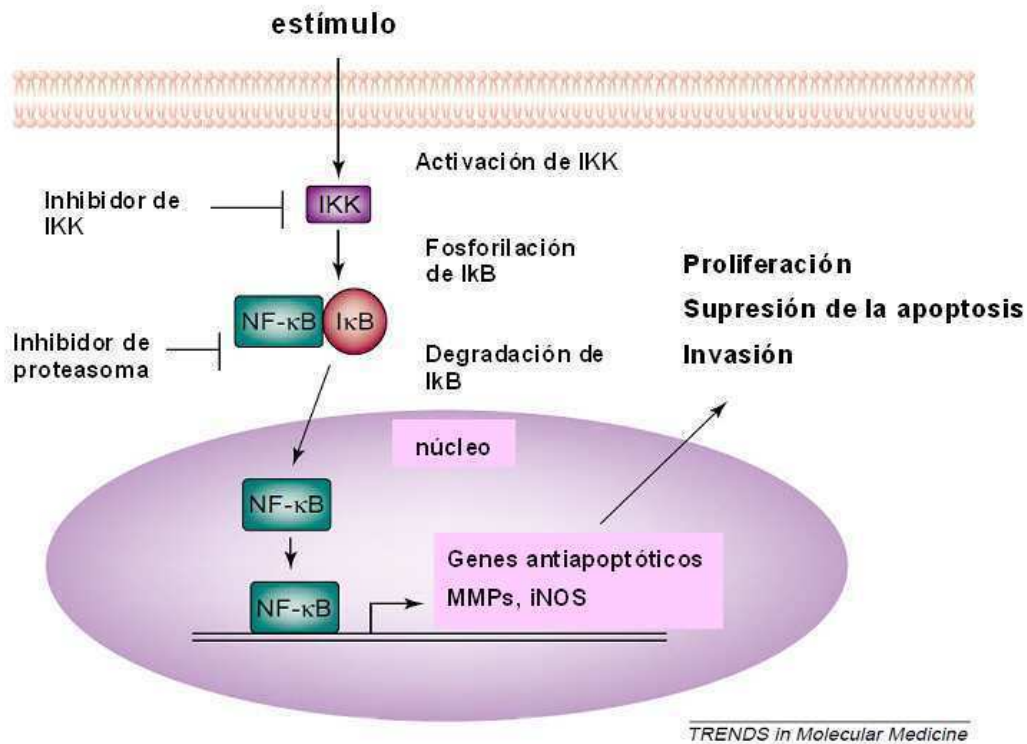


Figura 4. Modelo de activación de NF- κ B dado por una variedad de inductores. Los inductores de NF- κ B activan a la quinasa de I κ B (IKK), la cual permite la fosforilación en serina de una de las subunidades de I κ B. La fosforilación de ésta subunidad lleva a la ubiquitinación del mismo, para ser degradado por el proteasoma y permitiendo así, la traslocación y la acumulación de NF- κ B en el núcleo. Una vez en el núcleo, éste factor se une a regiones regulatorias, promotoras que estimulan la transcripción de genes asociados con oncogénesis, supresión de la apoptosis e invasión. Los inhibidores de la quinasa IKK, bloquean la actividad de NF- κ B a través de la supresión de la fosforilación de I κ B, y los inhibidores de proteasoma también bloquean la degradación de I κ B. Figura adaptada de Orłowski et al [27].

5- PPARg y cáncer

La amplia expresión de PPARg en muchos tumores y la capacidad de los ligandos de inhibir la proliferación celular, promover la diferenciación, inducir apoptosis e inhibir la angiogénesis llevaron a los investigadores a postular a PPARg como un posible blanco terapéutico. Se ha demostrado que los ligandos de PPARg tienen la capacidad de inhibir la proliferación de células derivadas de carcinoma de pulmón a través del incremento en la expresión del gen supresor de tumor PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) y p21 [30,31]. Los agonistas de PPARg también mostraron tener influencia en inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDK) como p18, p21 y p27 durante la adipogénesis en células normales y líneas celulares de carcinoma hepatocelular [32,33]. También se demostró que troglitazona es capaz de inducir p21 arretando en fase G1 a células de páncreas [34].

PPARg también se expresa en las células epiteliales, incluyendo las células uroteliales de roedores y humanos, en los tumores de vejiga transicionales y las líneas derivadas de éstas células. La función en el urotelio es desconocida y el descubrimiento de que PPARg se expresa en las células tumorales uroteliales ha planteado preguntas sobre su función y la de sus ligandos en el cáncer de vejiga. Sin embargo, este punto es aún poco conocido y controversial. En cuanto a la utilización de los ligandos de PPARg como agentes antitumorales, varios estudios utilizando el antagonista selectivo de PPARg GW9662 revelaron que la inhibición del crecimiento de células de distinto tipo involucraba mecanismos tanto dependientes como independientes de PPARg [35].

La mayoría de los trabajos que proponen el uso de ligandos de PPARg como agentes antitumorales han sido realizados in vitro, utilizando distintos tipos de líneas celulares tumorales. En el año 2008, se ha publicado en un modelo in vivo utilizando ratas, que la RO es capaz de promover el desarrollo de tumores de vejiga inducidas por hidroxibutil (butil) nitrosamina [36].

6- PPARg y fibrosis

Distintos modelos de roedores muestran que los ligandos de PPAR, como RO y pioglitazona, significativamente pueden atenuar el proceso de isquemia y reperfusión inducido en lesiones de pulmón. El mecanismo consiste en la inhibición de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y la infiltración de células polimorfonucleares en el intersticio pulmonar, resultando en un edema pulmonar reducido [37].

El término fibrosis pulmonar abarca a varias enfermedades para las cuales no hay tratamiento efectivo. Todos tienen una similar patología caracterizada por una respuesta inmunitaria muy parecida un fenotipo Th2, la proliferación, acumulación de miofibroblastos y el depósito excesivo de proteínas de la MEC en el parénquima pulmonar. En los seres humanos, el tratamiento quimioterapéutico del cáncer con bleomicina induce la fibrosis pulmonar intersticial. En cultivos de fibroblastos de pulmón humanos, agonistas de PPARg interrumpen los efectos profibróticos del TGF- β [38]. Del mismo modo, los ratones sometidos a la administración intratraqueal de bleomicina desarrollan fibrosis pulmonar, que es significativamente reducida por los agonistas PPARg. Como era de esperar, este efecto en la reducción de la fibrosis es atenuado por el antagonista de PPARg, el bisfenol A diglicidiléter (BADGE), lo que sugiere que la actividad de PPARg es imprescindible para la protección [39].

Los agonistas de PPARg, RO y pioglitazona no sólo tienen efectos protectores en el proceso de isquemia y reperfusión, sino también en daños localizados en el riñón que incluyen nefropatías diabéticas, hipertensivas, daño renal inducido por ciclosporina, entre otras. Esta protección refleja tanto un metabolismo de la glucosa mejorado y resistencia a la insulina, como efectos antiinflamatoria, antifibróticos y antiapoptóticos de los ligandos de PPARg. Los mecanismos implicados en estas propiedades benéficas son similares para los ligandos sintéticos y para los naturales como la ciclopentanona 15-d-PGJ2. Los mecanismos de acción involucran la activación de NF-kB, junto con la reducción en la expresión y/o actividad de AP-1, TGF- β 1, proteína quimioattractante de monocitos (MCP-1), ICAM-1, iNOS, fibronectina, y colageno I. El resultado de estos cambios de señalización incluye atenuación de la infiltración de células polimorfonucleares en los tejidos reduciendo el estrés oxidativo y la inflamación [40].

Hipótesis

PPARg está involucrado en el mecanismo de acción antitumoral de BCG y está asociado a la progresión tumoral en el CaV.

Objetivos Generales

- 1- Estudiar los mecanismos ejercidos por BCG en células de cáncer de vejiga, focalizándonos en el rol de PPARg.
- 2- Analizar los mecanismos antitumorales de BCG in vivo, estudiando el rol de PPARg y sus ligandos.
- 3- Desarrollar y caracterizar un nuevo modelo murino de cáncer de vejiga.
- 4- Evaluar la expresión de PPARg en el modelo obtenido y en muestras de tumores de vejiga humanos.

Materiales y métodos

Líneas celulares.

La línea celular murina de Cáncer de vejiga MB49 (cedida por el Doctor E.C. Lattime, Thomas Jefferson la Universidad, Filadelfia, PA) y la nueva línea de célula invasiva descrita aquí (MB49-I) fueron cultivadas en RPMI-1640 (Sigma, St Louis, Missouri), la línea T24 fue cultivada con MEM (GIBCO Cat 41500-034) todos suplementado con glutamina (2mM), gentamicina (80 ug/ml) and 10% de suero fetal bovino en una atmosfera humidificada con 5% de CO₂. Línea de fibroblastos NIH-3T3 cultivada en medio DMEM baja glucosa (GIBCO, Cat. # 31600-026) suplementado con 10% de SFB, 1% de Glutamina y 1mM penicilina – estreptomycin. La línea de macrófagos RAW 264.7, que fue cedida por la Dra. María I. Colombo (investigadora del CONICET). La línea se cultiva en medio DMEM (GIBCO, Cat 31600-034) baja glucosa suplementado con 10% de SFB, 1% de Glutamina y 1mM penicilina – estreptomycin.

BCG

Se utilizaron organismos vivos de la cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* correspondientes al Bacilo Calmette Guerin (BCG), cepa Pasteur 1172 P2, que contiene 3×10^6 UFC/mg, producida en el Instituto Nacional de Producción de Biológicos A.N.L.I.S. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina.

Análisis de la viabilidad celular por MTS

Se sembraron, en multiplacas de 96 pocillos 1×10^4 células por pocillo y, al día siguiente cuando las células se encontraban en su fase de crecimiento exponencial, se incubaron con los diferentes tratamientos en medio completo durante 24 h, al menos por triplicado. Se

utilizaron diferentes concentraciones de 15-d-PGJ2 (Cayman Chemycal USA Cat 18570.1), de Rosiglitazona (Elea, Buenos Aires), BADGE (FLUKA Chemical GmbH, Buchs, Switzerland). Se estimó la viabilidad celular a partir de la medición de la actividad metabólica mitocondrial por el método de MTS (Promega) según indicaciones del fabricante. Brevemente, las células fueron incubadas con 20 μ l de MTS + 1 μ l PMS cada 121 μ l de medio sin suero a 37°C durante aproximadamente 45 min. En ese momento se midió la densidad óptica a 492 nm por medio de un lector de ELISA y el % viabilidad se calculó como la razón entre el promedio de los pocillos tratados y el de los controles.

Evaluación de la producción de Óxido Nítrico

Se sembraron 1×10^4 células por hoyo en placas de 96 hoyos en medio completo, dejando libres los hoyos del borde los que fueron luego llenados con PBS. Una vez que se adhirieron se les cambió el medio por medio sin FBS y con los distintos tratamientos y se las incubó por toda la noche con la caja sellada para evitar la entrada de NO exógeno. A la mañana siguiente se cosecharon los medios condicionados y se sometieron a la reacción de Griess modificada [41]. Debido al requerimiento de pH, la modificación que realizamos fue agregar 1% de HCl fumante a la reacción. Diferentes concentraciones de nitrito de sodio fueron usadas para construir una curva standard. La absorbancia fue medida a 550 nm por medio de un lector de ELISA y el % viabilidad se calculó como la razón entre el promedio de los pocillos tratados y el de los controles.

Evaluación de la capacidad fagocítica.

3×10^5 células/ml RAW 264.7 fueron tratadas durante 24 h con RO 10 μ M. Luego de 1 h de incubación con BCG 1 mg/ml (2×10^6 UFC) fueron lavados 2 veces con PBS y lisados con saponina al 5 %. Diluciones seriadas fueron sembradas en medio sólido Lowenstein

Jensen y las colonias se cuantifican luego de 30 días, se informa como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml).

Coloración de Zhiel Neelsen

1×10^6 de macrófagos peritoneales por ml o 3×10^5 RAW 264.7 por ml fueron plaqueados sobre vidrios y posteriormente incubados con BCG 2×10^6 CFU/ml durante 2 h. Luego son lavados con PBS y fijados con metanol durante 20 min previo secado total. Luego se lavan suavemente con agua desionizada e incubados en fucsina 100% durante 1 h. Se lava con decolorante ZN (ácido clorhídrico 3% en alcohol etílico 95%) hasta decoloración. Se lava y se incuba en azul de metileno durante 20 min. Luego de lavar se fija en porta. Las Micobacterias en el interior de las células se observan en una coloración rosa fuerte y se procede a la cuantificación.

Ensayo de gen reportero

9×10^6 células MB49 ó RAW 264.7 son resuspendidas en 4.8 ml de OPTIMEM (GIBCO), en ausencia de SFB para luego agregar 1.2 ml de una mezcla del plásmido correspondiente, PPAR-LUC ó NF- κ B-LUC, previamente incubados con el plásmido de Renilla (de expresión constitutiva) y LIPOFECTAMINA 2000 (Invitrogen) durante 20 min. (10 ug de DNA plásmido LUC: 1 ug DNA plásmido Renilla). Estos plásmidos contienen la secuencia correspondiente al elemento de respuesta del factor de transcripción abajo del gen de luciferasa. Luego de la incubación de plaquean las células en placa de 24 hoyos, con 250 ul por hoyo se dejan incubando 24 h. Las células reciben los distintos tratamientos (BCG 2 mg/ml para MB49 ó 1 mg/ml para RAW 264.7, RO 10 μ M ó 15-d-PGJ2 10 μ M) y se dejan incubando 24 h más. Trascorridas las 24 h las células son cuidadosamente lavados con PBS y se procede según las instrucciones del kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Se agrega 100 ul de buffer de lisis por

hoyo, dejándolas en agitación durante 20 min. A cada tubo se le agrega 25 ul de LAR II más 5 ul de lisado. Se lee la lumiscencia en luminómetro (Contador de centelleo líquido (LSC) Triathler, Hidex). Luego de la lectura correspondiente a la luciferasa, para leer la correspondiente a la Renilla se agregan 25 ul de STOP and GLO por tubo, y se vuelve a leer. Las cpm/seg correspondientes a luciferasa se relativizan a las de Renilla, expresando las unidades en Actividad LUC/Renilla.

Immunofluorescencia

Células tumorales fueron cultivadas en cámaras con medio completo. Monocapas subconfluentes fueron lavadas con cuidado con buffer salino frío y luego procesadas para inmunofluorescencia. Los vidrios fueron fijados con formol el 4 % en PBS durante 15 minutos y luego permeabilizadas con Tritón 0,2% en PBS. El pegado inespecífico fue bloqueado con 0.1 % Tween-20 más 2 % SFB en PBS durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas fueron incubadas a lo largo de la noche (OverNight) con anticuerpo policlonal de conejo anti-PPAR γ (SC-H100, dil 1:100) anti-VM ó anti-cytokeratin 18 (ck18) (Abcam, Cambridge, 1:100). Como anticuerpo secundario se utilizó IgG de cabra anticonejo conjugado con fluoresceína. (Chemicon Internacional, la S.A., 1:150). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las fotografías fueron observadas en un microscopio Eclipse de Nikon E400 y fotografiadas con una cámara digital, Nikon Refresca PIX 995, en una amplificación 400X.

Immunohistoquímica

La tinción inmunohistoquímica con anticuerpos específicos, se realizó utilizando el sistema de estreptoavidina-biotina peroxidasa y diaminobencidina como reactivo de color. Brevemente, las muestras fueron desparafinadas y tratadas con peróxido de hidrógeno al

0,6 % en metanol durante 30 minutos para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Posteriormente, se efectuó la recuperación antigénica tratando las muestras con microondas en buffer citrato (pH 6); seguidamente las muestras se pre-incubaron con suero normal de conejo (1:10) por una hora (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Luego son lavadas 3 veces con PBS durante 5 min y se incuban a 4 °C, con anticuerpo específico anti-PPAR γ (sc-H-100; 1:100); SMA-alfa (sc-53142, dil 1:100) and FGF-2 (2.5 ug/ml) desarrollado por A. Baldi [42]; CD31-PECAM (M-20 sc-1506, Santa Cruz Biotechnology); CB (FL-339 sc-13985, Santa Cruz Biotechnology, 1:500), panK (DAKO-ae1ae3, 1:100) y a VM (ZYMED V9, 1:100) durante toda la noche. Al día siguiente, los cortes histológicos, se lavan 3 veces con PBS y se incuban con el segundo anticuerpo un anti IgG de conejo biotinilado, (Vector Laboratories, Inc.) diluido 1:500 por 30 minutos, seguidamente se tratan con el complejo de peroxidasa-estreptoavidina diluida en PBS 1:3000 durante 5 minutos. La reacción de coloración se realizó con 3,3' diaminobencidina al 0,02 % y peróxido de hidrogeno al 0,01 %, con contratinción con hematoxilina por 1 minuto. Como un control negativo, el anticuerpo primario fue omitido en cada caso. Para evaluar la deposición de colágeno, se realizó una tinción tricrómica de Masson previamente descripta. (Carson F.L: Histotechnology. A self-instructional test. ASCP Press, Chicago, 1990.)

Western Blot

Los extractos proteicos (50 μ g) se resolvieron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con SDS (para iNOS, 8 % y para PPAR γ , iKB-alfa, NF-kB 10 %) y fueron electrotransferidos a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon por 1 h a temperatura ambiente en buffer de bloqueo: 5% leche descremada en PBS + 0.1% Tween 20 (PBS-T) e incubaron a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario específico en buffer de bloqueo, anti-PPAR γ (sc-H-100; 1:200); iNOS (sc-651; 1:200), IkB-alfa (sc-847, 1:200). Luego de 3 lavados de 10 min con PBS-T, las membranas se incubaron por 1h a temperatura ambiente con anticuerpo secundario acoplados a peroxidasa diluidos en buffer de bloqueo anti conejo (Sigma, Cat. # A9169, 1 :5000). Luego de 3 lavados de 10

min con PBS-T, se reveló con Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, RPN 2134) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente, placas radiográficas se expusieron a la quimioluminiscencia y se revelaron con las máquinas de revelado existentes en el servicio de radiología del hospital. Las membranas fueron estripeadas y vuelta a incubar con un antierpo anti-actina-Beta (Sigma, AC-40, 1: 20.000). En este caso se utilizó un Ab secundario anti ratón, (Sigma, Cat. # A9917 1:5000).

Ensayo de crecimiento tumoral in vivo de la línea MB49

Se inocularon ratones C57/BL6 ó atímicos en el flanco izquierdo de forma subcutánea con 1×10^5 células de CaV MB49 por ratón. Luego los ratones se dividieron en cuatro grupos: inoculados dos veces por semana intra-tumoralmente con PBS (control) o con BCG (2mg/ml) y con o sin Rosiglitazona disuelta en el agua de la bebida (8 mg/kg ratón por día) (grupos RO y BCG+RO respectivamente). Se registra el crecimiento tumoral 2 veces por semana. En el ensayo con la cepa C57/BLJ6, a los 15 días se sacrifican los animales y se extraen los macrófagos peritoneales de ratones portadores de tumor MB49 de los 4 grupos por lavado de la cavidad peritoneal con PBS-EDTA estéril. Estos macrófagos se utilizan para obtener MC para los ensayos in vitro de medición de la actividad metabólica, producción de NO, índice fagocítico, descriptos previamente.

En los experimentos donde se utilizó el antagonista de PPAR γ , BADGE, éste fue inoculado intratumoralmente en una dosis de 100 μ M/en 100 μ l por ratón, dos veces por semana. El tamaño tumoral fue calculado como $\sqrt{(D \times d)}$, siendo D y d los diámetros correspondientes al largo y ancho del tumor (mm).

Generación de la línea celular de cáncer de vejiga invasora MB49-I

Suspensiones monocelulares de línea celular tumoral de vejiga MB49 (5×10^5 las células) fueron inoculadas sc en el flanco de ratones machos. Después de 24 días los tumores fueron removidos quirúrgicamente y pequeños trozos de aprox. 2 mm de tumor fueron trasplantados por trocar en el flanco izquierdo de ratones. Este proceso fue repetido 13 veces consecutivas. Entre el trasplante 6 a 10 el índice de crecimiento fue aumentando. Después de estos pasos el índice de crecimiento se hizo estable. Se realizó el cultivo primario del trasplante 13 por disgregación de tumor en forma mecánica. Las células fueron ajustadas a 5×10^5 células viables/ml y cultivadas en frascos de cultivo T25 (Greiner Labortechnik GmbH, Maybachstrabe 2, la D 72636 Frickenhausen). Luego de 24 h las células adheridas fueron tripsinizadas y la viabilidad fue determinada por la prueba Trypan Blue. Esta línea celular fue llamada MB49-I y sólo fueron usadas en bajos números de repiques in vitro (uno a diez) para los estudios subsecuentes.

Ensayo de crecimiento tumoral in vivo de las líneas MB49 y MB49-I

Durante la caracterización del modelo ortotópico con distinto grado de invasión, fueron inoculados en el flanco izquierdo ($n=10$ /grupo) con 1×10^5 células MB49 o MB49-I en 100 μ l de RPMI 1640 por ratón (crecimiento heterotópico). El crecimiento tumoral fue registrado dos veces por semana midiendo dos diámetros perpendiculares utilizando la fórmula: $D \times d^2$ (mm^3), donde la D es el diámetro más largo y la d el más corto, fue usado calcular el tamaño de tumor. Para evaluar la metástasis espontánea pulmonar un nuevo juego de experimentos fue realizado donde los ratones fueron sacrificados al mismo tamaño tumoral, aproximadamente 400 mm^3 .

La inoculación de tumor intravenosa (iv) y subcutánea (sc) y se realizó en ratones machos de seis a ocho semanas de edad mientras que para la inoculación de tumor de vejiga ortotópico se utilizaron hembras ambos de la cepa C57BL/6J de nuestro Bioterio.

El cuidado de animal fue proporcionado conforme al procedimiento perfilado en la Guía para el Cuidado y el Empleo de Animal de laboratorio (NIH publicaciones 1986). Los ratones fueron eutanasiados con CO₂ cuando mostraron discomfort o en el tiempo descrito en cada experimento. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional de uso de animales de laboratorio "CICUAL". Res (CD) 2079/07. Secretaría de Ciencia y Técnica, Facultad de Medicina, U.B.A.

Implantación ortotópica de líneas tumorales de vejiga

Como las hembras tienen uretra más corta que machos, la inoculación ortotópica fue realizado en ratones C57BL/6J hembras. Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina (70mg/kg) más xylazina (5 mg/kg). La orina fue evacuada de la vejiga con presión suave sobre el abdomen. Un catéter cubierto de teflón de 24G fue introducido en el lumen de la vejiga por la uretra. Se realizó una electrocauterización puntual para inducir el daño en la pared vesical. Diferentes números de las suspensiones de células MB49 y MB49-I (1×10^3 , 1×10^4 y 1×10^5) obtenido de monocapa subconfluente fueron instilados en 100ul de RPMI 1640.

La viabilidad de células siempre fue más alta que el 95 %. Los ratones fueron supervisados dos veces por semana, evaluando la presencia de hematuria y por la palpación externa de la vejiga. Dos semanas después de la inoculación de las células los animales fueron sacrificados. El peso de vejiga fue medido y los ratones fueron examinados cuidadosamente para evaluar la presencia de metástasis. Las muestras de vejigas, pulmones, y ganglios inguinales y paraórticos y cualquier otro tejido de aspecto anormal fueron fijados en la formalina incluidos en parafina y procesados para la histología. Los cortes de tejido fueron teñidos con Hematoxylina-eosina (HE) y examinadas bajo microscopio.

Metástasis experimentales

Ratones machos fueron inyectados en la vena de cola (iv) con 5×10^4 células MB49 ó MB49-I en medio RPMI 1640. Siete días después de la inoculación los ratones fueron sacrificados y examinados para evaluar la presencia de metástasis. Los pulmones fueron removidos, fijados en la formalina y el número de nódulos superficiales fue determinado bajo el microscopio estereoscópico (6.5 a 50X).

Preparación de medio condicionado (MC) y homogenato de tumor

Monocapas semiconfluentes de células creciendo en placas de 35 mm fueron extensivamente lavado con PBS. Medio sin suero (1 ml) fue añadido y luego las células se incubaron 24 h. El MC fue cosechado y el número de células en la monocapa fue cuantificado. Las muestras de MC fueron alicuotados y almacenados a -80° C. Estas alícuotas fueron usadas sólo una vez después de descongelarlas.

Para obtener homogenatos muestras de tumor fueron suspendidas en buffer (50 mM Tris-HCl (Ph:8); 100 ug/ml NaCl; el 1 % Tritón. Los tejidos fueron homogeneizados dos veces durante 10 segundos cada uno en una potencia del 70 % usando un Ultra Turrax T25 (Janke y Kunkel, IRA Labortechnik). El contenido de proteína fue determinado por el método de Bradford.

Determinación de la actividad de MMPS y uPA

La actividad de metaloproteasas fue determinada por electroforesis midiendo su actividad colagenolítica en geles de gelatina (0.1%) copolimerizada con SDS-polyacrylamida gel electrophoresis. Las bandas fueron identificadas por imagen negativa con Coomassie blue

y cuantificadas con un Imaging Densitometer GS-700 (Bio Rad). Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias (UA)/10⁴ células.

La actividad de uPA fue determinada a través de un ensayo de caseinólisis radial en agarosa. La zona de degradación radial fue determinada y luego interpolada en una curva estándar con uroquinasa cuyo rango fue de 0.1 a 10 IU/ml, y los resultados fueron expresados como Unidades Internacionales de uroquinasa (IU)/10⁴ células. La actividad de MMPs y uPA fue también evaluada en tejido tumoral generado con ambas líneas celulares. Las muestras fueron homogeneizadas en buffer (50 mM Tris-HCl (pH:8); 100 µg/ml NaCl; 1% Triton). Los tejidos fueron procesados dos veces durante 10 segundos al 70% de la potencia de Ultra Turrax T25 (Janke & Kunkel, IRA Labortechnik). El contenido proteico fue determinado a través del método de Bradford.

Ensayo de invasión in Vitro

Para el ensayo de invasión se utilizaron cámaras de cultivo de células Transwell (Corning). Los filtros usados (8 µm de poro de membrana) fueron previamente adheridos con 0,1% de gelatina en la zona inferior y con una fina capa de membrana basal reconstituida. (Matrigel, 250 µg/ml) sobre la cara superior de la cámara. La cámara inferior contuvo fibronectina celular humana (16 µg/ml) (Sigma) en 0.5 ml MEM, como quimioattractante. 2 x 10⁵ células fueron sembradas en el compartimiento superior de la cámara y 24 h después las células en el compartimiento interior del filtro fueron completamente removidas con la ayuda de un hisopo de algodón. Luego las membranas removidas fueron fijadas en Carnoy y teñidas con Hoescht 33258. Las células que han pasado a través de los poros a la superficie inferior del filtro fueron consideradas como invasoras y los núcleos de estas células que han invadido el Matrigel son contados en un campo de 400X bajo microscopio de fluorescencia (Eclipse E400, Nikon). Los datos se expresan como número de células por campo, habiendo contado al menos diez campos de cada grupo.

Determinación de la actividad enzimática de CB

La actividad de CB (EC: 3.4.23.1) fue determinada en ambas líneas celulares MB49 y MB49-I y también en homogenatos de tumor de vejiga y subcutáneos utilizando un método colorimétrico. Para el caso de líneas celulares, 5×10^6 se resuspenden en 100 μ l del detergente no iónico Brij 0,1% para luego resuspenderlo en buffer de activación (88 mM KH_2PO_4 , 12 mM Na_2HPO_4 , 1.33 mM EDTA Y 2.7 mM de cisteína, pH=6), el volumen fue ajustado con agua hasta 1 ml. Luego de la incubación de 15 min a 37 °C 30 nmol de sustrato específico de dicha enzima (N-CBZ-Val-Lys-Lys-Arg-4-methoxy β -naphthylamine) fue agregado para preceder a incubarlo durante 10 min a 37 °C. La reacción fue detenida por la adición del reactivo de color (Fast Garner + Acido Mersalil, Sigma St. Louis) y se midió la absorción a 520 nm. Para el caso donde se utilizó tejido tumoral, los tumores frescos fueron resuspendidos en buffer (50 mM Tris-HCl (pH=8); 100 μ g/ml NaCl; 1% Triton), homogeneizados como se describió previamente, ajustando a proteínas. Se procedió de igual manera que para las líneas celulares.

Diferentes concentraciones de papaína purificada (EC: 3.47.22.2) fueron usadas para la confección de una curva estándar. El inhibidor específico de CB, CA074-Me (CA) fue utilizado como control de especificidad.

Ensayo de angiogénesis

En los cortes teñidos para CD31, marcador de células endoteliales, luego de la cuantificación del número de vasos se procedió a tomar al menos 10 fotografías de distintos campos provenientes de distintos ratones de cada uno de los dos grupos. Estas fotos se abrieron con el programa Image-Pro Plus 6, para medir el área total ocupada por los vasos sanguíneos estandarizando a una medida estándar previamente fijada. Por campo, por ejemplo 0,17 mm^2 en un campo de 400X.

Análisis del Cariotipo. Citogenética

Células creciendo en semiconfluencia fueron tratadas con 0,5 µg/ml colchicina (Life Technologies Inc.) durante 2 horas a 37° C, separadas con 0,25% de tripsina. Luego se realizó el tratamiento hipotónico en 0,075 M de cloruro de potasio durante 20 minutos a 37 °C y las células fueron fijadas con ácido acético glacial frío en proporción 3:1. Las metafases fueron analizadas usando la técnica de Bando G [43]. El número de cromosomas fue expresado como el número modal, el número de cromosomas más frecuentes encontrado después de analizar 100 metafases. Los cromosomas fueron identificados en base a su patrón de bandedo de acuerdo al Comité de nomenclatura estándar genética murina. (Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice, 1976).

Análisis estadístico

Todos los resultados son expresados como media +/- SD. Los ensayos de viabilidad, producción de NO, actividad enzimática, invasión y gen reportero fueron realizados al menos por triplicado. Las diferencias significativas fueron calculadas por ANOVA con comparaciones de Bonferroni ó prueba de t de Student. El número de metástasis pulmonares es expresado como mediana (rango) y la significancia estadística fue calculada por la prueba de Mann-Whitney. Las diferencias entre proporciones fueron evaluadas con la prueba de Chi-cuadrado. El análisis de la expresión de PPAR γ en pacientes fue analizado por Test Exacto de Fisher. El Graph Pad InStat statistical package (versión 3.01) fue usado para evaluar la significación estadística. Todos los experimentos fueron repetidos entre dos ó tres veces con resultados similares.

Capítulo 1

Rol de PPARg en el cáncer de vejiga bajo tratamiento con BCG

Objetivos:

1. Estudiar los mecanismos ejercidos por BCG en células de CaV, focalizándonos en el rol de PPARg
2. Analizar los mecanismos antitumorales de BCG in vivo, estudiando el rol de PPARg y sus ligandos.

Introducción

1-Tratamiento: inmunoterapia con BCG.

El CaV ocupa en nuestro país el octavo lugar en mortalidad por cáncer en el hombre con una tasa de 4,8 por 100.000/año, mientras que en la mujer es de 0,9 por 100.000/año. La estrategia terapéutica es definida acorde con el estadio de la enfermedad y depende de sí el tumor es superficial o invade músculo.

La cirugía es la base del tratamiento estándar. La resección endoscópica transuretral (RTU) es el principal tratamiento quirúrgico en la enfermedad superficial. Luego de la RTU del carcinoma urotelial de alto grado, la inmunoterapia intravesical de una suspensión de bacilos Calmette – Guerin (BCG) es el tratamiento más efectivo para la profilaxis de la recurrencia y la progresión de la enfermedad superficial a invasora. Sin embargo, en casos donde los pacientes presentan efectos adversos por administración de BCG se puede emplear quimioterapia endovesical (mitomicina o doxorubicina) [13].

El tratamiento aceptado para el CaV que invade músculo está representado por la cistectomía radical y en unos pocos países la terapia radiante. La cistectomía radical es el estándar de oro, redituando la mayor sobrevida para los pacientes con enfermedad invasora [44]. En los últimos 10 años refinamientos técnicos en el campo de la derivación urinaria, empleando diferentes segmentos del aparato digestivo, permiten una mejor calidad de vida en la mayoría de los pacientes.

En la enfermedad localmente avanzada y en la enfermedad metastásica, la quimioterapia sistémica, con Metotrexato, Vinblastina, Adriamicina y Cisplatino (M-VAC), puede dar respuesta en aproximadamente la mitad de los pacientes.

En 1976, Morales et al, propuso inicialmente el tratamiento con BCG intravesical para los tumores superficiales de vejiga, como se mencionó anteriormente [45]. En la actualidad, la terapia con BCG intravesical se utiliza en el carcinoma in situ, cáncer de vejiga Ta y T1 de alto grado como profilaxis para la recurrencia y progresión del cáncer de vejiga [46]. En resumen, la administración intravesical de BCG es más potente en la prevención de la recurrencia del tumor que cualquier quimioterapia intravesical [47]. Además del efecto antitumoral directo se han propuesto varios mecanismos inmunológicos asociados a esta inmunoterapia. Aunque no podemos precisar la secuencia de eventos en la cascada de respuesta inmune que se produce tras el tratamiento con BCG intravesical, la secuencia

puede ser el siguiente: BCG se adhiere al epitelio urinario (normal y tumoral) a través de la interacción con la fibronectina. [48,49]. Además de la fibronectina, se ha sugerido que los receptores tipo Toll (TLR) -2 y -4, presente en las células inmunes, median respuestas inmunitarias inducidas por BCG [50]. Una vez internalizada, BCG es procesada tanto por células profesionales presentadoras de antígeno (APC) y por células uroteliales, lo que resulta en la modulación de la expresión genética [51]. Esta fase corresponde a la liberación temprana de citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-6 e IL-8 en el ser humano) que pueden ser responsables de ciertos efectos adversos. La segunda fase consiste en el reconocimiento de antígenos bacterianos por los linfocitos CD4, las cuales liberan principalmente IL-2 e IFN- γ (respuesta TH1). Las células tumorales expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad llevando el proceso a una tercera fase donde se amplifican las poblaciones de linfocitos T CD8+ y gamma-delta, macrófagos y natural killers. Todos estos tipos celulares liberan citoquinas que regulan la respuesta a BCG induciendo muerte de células tumorales remanentes.

En un estudio en pacientes con cáncer de vejiga se informó que después de la terapia con BCG, varias citoquinas como GM-CSF, TNF- α , IL-1 β , IL-8, IFN- γ e IL-12 son secretadas, siendo partícipes de la cascada de la respuesta inmune. Los autores de este trabajo sugieren que los niveles urinarios de TNF- α podrían ser esenciales en la actividad antitumoral después de la terapia con BCG [52].

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado que BCG induce la expresión y actividad en catepsina B. Se sabe que CB es capaz de clivar caspasas involucradas en el proceso apoptótico, evaluamos el rol de esta enzima en la muerte celular inducida por BCG. Hemos observado que BCG induce apoptosis en células tumorales de CaV humanas y murinas, donde se observa clivaje de procaspasa 9 y BID, ambas moléculas claves en la vía intrínseca de la apoptosis. Este proceso de inducción de muerte celular es bloqueado en presencia de CA-075, un inhibidor específico de catepsina B, sugiriendo que esta enzima está involucrada en la inducción de muerte generada por BCG [53].

2- Macrófagos

Los macrófagos tienen su origen en los monocitos de sangre periférica, ellos migran a los diferentes tejidos diferenciándose a macrófagos residentes. Son atraídos al sitio del daño tisular mediante estímulos quimiotácticos provocados por toxinas bacterianas o por granulocitos neutrófilos. Los macrófagos residentes reciben distintos nombres dependiendo del tejido en el que se encuentran. Así se nombran como macrófagos alveolares (pulmón), esplénicos (bazo), peritoneales, gastrointestinales, osteoclastos (hueso), microglia (sistema nervioso), células de Kupffer (hígado) e histiocitos en tejido conectivo. Los macrófagos tienen numerosas funciones y participan en la remodelación tisular, inflamación, inmunidad y trombosis. También pueden afectar el crecimiento y la progresión tumoral. Gracias a su capacidad fagocítica llevan a cabo la eliminación de desechos celulares y además, son importantes efectoras de la respuesta inmune participando tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa. En la innata, los macrófagos residentes proveen defensas inmediatas contra patógenos y coordinan el proceso de infiltración leucocitaria. Contribuyen a regular el balance entre la disponibilidad de antígeno y su remoción por fagocitosis, con la subsecuente degradación de células senescentes, apoptóticas, microbios y posiblemente células neoplásicas [54]. Su rol es esencial para dirigir el tipo de respuesta inmune adaptativa. Colaboran con los linfocitos T y B, tanto a nivel célula-célula, como mediante la liberación de citoquinas, quimiocinas, enzimas, radicales reactivos y metabolitos derivados del ácido araquidónico [55]. Los estímulos inflamatorios producen el reclutamiento y activación de macrófagos. A estos últimos también se los denomina macrófagos “activados”, para diferenciarlos de los no activados o “residentes” [56].

Estas células tienen una gran plasticidad y pueden cambiar su fisiología en respuesta al microambiente. Así, se ha descrito que los macrófagos pueden tener funciones pro o anti tumorales. Según las condiciones del medio ambiente pueden liberar citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-12 y TNF-alfa, o anti-inflamatorias como TGF-beta e IL-10 [54]. Los macrófagos productores de citoquinas inflamatorias son capaces de direccionar la respuesta hacia un perfil Th1 citotóxico contra las células tumorales. En los últimos años han aparecido trabajos mostrando que estas células son atraídas hacia el tumor pero cuando llegan a él son estimuladas a polarizarse hacia un perfil de secreción de

citoquinas antiinflamatorias, entre las cuales está la IL-10 que tiene funciones inmunosupresoras, lo cual estimulará el crecimiento de los tumores [57].

Los macrófagos son también importantes células involucradas en las tres etapas del proceso de reparación de heridas: Inflamación, Epitelización y Remodelación tisular. En este proceso participan no solo los macrófagos si no también los fibroblastos.

3-Óxido nítrico en el cáncer de vejiga.

El NO es producido en células de mamíferos por un grupo de enzimas denominadas NO sintasas (NOS). Se conocen tres isoformas de las NOS, codificadas por tres genes diferentes. La NOS neuronal (nNOS) fue inicialmente descubierta en cerebro. La NOS inducible (iNOS) se expresa principalmente en células inmunes. La NOS endotelial (eNOS) se expresa fundamentalmente en el endotelio vascular. Las isoformas nNOS y eNOS son dependientes de calcio y producen bajas concentraciones de NO, del orden de nanomoles. La inducción de la expresión de iNOS suele estar mediada por la presencia de citoquinas inflamatorias o por la de productos bacterianos. Esta isoforma, genera un incremento en los niveles de NO, del orden de micromoles [58]. La iNOS puede expresarse en varios tipos celulares de mamíferos como macrófagos, hepatocitos, células endoteliales e inclusive, en células tumorales.

El NO tiene un rol controversial en la biología tumoral, ya que hay evidencias de que puede tanto inhibir, como estimular el crecimiento de las células tumorales. Esta respuesta, es dependiente del tipo tumoral, la carga genética, los niveles de NO y de la susceptibilidad de las células blanco. Nuestro grupo de trabajo ha reportado que el NO es un factor de supervivencia para la línea celular MB49, ya que observamos que solo el tratamiento combinado de BCG más L-NAME inhiben el crecimiento tumoral iniciado el tratamiento una vez que los tumores eran palpables. Además el NO liberado por las células tumorales bajo tratamiento con BCG es capaz de lisar esplenocitos y macrófagos peritoneales, sugiriendo una función inmunosupresora [59].

Como se mencionó previamente, se ha observado que las células del endotelio vesical pueden producir NO luego del tratamiento con BCG, lo que llevó a la postulación de que este radical estaría mediando la muerte de células tumorales [60]. Sin embargo, en trabajos

previos de nuestro laboratorio se observó que iNOS no se expresa en la vejiga normal pero si lo hace en el 50% de los pacientes con CaV, detectándose tanto en el tumor como en tejido vesical sin tumor. Interesantemente se observó que en el 80% de los pacientes con CaV, cuyos tumores expresaban iNOS, presentaban recurrencia dentro de los 12 meses post-tratamiento. Por otro lado, solo el 20% de los pacientes que no expresaban iNOS recurrían en ese mismo tiempo. Estos resultados indican que la expresión de esta enzima, sería un factor de mal pronóstico para pacientes con CaV [61]. Posteriormente se ha publicado, que pacientes cuyos tumores de vejiga expresan iNOS son refractarios al tratamiento con BCG, reforzando la idea de que el NO favorecería el crecimiento tumoral o por lo menos se opondría a la inmunoterapia [62].

4-Rol del estroma en la biología tumoral

Por muchos años se ha dado importancia a la identificación de cambios moleculares como determinantes de la carcinogénesis. Esta fue considerada como un complejo proceso desarrollado en múltiples pasos durante los cuales la célula va acumulando alteraciones genéticas que la llevan a su malignización. Estos modelos centrados en las células tumorales y en el genoma han permitido la identificación y caracterización de oncogenes y genes supresores de tumor. Sin embargo, se ha prestado mucha menos atención a que los tumores son entidades complejas.

La progresión de un tumor depende de un dialogo entre diferentes tipos de células que forman el tumor y el tejido de soporte, denominado estroma [63], el cual incluye a la matriz extracelular (MEC) y un componente celular. Este último está formado por fibroblastos, células inmunes e inflamatorias y células que forman los vasos sanguíneos, aunque hay que destacar que su constitución varía considerablemente de tumor a tumor. Dependiendo de características intrínsecas del modelo, el estroma puede tanto inhibir como promover el crecimiento tumoral. Por ejemplo, el estroma puede ser modificado por las propias células tumorales y en consecuencia puede promover la progresión tumoral, mientras que se ha estudiado que el agregado de fibroblastos normales puede inhibir el crecimiento tumoral [64].

4.1 Fibroblastos

Los fibroblastos son las principales células del tejido conectivo y se encuentran embebidos en una matriz fibrilar que ellos mismos sintetizan. Dentro de las principales funciones que cumple los fibroblastos están la deposición de MEC, la regulación de la diferenciación del epitelio, la regulación de la inflamación y de los procesos desencadenados en la reparación de heridas. Ellos sintetizan varios de los componentes que constituyen la MEC como fibronectina y los colágenos de tipo I, III y V [65]. Contribuyen a la formación de la membrana basal mediante la secreción de colágeno IV y laminina. También son importantes remodeladores de la MEC, ya que liberan varios tipos de metaloproteinasas que son capaces de degradar distintos componentes de la MEC para, de esta manera, mantener su homeostasis [66]. Los fibroblastos participan en la homeostasis del epitelio adyacente mediante la secreción de factores de crecimiento y la interacción directa entre células epiteliales y mesenquimáticas. Además de este rol fisiológico también, tienen un rol prominente en la reparación de heridas. En estos casos, invaden la lesión y generan una MEC que sirve como andamiaje para ellos y otras células que participarán en el proceso de cicatrización. Poseen especializaciones del citoesqueleto que facilitan la contracción y cierre final de la herida [65]. Los fibroblastos aislados de una herida o de un tejido fibrótico se denominan fibroblastos activados, ellos secretan altos niveles de proteínas de la MEC y poseen una tasa de proliferación mayor que fibroblastos aislados de un tejido normal, se caracterizan por la expresión de actina de músculo liso alfa (SMA-alfa) [67]. Una vez que la herida es reparada, los fibroblastos disminuyen su actividad y recuperan su fenotipo normal. En algunos casos patológicos como las fibrosis crónicas o aún en el microambiente tumoral, los fibroblastos permanecen “activados”, sugiriendo que la activación constante de estas células podría conferirles propiedades pro tumorales [65]. El FGF-2 fue originalmente identificado como un factor de crecimiento básico que estimulaba la proliferación de la línea celular de fibroblastos NIH-3T3. En un contexto de cicatrización de una herida, factores de crecimiento como, el FGF-2 y TGF-beta secretados por MAC estimulan a los fibroblastos los cuales, como se dijo anteriormente son responsables de la síntesis, deposición y remodelación tisular [68]. Además, varios estudios han demostrado que el FGF-2 cumple un rol importante en el tejido fibrótico,

donde es incrementado en la fase aguda de la herida, jugando un rol en la formación del tejido de granulación, reepitelización y remodelación tisular [69].

4.2 Efectos de BCG y NO sobre el estroma tumoral

En nuestro laboratorio hemos realizado experimentos en un modelo de CaV murino tendientes a entender por que la expresión de iNOS y en consecuencia, la producción de NO, podría favorecer el crecimiento tumoral y oponerse al tratamiento con BCG. Nuestros resultados han demostrado que células de CaV murinas MB49, tratadas in vitro con BCG, producen NO, el cual induce citotoxicidad sobre células del sistema inmunitario, y funciona como un factor de supervivencia para células MB49 [59]. Mediante ensayos in vivo demostramos que tanto BCG como L-NAME (inhibidor de las NOS) inhiben el crecimiento de tumores subcutáneos generados con la línea MB49. Esta inhibición es potenciada por el tratamiento combinado de BCG + L-NAME. Mediante análisis histológicos observamos que la inhibición del crecimiento tumoral in vivo, generada por el tratamiento con BCG, como así también por el de L-NAME, está asociada a una acumulación de matriz extracelular rodeando al tumor. Este depósito de matriz es significativamente mayor en tumores tratados con BCG + L-NAME, donde se observa que las pocas células tumorales remanentes quedan rodeadas por fibras colágenas [59] (Fig 5). Estos resultados sugieren que la terapia con BCG + L-NAME pondría en marcha mecanismos similares a los que ocurren durante el proceso de cicatrización, en los cuales existe una colaboración activa entre macrófagos y fibroblastos. En base a estos antecedentes nos resultó interesante estudiar los mecanismos de remodelación tisular asociados a BCG.

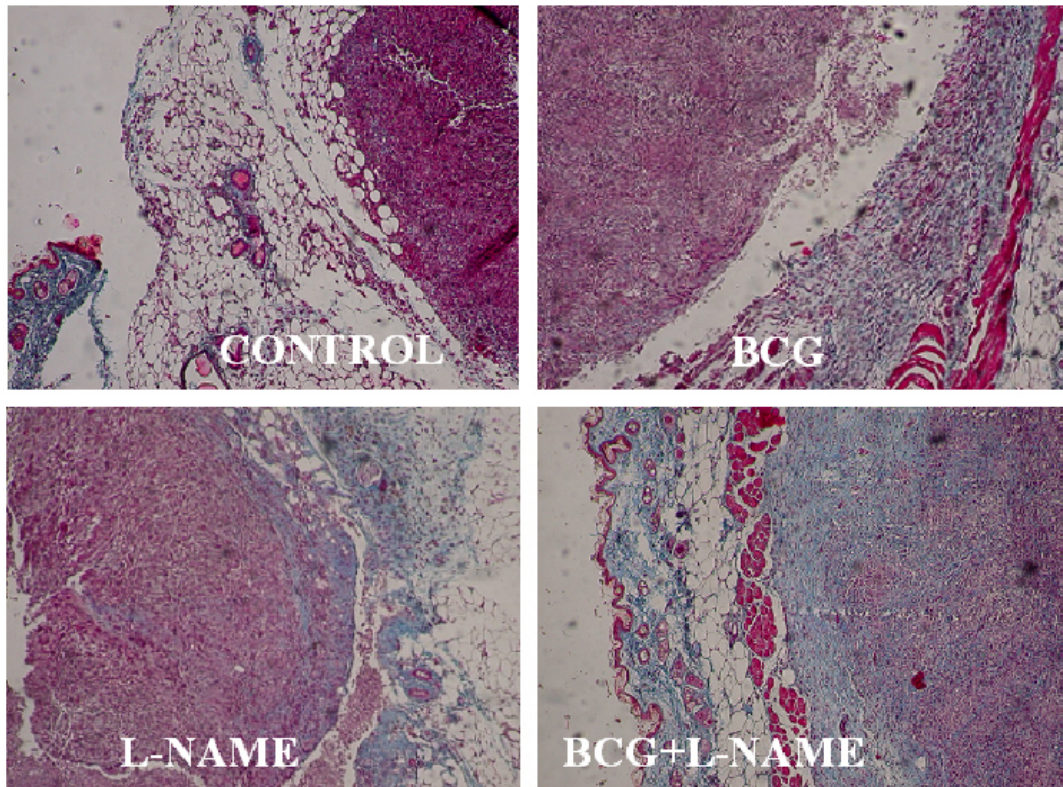


Figura 5. Coloración tricrómica de Masson en cortes histológicos de tumores de vejiga MB49 que crecen en el subcutáneo de ratones singenéticos C57BL/6. El color celeste indica depósito de colágeno. Control: el tumor crece invadiendo la grasa, BCG: crecimiento más controlado, no hay invasión muscular y se ve depósito de colágeno rodeando al tumor, L-NAME: mayor depósito de colágeno rodeando al tumor y aún dentro de la masa tumoral y BCG+L-NAME: la estructura de la piel está conservada y la fibrosis ha reemplazado al tumor, se observan zonas donde unas pocas células tumorales están rodeadas de colágeno.

Resultados

PARTE I -Mecanismos de acción de BCG in vitro-

BCG es el mejor tratamiento conocido para evitar recurrencia y progresión del cáncer de vejiga superficial de alto grado histológico e in situ [70] aplicándose sin modificaciones desde hace ya más de 30 años.

Es bien conocido que BCG evoca una rápida respuesta inmune local, sin embargo el mecanismo de acción completo no ha sido aún completamente esclarecido. El objetivo de este trabajo es analizar parte de éste mecanismo de acción evaluando un aspecto menos conocido, el efecto directo de BCG sobre la célula tumoral. Ha sido demostrado que BCG induce la muerte y el arresto del ciclo celular de células tumorales de vejiga [71], pero es escasa la literatura sobre el rol de PPARg en esta patología. Además no hay reportes publicados sobre el rol de PPARg en el tratamiento del CaV bajo tratamiento con BCG.

BCG induce la expresión de PPARg en células de cáncer de vejiga.

Para comenzar este trabajo evaluamos en primer lugar si BCG modulaba la expresión de PPARg en células de CaV murinas. Luego del tratamiento de la línea celular MB49 con 2 mg/ml de BCG durante diferentes tiempos observamos a través de la técnica de western blot que se indujo la expresión de PPARg luego de 24h (Fig 6A). Por inmunofluorescencia también observamos que BCG es capaz de inducir la expresión principalmente citoplasmática de PPARg en estas células, mostrándose en este caso a 48h de tratamiento. Cuando se lleva a cabo el tratamiento conjunto de BCG y de 15-d-PGJ2, ligando de PPARg observamos que la marcación es tanto citoplasmática como nuclear, sugiriendo que la presencia de su ligando induce la translocación al núcleo (Fig 6B).

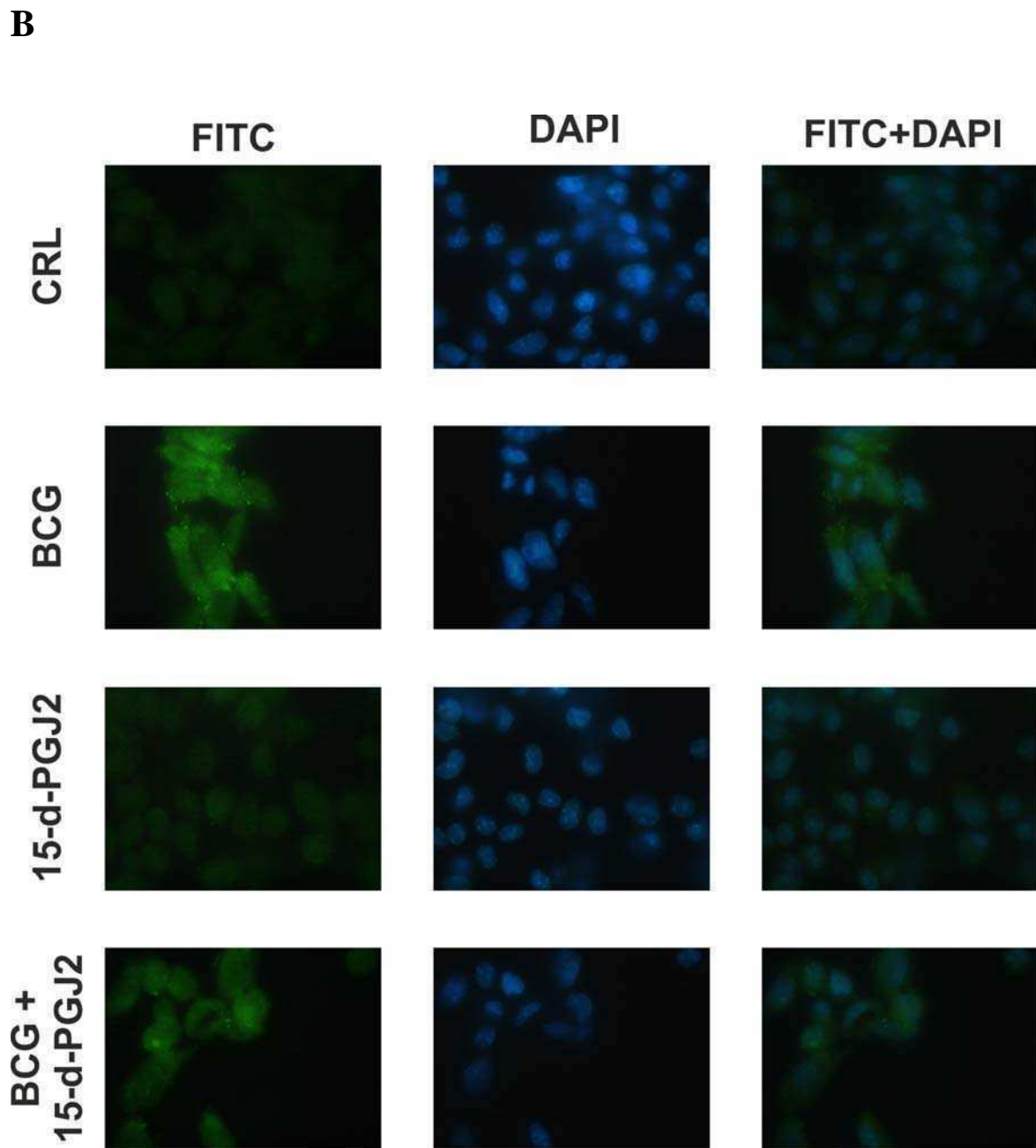
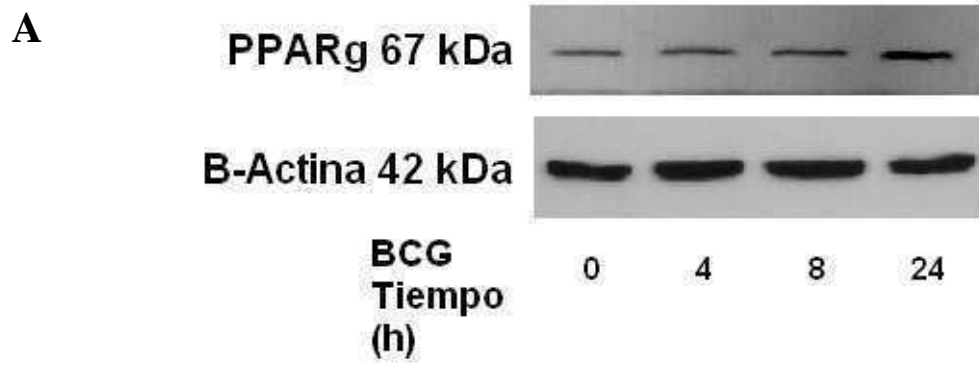


FIGURA 6: BCG induce la expresión de PPARg. A. Western blot de lisados totales de células MB49 bajo tratamiento con 2 mg/ml de BCG a diferentes tiempos. Beta-actina fue utilizada como control de carga. B. Inmunofluorescencia para PPARg en células de la línea MB49 bajo tratamiento de 2 mg/ml de BCG y 10 µM de 15-d-PGJ2 durante 48h. Las células fueron extensamente lavadas y procesadas para IF. Las imágenes corresponden a tinción con FITC (verde), DAPI (azul) y a la superposición digital de ambos. Aumento de 100X.

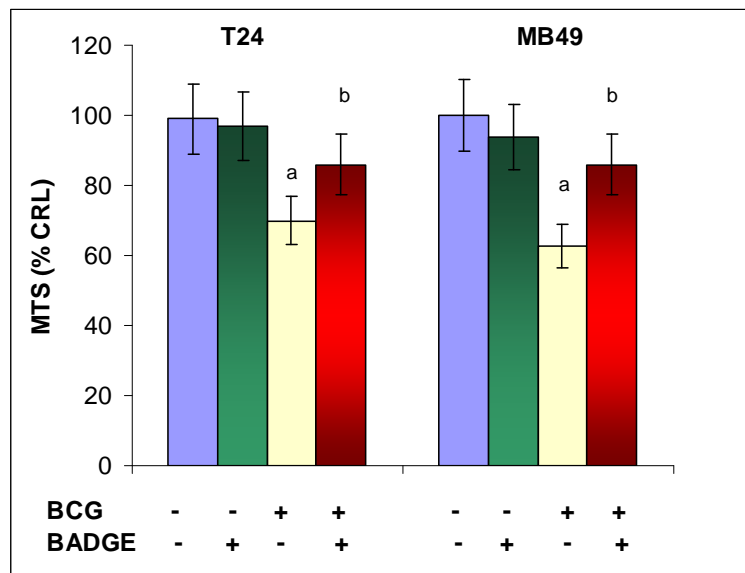


FIGURA 7: BADGE revierte la inhibición del crecimiento inducida por BCG. Monocapas subconfluentes de las líneas celulares T24 y MB49 fueron tratadas por 48 h con BCG (2 mg/ml) con o sin BADGE (40 µM) La viabilidad celular fue evaluada por MTS y referida como porcentaje respecto del control. a: p<0,001 versus sin tratamiento; b: p<0,01 versus BCG sola.

BADGE, antagonista de PPARg revierte la inhibición de la viabilidad inducida por BCG

Por resultados previos de nuestro laboratorio sabíamos que BCG induce la inhibición del crecimiento de células de CaV a través de la activación de un proceso apoptótico [53]. En este trabajo nosotros observamos que dicha inhibición de la proliferación es revertida cuando las células de cáncer de vejiga tanto murinas (MB49) como humanas (T24) son coadministradas con BADGE (40 μ M), un antagonista específico de PPARg. Este resultado sugiere que parte del mecanismo de acción antitumoral de BCG es mediado por PPARg endógeno (Fig 7).

Ligandos de PPARg potencian el efecto inhibitorio de BCG en células de CaV

El ligando natural de PPARg, la 15-d-PGJ2, indujo en ambas líneas celulares la inhibición de la viabilidad a partir de una dosis de 0,1 μ M en el caso de las células humanas, T24, y a partir de una concentración de 1 μ M en la línea murina, MB49 (Fig 8) en presencia de 2 mg/ml de BCG, durante 48 h. En todas las concentraciones donde este ligando tuvo su efecto inhibitorio, se observó una reversión parcial de la inhibición cuando las células fueron expuestas a un antagonista específico de PPARg, BADGE, en una concentración constante de 40 μ M. En el caso de RO, el efecto inhibitorio de la proliferación se observó para concentraciones más altas. En este caso también se observó un efecto antagónico en presencia de BADGE. Es importante mencionar que en ausencia de BCG el efecto citotóxico a los ligandos de PPARg es muy bajo. Estos resultados sugieren que BCG induce la expresión de PPARg y que los ligandos llevan a la inhibición del crecimiento celular por un mecanismo, en parte, PPARg dependiente.

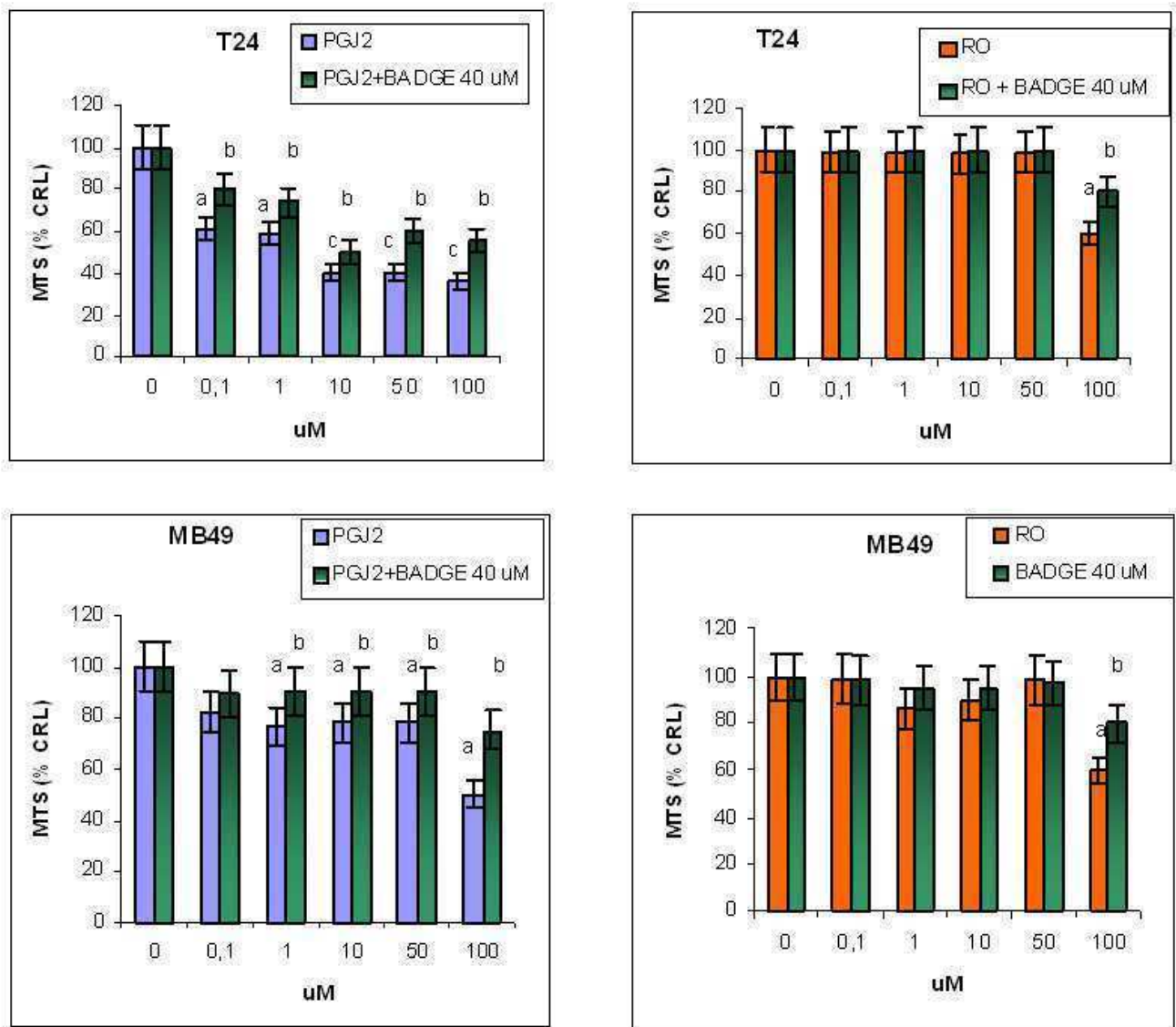


FIGURA 8. Ligandos de PPAR γ potencian el efecto de BCG. Monocapas subconfluentes de las líneas de cáncer de vejiga murino, MB49, y humano, T24, fueron incubadas por 48 h en presencia de BCG (2 mg/ml) con distintas concentraciones de RO ó 15-d-PG-J2 en presencia y ausencia de BADGE 40 μ M. La viabilidad fue evaluada por MTS, y referida como un porcentaje del control. a: $p < 0,05$ versus CRL; b: $p < 0,05$ versus la respectiva dosis sin BADGE. c: $p < 0,001$ versus CRL

BCG induce la actividad transcripcional de PPARg.

Dado que observamos que el tratamiento de células MB49 con BCG induce la expresión de PPARg a partir de las 24 horas de tratamiento y que los ligandos de PPARg potencian la inhibición del crecimiento inducido por BCG, efecto bloqueado parcialmente por el tratamiento de BADGE, decidimos evaluar la actividad transcripcional a través de un ensayo donde se utiliza un plásmido con la secuencia correspondiente a elementos de respuesta a PPARg río arriba del gen de luciferasa. Pudimos observar que tanto BCG como el ligando natural de PPARg, la 15-d-PGJ2, inducen la actividad de PPARg y que además el tratamiento combinado de BCG y 15-d-PGJ2 la potencian. El hecho de que BCG induzca la actividad transcripcional de PPARg sugiere que podría estar utilizando el ligando natural endógeno o bien que se lleva a cabo un mecanismo independiente de ligando. De la misma manera, sugerimos que la inducción de la actividad transcripcional dada por 15-d-PGJ2 estaría usando el PPARg endógeno.

Estos resultados demostrarían que BCG induce la expresión de PPARg, que éste sería translocado al núcleo por efecto de BCG y de 15-d-PGJ2, potenciado por el tratamiento conjunto, y que PPARg está activo transcripcionalmente llevando a las células a la muerte celular (Fig 9).

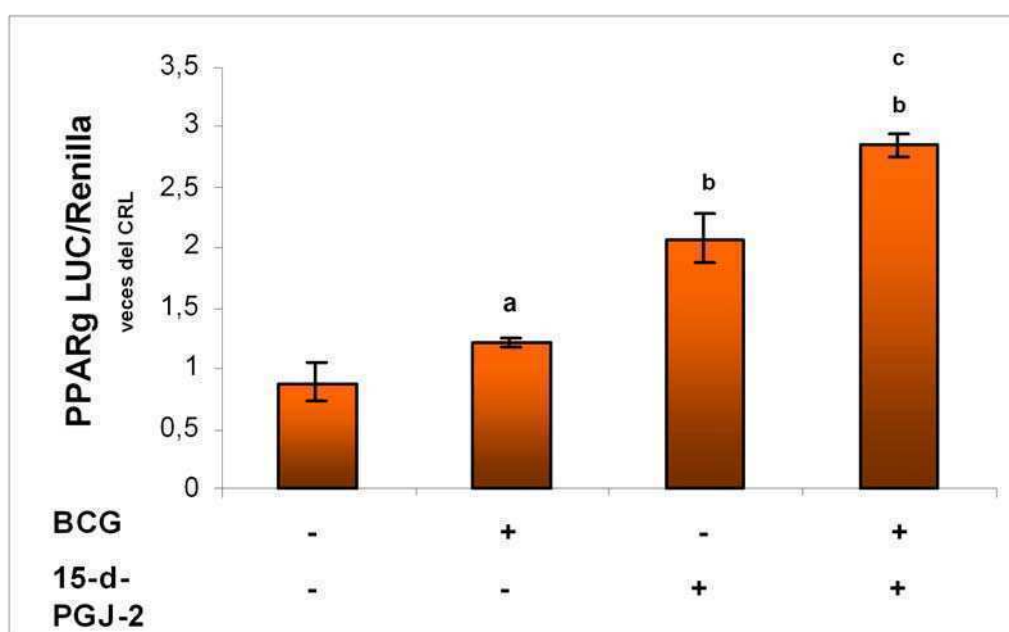
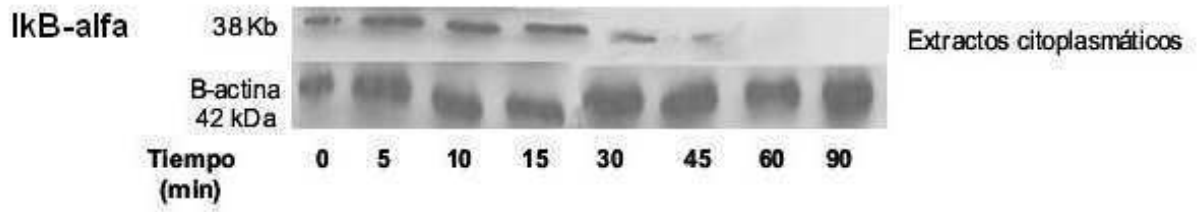
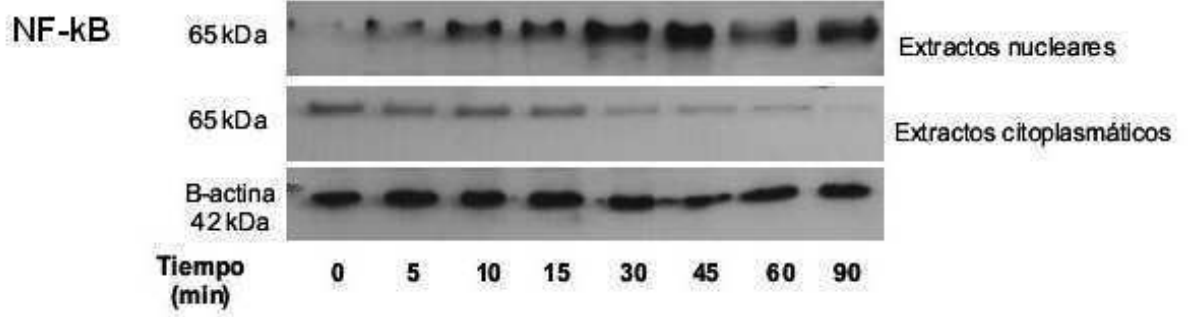
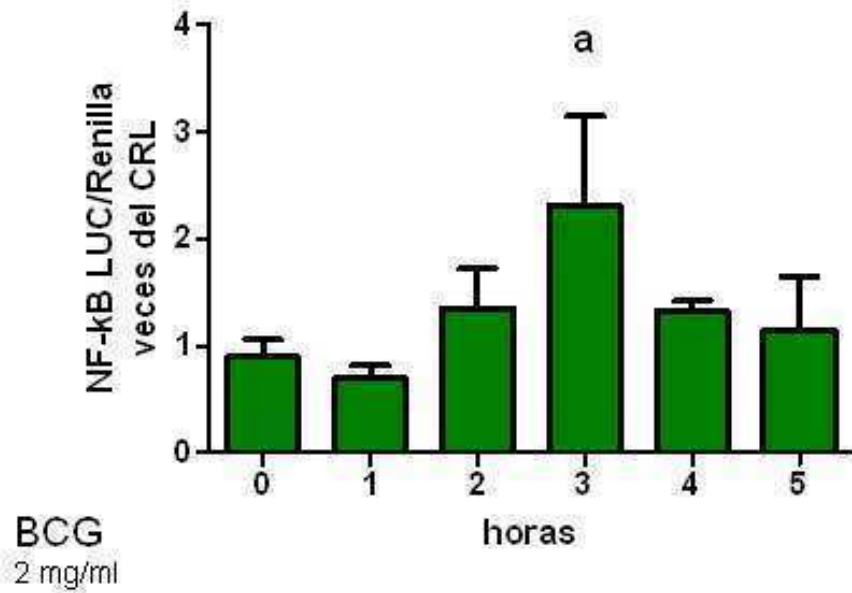


FIGURA 9: BCG induce la actividad transcripcional de PPAR γ . Monocapas subconfluentes de la línea celular MB49 previamente transfectadas con un plásmido PPAR γ /luciferasa y un plásmido de Renilla fueron tratadas por 24 h con BCG (2 mg/ml) con o sin 15-d-PGJ2 (10 μ M). La actividad se expresa como unidades de luminosidad de luciferasa relativizadas a las de Renilla y luego referidas como veces del CRL. a: $p < 0,001$, b: $p < 0,0001$ versus sin tratamiento; c: $p < 0,0001$ versus BCG ó 15-d-PGJ2 sola.

BCG induce la activación del factor de transcripción NF-kB

Una de las vías de señalización más estudiadas, tanto en células tumorales como inmunológicas es la de NF-kB. Ha sido descrito el rol de éste factor en células de cáncer de vejiga humanas bajo tratamiento con BCG. La idea de esta parte es analizar la función de NF-kB en células tumorales murinas bajo el tratamiento con BCG y ligandos de PPAR γ . La línea celular MB49 fue tratada con BCG (2 mg/ml) a distintos tiempos para luego realizar los homogenatos separando las fracciones citoplasmática y nuclear. En la figura 10A se muestra que BCG induce la degradación de la subunidad alfa del inhibidor de NF-kB a partir de los 30 min de tratamiento. También a partir de ese momento se observa que el factor NF-kB comienza a translocarse al núcleo (Fig 10B). Las células MB49 fueron previamente transfectadas con un plásmido que tiene la secuencia del elemento respondedor a NF-kB río arriba del gen de la luciferasa, conjuntamente con el de Renilla, para usar como control de transfección, y luego fueron tratadas *in vitro* con BCG 2 mg/ml a diferentes tiempos (1, 2, 3, 4 y 5 horas). Las células fueron lisadas para cuantificar la luminiscencia. Nuestros resultados muestran que BCG induce la actividad de NF-kB a las tres horas de tratamiento (Fig 10C). Cuando las células son tratadas en forma conjunta con BCG y 15-d-PGJ-2 (1 μ M) observamos que la degradación del inhibidor dada por el tratamiento de BCG sola no se lleva a cabo, indicando que la 15-d-PGJ-2 es capaz de inhibir la activación de la vía de NF-kB inducida por BCG en este sistema.

A**B****C**

D.

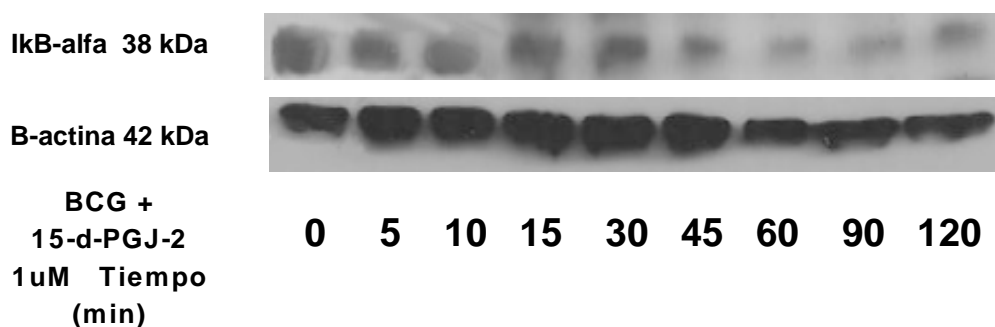


FIGURA 10: BCG induce la actividad transcripcional de NF-kB. A. WB para ikB-alfa en fracción citoplasmática de células MB49 bajo tratamiento con BCG (2 mg/ml). B. NF-Kb en extractos nucleares. C. Monocapas subconfluentes de las línea celular MB49 previamente transfectadas con un plásmido NF-kB/luciferasa y un plásmido de Renilla fueron tratadas a distintos tiempos con BCG (2 mg/ml). La actividad se expresa como unidades de luminosidad de luciferasa relativizadas a las de Renilla y luego referidas como veces del CRL. a: $p < 0,001$. D. WB para ikB-alfa de fracción citoplasmática de MB49 tratadas con BCG y 15-d-PGJ2 (10 μM).

BCG induce la expresión de iNOS en la línea celular MB49.

Dado que PPAR γ es regulador negativo de la inflamación y regula la expresión de enzimas como la iNOS, sumado al hecho de que el NO es un factor de supervivencia en la línea MB49, decidimos evaluar si BCG es capaz de modular la expresión de iNOS en estas células. A través de la técnica de WB pudimos observar que BCG induce la expresión de esta enzima 8 horas después del tratamiento de BCG 2 mg/ml (Fig 11).

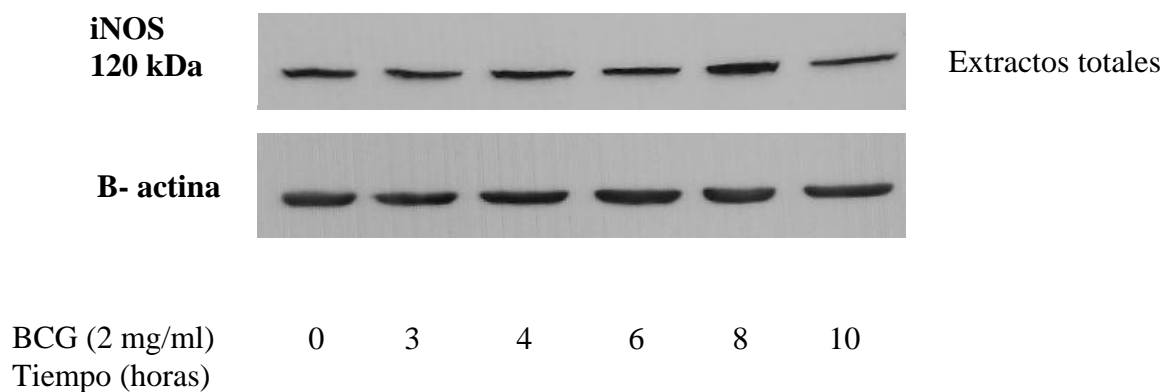


FIGURA 11. BCG induce la expresión de iNOS. Monocapas subconfluentes de las líneas de cáncer de vejiga murino, MB49, fueron tratadas con BCG (2 mg/ml) a distintos tiempos y lisadas para posterior análisis por WB.

Los ligandos de PPAR γ inhiben la producción de óxido nítrico inducido por BCG

En primera instancia evaluamos si se observaba un aumento en la producción del NO luego del aumento de la expresión de iNOS en MB49 bajo tratamiento con BCG. La Fig 4 muestra que BCG (2 mg/ml) induce la producción de NO en un 30% en la línea T24, mientras que la induce aproximadamente en un 60 % en la línea celular murina, MB49 (Fig 12).

Para evaluar si la actividad de PPAR γ modula la producción de NO evaluamos la funcionalidad de los ligandos del receptor en ambas líneas celulares bajo tratamiento con BCG. Pudimos observar que en presencia de tanto el ligando natural, como el sintético de PPAR γ , la producción de NO inducida por BCG es inhibida. Este efecto se observa partiendo de concentraciones de 0,1 μ M. Cuando el antagonista de PPAR γ , BADGE, es agregado, éste no modifica el efecto observado para los ligandos de PPAR γ .

Este resultado sumado al hecho de que la 15-d-PGJ2 inhibe la inducción de la producción de NO ejercida por BCG, al mismo tiempo que inhibe la activación de la vía de NF-kB, sugieren que la inhibición de la producción de NO inducida por BCG es PPAR γ

independiente y que se da a través de la inhibición de la vía de NF-kB (factor de transcripción que regula la expresión de iNOS).

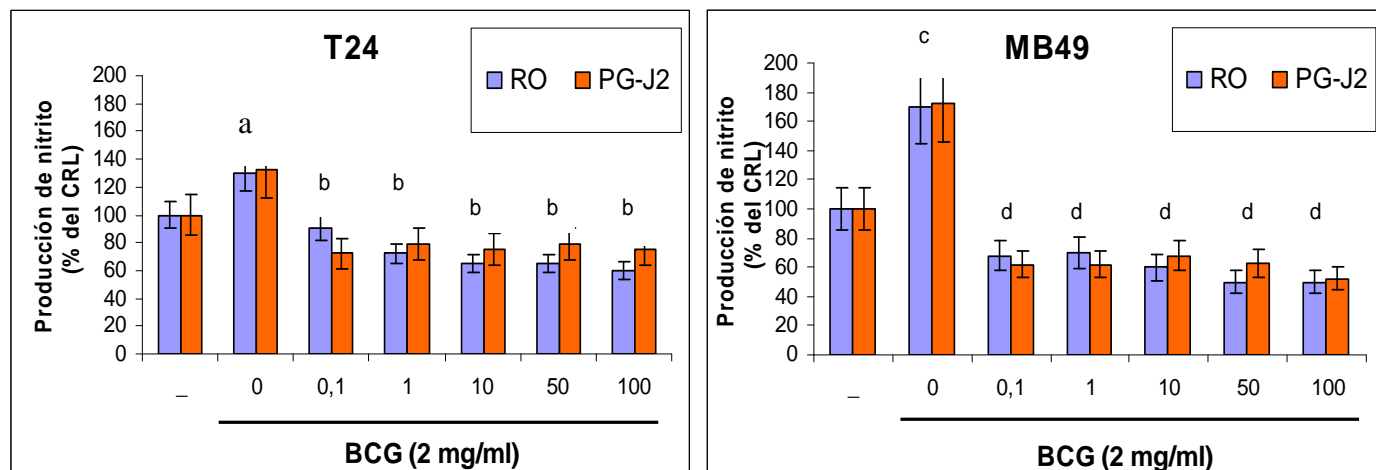


FIGURA 12. Monocapas subconfluentes de las líneas de cáncer de vejiga murino, MB49, y humano, T24, fueron incubadas por 48 h en presencia de BCG (2 mg/ml) con distintas concentraciones de RO ó 15-d-PG-J2. La producción de nitrito en el sobrenadante de ambas líneas celulares fue evaluada a través de la técnica de Griess y referida como porcentaje del grupo control. a: $p < 0,05$ versus sin tratamiento; b: $p < 0,01$ versus sin RO ni 15-d-PGJ2 con BCG; c: $p < 0,001$ versus sin tratamiento; d: $p < 0,001$ versus sin RO ni 15-d-PGJ2 con BCG

PARTE II –Mecanismos de acción de BCG in vivo-

Dado que BCG induce la expresión de PPAR γ en células de CaV murinas e induce su actividad transcripcional llevándolas a la inhibición del crecimiento, decidimos evaluar el rol de PPAR γ y sus ligandos in vivo.

BCG inhibe el crecimiento tumoral mientras que la administración de RO se opone a dicho efecto en ratones singeneicos.

Para evaluar el efecto de BCG y de RO in vivo, se generaron tumores subcutáneos utilizando las células MB49 en ratones singeneicos C57Bl/J6. RO fue administrada en el agua de la bebida desde el comienzo del experimento en una dosis de 8 mg/Kg/ratón/día. La BCG se inoculó intratumoralmente dos veces por semana, en una dosis de 2 mg/ml por inoculación. La figura 13 muestra que la administración RO no modificó el crecimiento tumoral con respecto al grupo control mientras que BCG muestra un efecto inhibitorio del crecimiento tumoral. Además se observa que RO revierte el efecto inhibitorio de BCG, ya que el grupo que recibió el tratamiento combinado presenta un tamaño tumoral mayor comparado con aquel que recibió BCG sola.

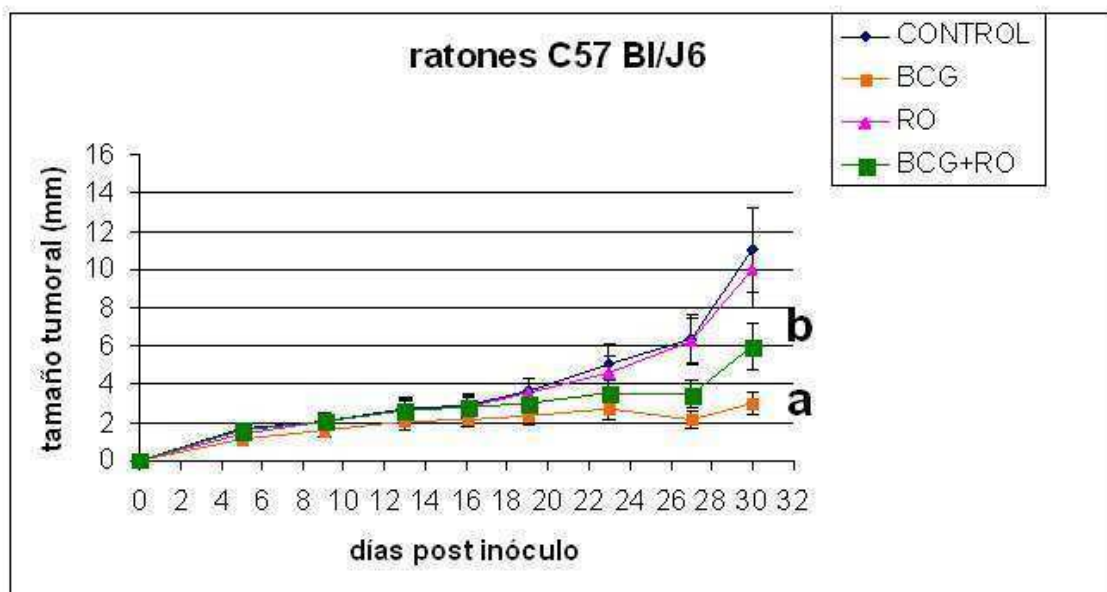


FIGURA 13: Inoculación 5×10^5 células MB49 en el flanco de ratones C57Bl/J6. La BCG se inocula dos veces por semana. RO (8 mg/kg ratón) se suministra por vía oral. Se evalúa el crecimiento tumoral midiendo dos diámetros perpendiculares calculando la media geométrica ($Dxd^{1/2}$, donde D es el diámetro mayor y d en menor). Se grafica el crecimiento tumoral promedio \pm DS. El experimento se repitió tres veces con resultados similares. a: $p < 0.01$ vs CRL, b: $p < 0.05$ vs grupo tratado con BCG. Test exacto de Fisher, ANOVA con comparaciones de Bonferroni.

BCG induce PPAR γ in vivo

La inoculación de células MB49 en flanco de ratones singeneicos C57BL/J6 origina un tumor sólido con área hemorrágica en su interior. Observamos que unas pocas células tumorales presentan una débil expresión. Por el contrario las células mononucleares que infiltran el tumor son fuertemente positivas para el receptor.

Al igual que lo observado in vitro la BCG induce la expresión de PPAR γ en las células tumorales. La administración de RO no modificó esta expresión (dato no mostrado).

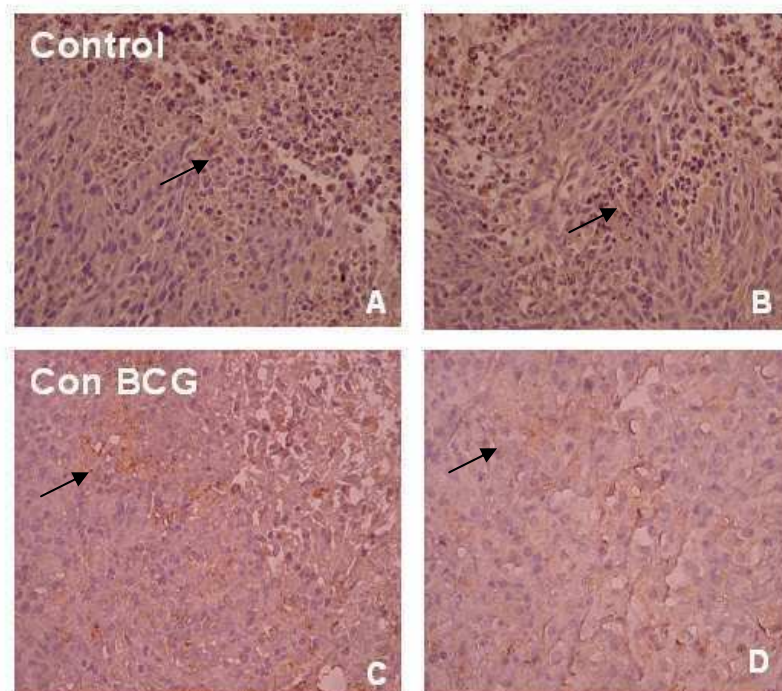


Figura 14. BCG induce PPARg en los tumores MB49. Por inmunohistoquímica se observa que tumores generados por la línea celular MB49, las células tumorales son negativas para PPARg, mientras que el infiltrado de células mononucleares es PPARg positivo. Los tumores inoculados con MB49 que recibieron BCG intratumoralmente muestran áreas de expresión positiva para PPARg. A y B, CRL; C y D, BCG.

BADGE revierte el efecto inhibitorio de BCG in vivo.

Para evaluar la funcionalidad de PPARg en tumores MB49, evaluamos su crecimiento bajo tratamiento con BCG y BADGE, antagonista específico de PPARg. Ambos tratamientos fueron administrados intratumoralmente, la BCG en una concentración de 2 mg/ml, y el BADGE, 40 μ M. Observamos que BCG inhibió el crecimiento tumoral aumentando el tiempo de latencia, disminuyendo el porcentaje de animales con tumor y la velocidad de crecimiento (Tabla I). Esta inhibición fue parcialmente revertida por BADGE que disminuye a la mitad el tiempo de latencia, aumenta el número de animales que desarrollan tumor y la velocidad de crecimiento. Estos resultados, sumados al hecho de que BCG induce la expresión de PPARg por parte de las células tumorales, nos lleva a hipotetizar que BCG lleva a cabo su mecanismo de acción antitumoral, involucrando parcialmente a PPARg.

	Tiempo de latencia (días)	% de tomas al día 9	% de tomas al día 30	Velocidad de crecimiento (mm/día)
CRL	10	5/9 (55)	9/9 (100)	2,8 +/- 0,58
BCG	23	0/9 (0) ^a	5/9 (55) a	0,65 +/- 0,41 ^c
BADGE	16	10/10 (100)	10/10 (100)	2,18 +/- 0,94
BCG+BADGE	12	4/9 (44) ^b	9/9 (100) b	1,62 +/- 0,79

Tabla I. Inoculación 5×10^5 células MB49 en el flanco de ratones C57BL. La BCG se inocula dos veces por semana comenzando 24hs post inóculo de las células tumorales. Se evalúa el crecimiento tumoral midiendo dos diámetros perpendiculares calculando la media geométrica ($Dxd^{1/2}$, donde D es el diámetro mayor y d en menor). El crecimiento tumoral se informa como velocidad de crecimiento promedio +/-DS. Se calcula el tiempo de latencia como aquel en el cual el 50 % de los animales desarrollen tumor, y al % de tomas como el número de ratones con tumor al día indicado. El experimento se repitió tres veces con resultados similares. a, $p < 0.05$, test exacto de Fisher vs CRL, b, vs BCG. c, $p < 0.01$ ANOVA con comparaciones de Bonferroni vs CRL.

Rol de los macrófagos en el crecimiento del tumor MB49

Los macrófagos son células con gran capacidad fagocítica que presentan una gran capacidad microbiostática y microbicida, mediada tanto por mecanismos oxígeno dependientes como independientes y tienen la capacidad de actuar como células presentadoras de antígeno profesionales, es decir, presentarles péptidos antigénicos a linfocitos T, a través de las moléculas de clase I y II del CMH. Estas células en respuesta a PAMP (patrones de reconocimiento molecular) o citoquinas producidas por ellos mismos, o por otros tipos celulares, secretan un amplio espectro de citoquinas y/o moléculas entre las que se encuentra el NO. Este factor es uno de los principales mecanismos de citotoxicidad que utilizan tanto los macrófagos como los neutrófilos, hacia tanto bacterias,

protozoos, helmintos y células tumorales. El interferón gamma y el LPS son los más potentes activadores del gen de la iNOS en macrófagos murinos.

Por IHQ observamos que los tumores MB49 son infiltrados por células mononucleares, y que estas son positivas para PPARg, entonces nos propusimos evaluar el rol de macrófagos en este modelo de estudio. Nos propusimos evaluar distintos parámetros relacionados con la función de este tipo celular. Para llevar a cabo estas mediciones, luego de dos semanas de portación tumoral, los macrófagos peritoneales fueron obtenidos de cada grupo experimental, cuantificados y plaqueados a igual número de células.

Hemos observado que de los ratones que recibieron BCG intratumoral la obtención promedio de macrófagos es aproximadamente 3 veces mayor que los otros grupos. Al realizar un ensayo de actividad metabólica, observamos que BCG induce aproximadamente el doble de actividad metabólica que el control. Cuando se analizó la producción de nitrito, pudimos observar que los MAC provenientes de ratones tratados con BCG producen alrededor de 6 veces más que el control. También se observó que la RO tuvo un efecto inhibitorio, ya que la producción de nitrito fue reducida a la mitad. El índice fagocítico fue disminuido por RO ya sea solo o en combinación con BCG, comparado con el grupo CRL y BCG respectivamente. La actividad de MMP-9, necesaria para la migración de los macrófagos se ve aumentada en un 50 % por el tratamiento con BCG comparado con el CRL, mientras que RO disminuye dicho estímulo (Tabla II). Todos estos parámetros que se ven exacerbados con BCG y que al mismo tiempo se ven revertidos en presencia del ligando sintético de PPARg, nos lleva a pensar que parte de la respuesta inmune necesaria para que el efecto inhibitorio de BCG sobre el crecimiento tumoral tenga lugar, está siendo bloqueado por RO.

	Numero de MAC peritoneales <i>10⁶/ratón</i>	Viabilidad <i>MTS (492nm)</i>	Niveles de NO nitrito <i>nmol/10⁶ cell</i>	Índice fagocítico <i>número de BCG/MAC</i>	Actividad de MMP-9 <i>UA/106cel/24h</i>
Control	1,1+/-0,2	0,22+/-0,02	5+/-0,04	12+/-3	5,0 +/- 2
BCG	2,8+/-0,3	0,49+/-0,05 ^a	31+/-0,3 ^a	11+/-3	7,75 +/- 2
BCG+RO	1,5+/-0,2	0,30+/-0,03 ^b	17,6+/-0,1 ^b	4+/-2 ^b	3,35 +/- 1 ^b
RO	1+/-0,2	0,28+/-0,02	5+/-0,05	3+/-3 ^c	4,3 +/- 2

TABLA II. 1×10^6 macrófagos extraídos de peritoneo de los cuatro grupos experimentales de dos semanas de portación, fueron sembrados por pocillo en placa de 96. Luego de 24 h de incubación se midió la producción de nitrito en el sobrenadante utilizando el reactivo de Griess (540 nm) y la actividad metabólica utilizando MTS. (492nm). ANOVA contrastes Bonferroni. (a: $p < 0.01$ crl vs BCG. b: $p < 0.05$ BCG VS BCG+RO. C: $p < 0.05$ RO vs CRL). Cuando se evaluó la actividad de MMP-9 las células se mantuvieron 24 h más en ausencia de SFB, y luego de la recolección del medio condicionado se realizó una zimografía. El índice fagocítico fue evaluado contando el número de bacilos en el interior de los MAC luego de la tinción de Zielh Neelsen específica para *Mycobacterium tuberculosis*.

RO inhibe la actividad transcripcional de NF-kB y la fagocitosis en una línea de macrófagos murinos.

Es sabido que la principal vía de señalización que activan las Micobacterias en los macrófagos es la de NF-kB. Para evaluar el efecto de RO en los macrófagos, evaluamos la actividad transcripcional de NF-kB en una línea de macrófagos murinos, RAW 264.7, bajo tratamiento con 1 mg/ml de BCG y de 10 μ M de RO. Observamos que la infección con BCG induce la activación de NF-kB y que el tratamiento combinado de BCG y RO revierte este efecto.

La capacidad fagocítica se evaluó contando el número bacterias en el citoplasma de los macrófagos (como se realizó en los macrófagos peritoneales) y se llevó a cabo un ensayo en donde los macrófagos fueron infectados con BCG, 1 mg/ml (2×10^6 CFU/ml) tratados o no con RO 10 μ M durante 24 h, y luego lisados con saponina al 5%. Los lisados fueron sembrados en medio sólido específico para el crecimiento de BCG, creciendo así solo las bacterias viables luego de la lisis. Observamos que el tratamiento con RO disminuye el número de CFU obtenidas con respecto al control, indicando entonces que la capacidad fagocítica de BCG de estos macrófagos está disminuida por el agonista de PPARg.

Estos resultados son acordes a los ensayos observados en macrófagos peritoneales derivados de ratones portadores de tumor, donde las distintas funciones características de

macrófagos activados en procesos inflamatorios se ve inhibida por la activación de PPAR γ (Fig 14).

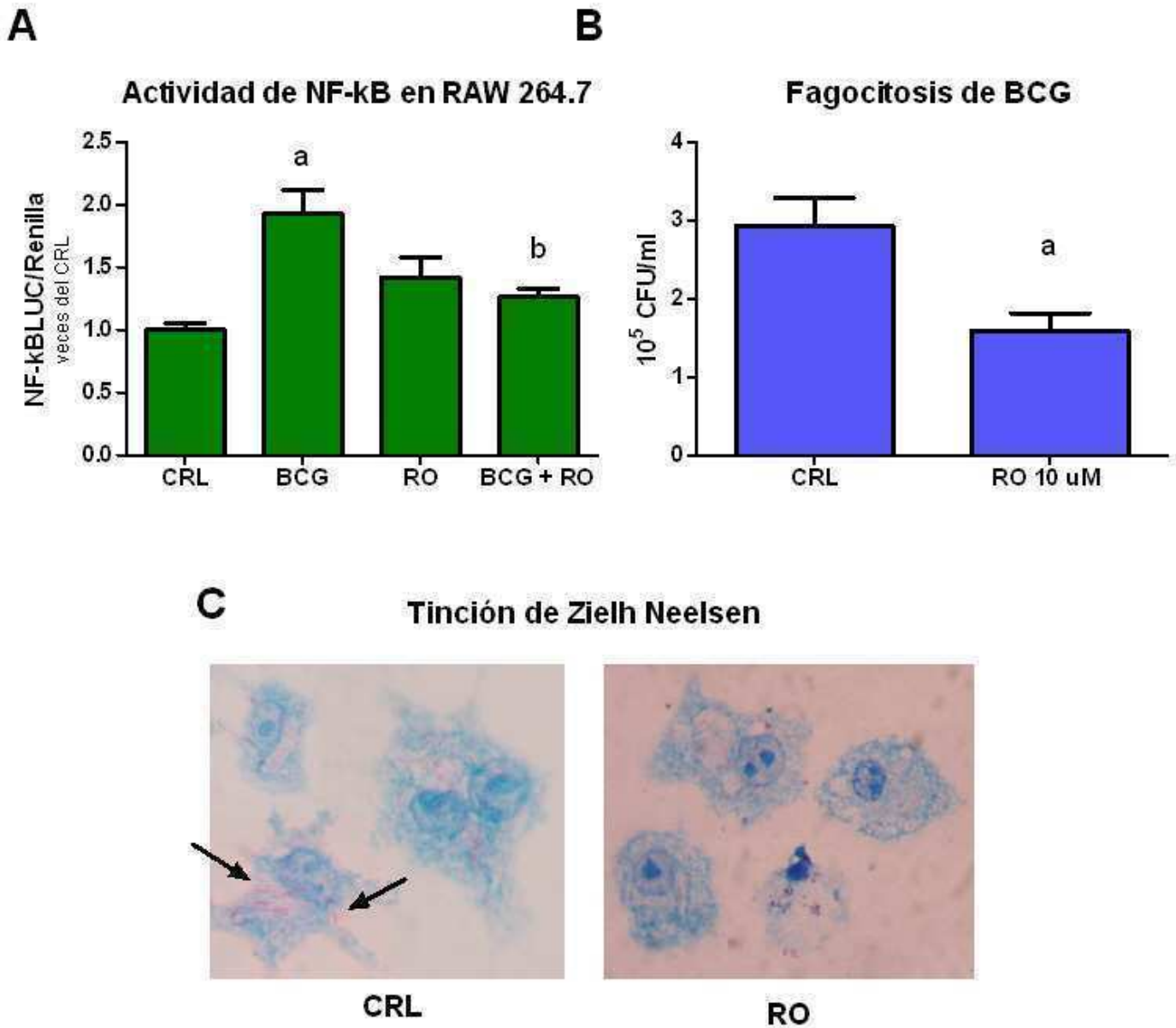


FIGURA 14: RO inhibe la actividad transcripcional de NF-kB y la fagocitosis en macrófagos. A. Monocapas subconfluentes de la línea celular de macrófagos RAW 264.7 previamente transfectadas con un plásmido NF-kB/luciferasa y un plásmido de Renilla fueron tratadas por 24 h con BCG (2 mg/ml) con o sin RO (10 μ M). La actividad se expresa como unidades de luminosidad de luciferasa relativizadas a las de Renilla y luego referidas como veces del CRL. a: $p < 0,001$, versus sin tratamiento; b: $p < 0,01$ versus BCG sola. B. 3×10^5 células RAW 264.7 fueron tratadas durante 24 h con RO 10 μ M. Luego de 1 h de incubación con BCG 1 mg/ml (2×10^6 UFC) fueron lavados 2 veces con PBS y lisados con saponina al 5 %. Diluciones seriadas fueron sembradas en medio sólido Lowenstein Jensen y las colonias se cuantifican luego de 30 días, se informa como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml), a: $p = 0.0208$ test de Student . C. Tinción de Zielh Neelsen, específica para Micobacterias.

BCG no genera efecto sobre el crecimiento tumoral en ratones atímicos

Para evaluar el efecto de BCG y de RO en ratones inmunodeficientes, se generaron tumores subcutáneos utilizando las células MB49 en ratones atímicos. RO fue administrada en el agua de la bebida desde el comienzo del experimento en una dosis de 8 mg/Kg/ratón/día. La BCG se inoculó intratumoralmente dos veces por semana, en una dosis de 2 mg/ml por inoculación. La figura 15 muestra que la administración de BCG no generó ningún efecto sobre el crecimiento tumoral con respecto al grupo control. Si bien los ratones atímicos cuentan con células NK y sistema monocito/macrófago, son deficientes en linfocitos T. El hecho de que BCG no tenga efecto en este sistema corrobora lo observado en otros modelos, los linfocitos T son esenciales para una adecuada respuesta antitumoral de BCG en ratones con CaV (Fig 15).

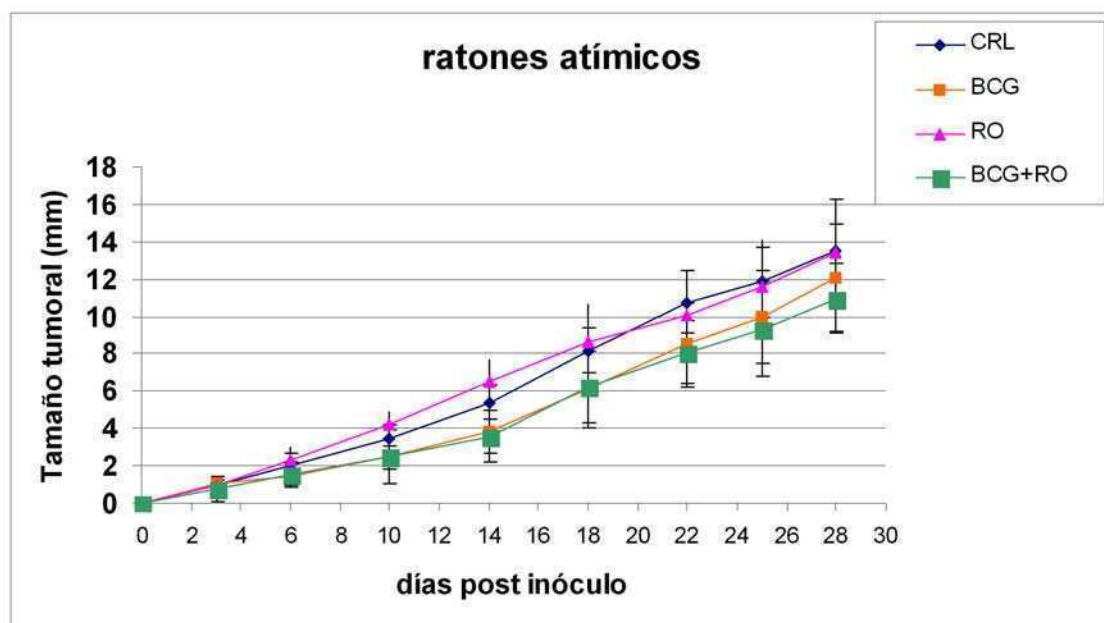


FIGURA 15: Inoculación 5×10^5 células MB49 en el flanco de ratones atímicos. La BCG se inocula dos veces por semana. RO (8 mg/kg ratón) se suministra por vía oral. Se evalúa el crecimiento tumoral midiendo dos diámetros perpendiculares calculando la media geométrica ($Dxd^{1/2}$, donde D es el diámetro mayor y d en menor). Se grafica el crecimiento tumoral promedio \pm DS. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

Rol de los fibroblastos en el crecimiento del tumor MB49

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo demuestran que BCG, además de inhibir el crecimiento tumoral, induce el depósito de fibras colágenas en tumores generados con la línea celular MB49. Basados en este antecedente nos propusimos estudiar si BCG era capaz de modular la proliferación de fibroblastos *in vitro*, evaluar también en los tumores otras moléculas, como la alfa-SMA y el FGF-2, ambos relacionados con la activación y diferenciación de fibroblastos. Como RO revierte el efecto antitumoral de BCG *in vivo* analizamos las variables antes mencionadas bajo tratamiento de ligandos de PPAR γ .

BCG induce la proliferación de fibroblastos mientras que RO se opone a dicho efecto.

Para evaluar el efecto de BCG en el estroma, comenzamos evaluando su rol en una línea celular de fibroblastos murinos, los NIH-3T3. Observamos que el tratamiento con BCG indujo la proliferación de fibroblastos en un 35-40 % con respecto al control a partir de 0,5 mg/ml manteniéndose hasta 2 mg/ml en un intervalo de tiempo de 24h (Fig 16 A). Este resultado apoya la hipótesis de que BCG está estimulando a los fibroblastos cuando se la inocula intratumoralmente, dando como resultado el depósito de fibras colágenas observado por coloración Tricrómica de Masson en resultados anteriores.

Como el tratamiento combinado de RO más BCG revierte el tamaño tumoral ejercido por BCG sola, evaluamos el efecto de los ligandos de PPAR γ sobre los fibroblastos bajo tratamiento con BCG. Usando una concentración constante de BCG de 1 mg/ml y un barrido de concentración de los ligandos de PPAR γ , pudimos observar que la 15-d-PGJ2, inhibe no solo la viabilidad de los fibroblastos sino también la inducción de la viabilidad ejercida por BCG, a partir de la concentración de 12,5 μ M (Fig 16 B). En el caso de la RO, el ligando sintético, obtuvimos resultados similares, viéndose el efecto de inhibición de la viabilidad a partir de la concentración de 50 μ M.

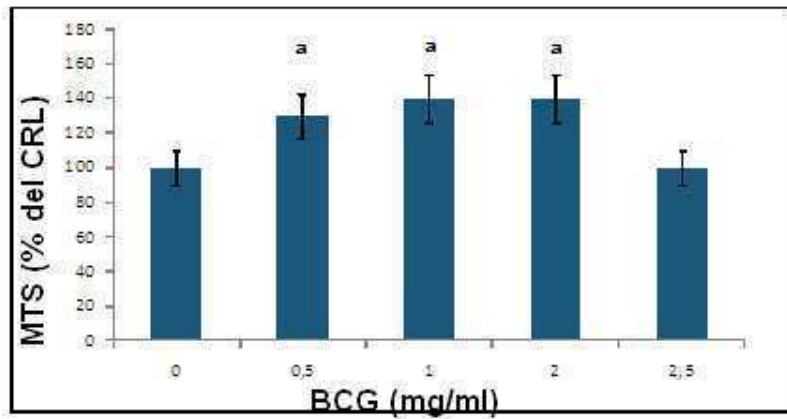
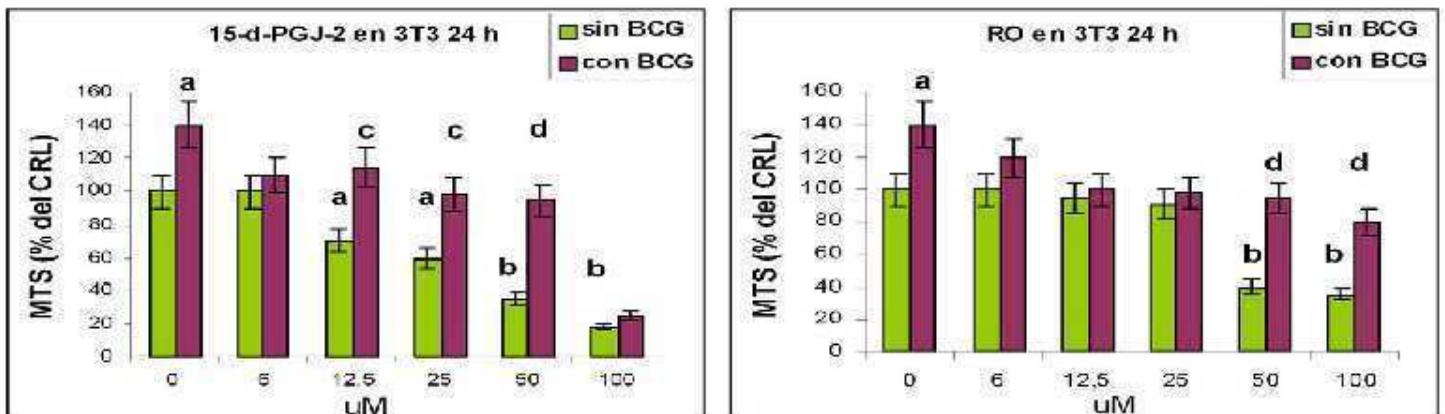
A**B**

FIGURA 16: (A) Monocapas subconfluentes de la línea celular NIH-3T3 fueron tratadas por 24 h con distintas concentraciones de BCG. (B) Tratamiento de RO ó 15-d-PG-J2 con o sin BCG (1 mg/ml). La viabilidad celular fue evaluada por MTS y referida como porcentaje respecto del control. a: $p < 0,01$; b: $p < 0,001$ versus sin tratamiento; c: $p < 0,01$ y d: $p < 0,001$ versus la correspondiente dosis sin BCG.

BCG induce la expresión de moléculas asociadas a la reparación de tejidos y RO se opone a dicho efecto.

La expresión de alfa-SMA, una proteína asociada a filamentos intermedios se encuentra en miofibroblastos, y ha sido establecida como un marcador de diferenciación de fibroblastos

a miofibroblastos, asociada a la migración de fibroblastos en procesos fisiológicos como la reparación de heridas.

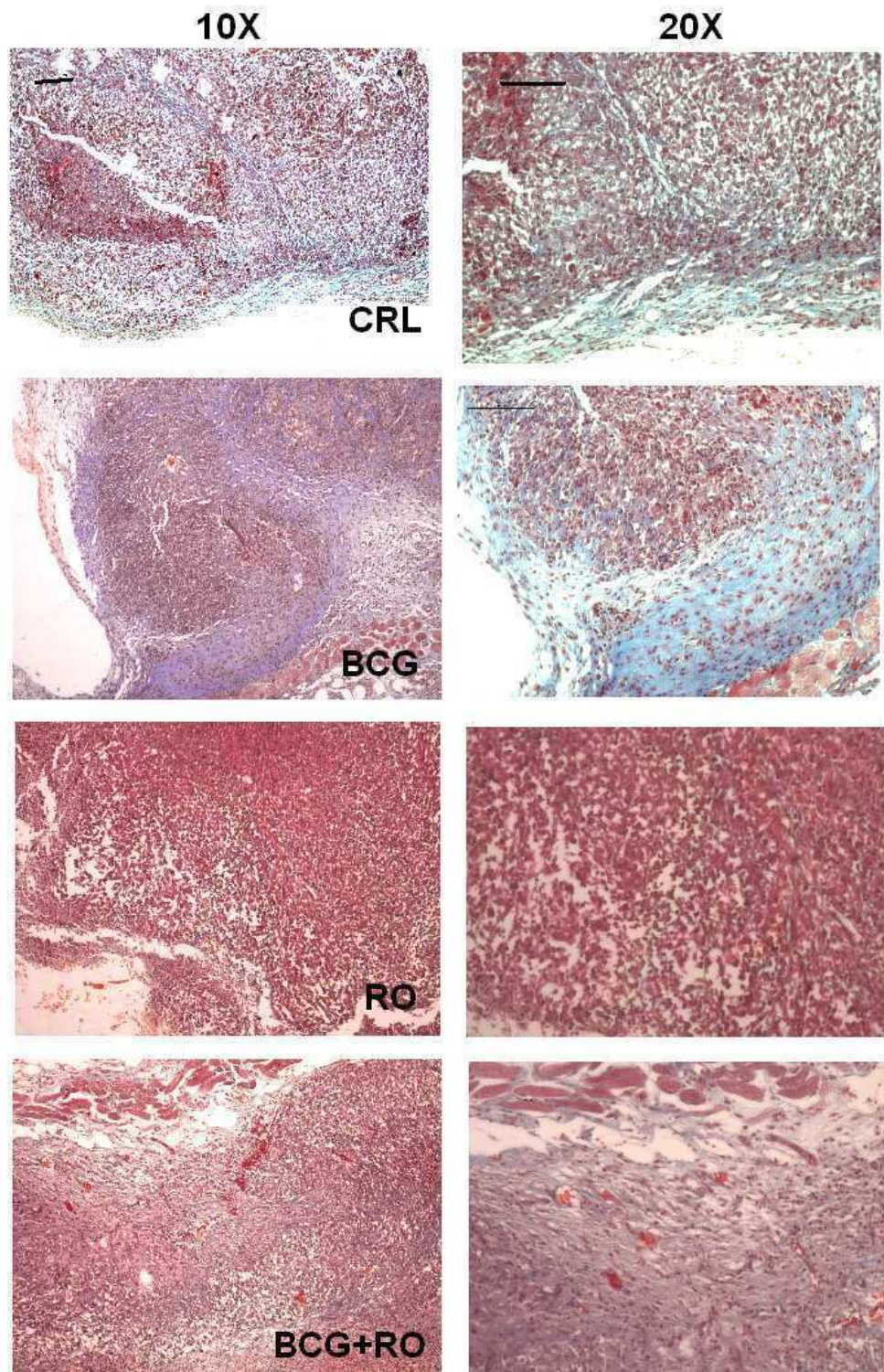
Por otro lado ha sido descrito que FGF-2 es uno de los principales factores de crecimiento involucrado en la proliferación de fibroblastos. Además, se ha demostrado que FGF-2 es capaz de inhibir la apoptosis en fibroblastos NIH-3T3 tratados con drogas quimioterapéuticas [72]. Es por esto que hipotetizamos que FGF-2 podría ser otro factor involucrado en la fibrosis inducida por BCG. Entonces, nos propusimos analizar la expresión de alfa-SMA, de colágeno y FGF-2, como indicadores de actividad fibroblástica en cortes histológicos de tumores obtenidos de ratones de los 4 grupos experimentales (CRL, BCG, RO, BCG+RO).

BCG indujo el depósito de fibras colágenas, analizado por tinción tricrómica de Masson (Fig 17 A), y la expresión de FGF-2 y de alfa-SMA (Fig 17 B y C respectivamente) con respecto al tumor control observada por IHQ. Estos resultados indican que BCG induce el depósito de fibras colágenas, expresión de FGF-2 y alfa-SMA, sugiriendo que los fibroblastos, macrófagos u otro componente del tumor está siendo activado por BCG.

Cuando los tumores provenían de ratones tratados con BCG y RO todos éstos parámetros se vieron disminuidos, indicando que el efecto generado por BCG es revertido en presencia de RO. El hecho de que BCG ejerza un efecto inhibitorio en la proliferación de las células tumorales y que al mismo tiempo tenga un efecto estimulatorio sobre fibroblastos sugieren que el efecto antitumoral de BCG in vivo estaría dado por la suma de varios componentes. BCG inhibiría la proliferación de la célula tumoral, activando el sistema inmunológico y además, activando fibroblastos estromales, que serían los responsables del depósito de fibras colágenas observado en tumores tratados con BCG. Siguiendo con la misma hipótesis, los ligandos de PPAR γ , particularmente la RO, además de inhibir las funciones macrofágicas necesarias para la respuesta antitumoral de BCG, estaría inhibiendo la actividad fibroblástica responsable de la remodelación tisular inducida por BCG.

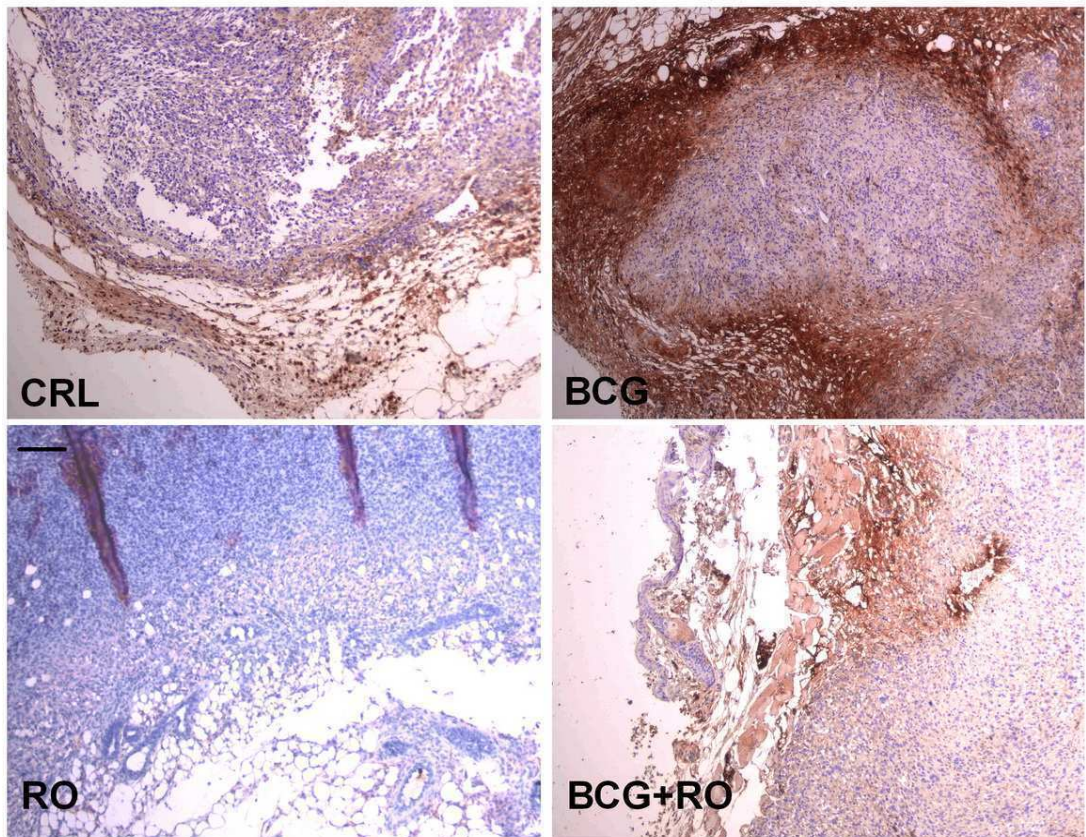
A

Coloración Tricrómica de Masson en tumores MB49



B

Expresión de FGF-2 en tumores MB49



C

Expresión de alfa-SMA en tumores MB49

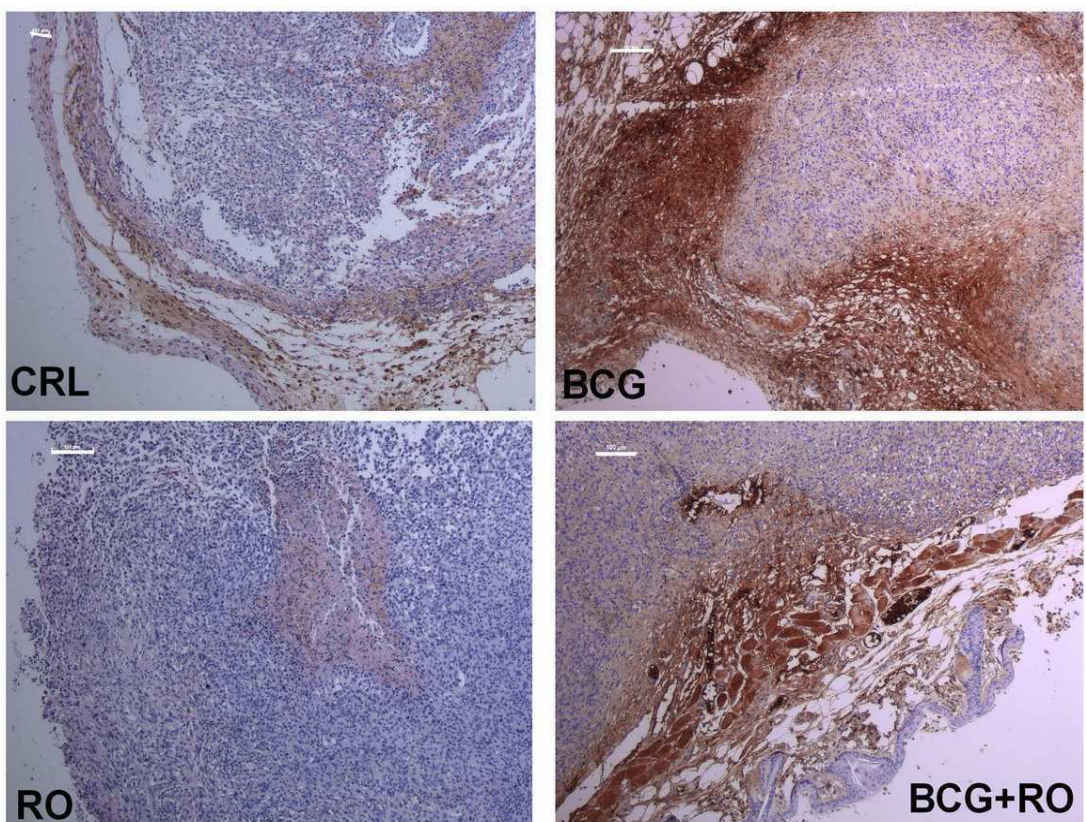


Figura 17. Tinción tricrómica de Masson (A) inmunohistoquímica para FGF-2 (B), para alfa-SMA (C). La barra en la imagen corresponde a 100 μ m.

Discusión capítulo I

La terapia intravesical con BCG es el mejor tratamiento para evitar recurrencias del cáncer de vejiga que no llega a invadir tejido muscular. Shelly et al [73], han descrito en un metanálisis, que el uso de BCG como adyuvante después de la resección transuretral reduce el riesgo de recurrencia a 12 meses en un 67% comparado con la resección transuretral sola. Sin embargo algunos efectos no deseados fueron observados luego de la administración de BCG. El exacto mecanismo de acción BCG no es del todo conocido, pero parece evocar efectos tanto directos sobre la célula tumoral, como efectos indirectos mediados por el sistema inmunológico, generando una respuesta no específica local.

En nuestro laboratorio estudiamos mecanismos que inducen la citotoxicidad en células tumorales, siendo estos mecanismos los menos explorados.

Durante la última década se ha demostrado la participación de los PPARs en la regulación de varios procesos patológicos como aterosclerosis, resistencia a la insulina y más recientemente se los ha vinculado con el cáncer. En particular se ha descrito que la activación de PPAR gamma produce inhibición del crecimiento o diferenciación de células tumorales, inhibición de la actividad de enzimas producidas durante procesos inflamatorios [74], e inhibición la carcinogénesis en modelos experimentales [75].

No existía literatura sobre el rol de PPAR en el cáncer de vejiga y su modulación por BCG. Es por esto que nos propusimos evaluar estos mecanismos. En el presente trabajo observamos que BCG induce la expresión de PPARg en líneas tumorales de cáncer de vejiga y en tumores generados por estas células. También observamos que los ligandos de PPARg potencian el efecto de inhibición del crecimiento inducidos por BCG, efecto bloqueado parcialmente en presencia de BADGE, antagonista de PPARg. Observamos además que la actividad transcripcional de PPARg está aumentada, tanto por BCG como por 15-d-PGJ2. In vivo BCG inhibe el crecimiento de tumores MB49 y BADGE bloquea dicho efecto y además aumenta el tiempo de latencia de los tumores con respecto al control. Estos resultados sugieren que PPARg tiene una actividad endógena a lo largo de la progresión tumoral y que BCG podría estar llevando a cabo su mecanismo antitumoral vía PPARg teniendo efecto sobre la célula tumoral, al menos en forma parcial.

Se ha descrito que BCG activa NF-kB tanto en macrófagos [76] como en células tumorales humanas [77]. Nosotros observamos que BCG activa NF-kB en la línea murina MB49, y que el tratamiento conjunto con 15-d-PGJ2 disminuye la degradación del inhibidor de NF-kB, sugiriendo que si bien BCG activa la vía de NF-kB generando en la célula señales de sobrevida, la presencia de un agonista de PPARg disminuye esta activación, siendo en parte posiblemente responsable del efecto antiproliferativo. Resultados previos de nuestro grupo de trabajo demuestran que el NO producido por la célula tumoral es un factor de sobrevida, y que BCG induce sobre estas células dicha producción. Teniendo en cuenta esto y el hecho de que el gen que codifica para la enzima iNOS está bajo control transcripcional de NF-kB estudiamos la actividad y expresión de iNOS. Observamos que BCG induce la producción de NO, y que el tratamiento conjunto con 15-d-PGJ2 ó RO (ligando natural y sintético respectivamente) inhiben dicha producción. Este efecto no se vio revertido en presencia del antagonista de PPARg, sugiriendo que los ligandos de éste receptor modulan a NF-kB y a la iNOS, por una vía PPARg independiente.

Luego de que estos resultados in vitro nos sugirieran que PPARg puede ser un blanco terapéutico en el cáncer de vejiga, realizamos ensayos in vivo para evaluar la posibilidad de que la activación de PPARg con un agonista, luego de la inducción de la expresión por BCG fuese una posible terapia en ésta patología. Evaluamos el efecto de BCG y de RO en tumores. En este caso la administración de RO fue sistémica. A diferencia de lo que observamos in vitro, in vivo la RO no solo no potenció el efecto inhibitorio de BCG sino que lo revirtió. Para tratar de explicar este efecto decidimos enfocarnos en dos elementos claves en el estroma tumoral: los macrófagos y los fibroblastos. Decidimos estudiar los macrófagos dado que son una de las principales células del sistema inmune que median la respuesta a BCG, y a los fibroblastos porque previamente habíamos observado que BCG inducía en los tumores un depósito de fibras colágenas como efecto adicional a la disminución del crecimiento tumoral.

Trabajando con macrófagos peritoneales de ratones portadores de tumor de los cuatro grupos experimentales (CRL, BCG, RO, BCG+RO), observamos que en el grupo de macrófagos provenientes de ratones tratados con BCG, el número de macrófagos obtenidos, su actividad metabólica, la cantidad de nitrito que producen están aumentados con respecto al grupo control. También observamos que aquellos provenientes de los ratones tratados con BCG + RO tienen disminuidos además de los parámetros antes

mencionados, el índice fagocítico y la actividad de MMP-9 comparado con el grupo que recibió solo BCG. Estos resultados nos llevan a hipotetizar que RO está inhibiendo funciones macrofágicas que serían necesarias para que BCG lleve a cabo su función antitumoral. Resultados que refuerzan esta hipótesis fueron realizados con la línea celular de macrófagos RAW 264.7, donde pudimos observar que la actividad transcripcional de NF- κ B se ve aumentada con BCG, mientras que el tratamiento combinado con RO lo inhibe. RO también fue capaz de inhibir en estas células la capacidad fagocítica específica de BCG, evidenciando entonces que los ligandos de PPAR γ revierten la activación de macrófagos inducida por BCG.

Es sabido que PPAR γ actúa directamente como regulador negativo de la expresión de genes proinflamatorios en una manera ligando dependiente por antagonizar la actividad de otros factores de transcripción como a NF- κ B y AP-1. [20]. Nuestros resultados son compatibles con estudios recientes, donde utilizando microarreglos se ha demostrado que RO inhibe un subconjunto de genes que se encuentran bajo control transcripcional de NF- κ B inducido por Toll like Receptors [78].

Cuando analizamos el tratamiento de BCG y RO en tumores creciendo en ratones inmunodeficientes, observamos que no hubo diferencias de crecimiento tumoral entre los distintos grupos experimentales. A partir de este resultado se desprende que para que BCG lleve a cabo su efecto antitumoral es indispensable la presencia de otro tipo celular como los linfocitos T (altamente reducido en ratones atímicos), reforzando la idea de que un sistema inmune completo y funcionalmente activo es necesario para una respuesta antitumoral de BCG.

BCG inhibe el crecimiento de tumores generados por la línea celular MB49. Previamente analizando la histología de estos tumores tratados con BCG, observamos que presentan un importante depósito de fibras colágenas. Como los fibroblastos son los encargados de producir el colágeno evaluamos el efecto de BCG sobre una línea de fibroblastos murinos, NHI-3T3. Así, hemos descrito, por primera vez que mientras BCG induce inhibición del crecimiento en células tumorales, es capaz de inducir la proliferación y la actividad de los fibroblastos. Este resultado in vitro sugiere que, in vivo, los fibroblastos también estén afectados por la BCG.

En procesos fisiopatológicos como una reparación de heridas, los fibroblastos, entre otros cambios, deben adquirir la capacidad de migrar hacia la zona dañada. Estos fibroblastos diferenciados son capaces de producir colágeno a modo de matriz provisoria que permite

la migración de distintos tipos celulares involucrados en la reparación. Una de las moléculas asociada al proceso de diferenciación es la SMA-alfa. Analizando por IHQ, observamos que BCG induce además de depósito de fibras colágenas, la expresión de SMA-alfa y también de FGF-2, ambas moléculas asociadas a fibroblastos activados. Estos resultados sugieren que BCG está induciendo también in vivo la proliferación y/o diferenciación de fibroblastos intratumorales. El rol del FGF-2 en la biología tumoral es controversial y dependería de la concentración y actividad relativa en el tejido específico [79]. Serán necesarios mayor cantidad de estudios para clarificar el rol del FGF-2 en respuesta a BCG en el CaV.

Trabajando con la línea de fibroblastos in vitro, también observamos que los ligandos de PPAR γ , RO y 15-d-PGJ₂, inducen la inhibición de la proliferación, y que el tratamiento con BCG genera un efecto protector. En los tumores de los grupos tratados con BCG y RO tanto el depósito de colágeno, como la SMA-alfa y el FGF-2 se vieron disminuidos. Sugiriendo entonces, que los fibroblastos del estroma tumoral están siendo afectados en forma negativa por el tratamiento con RO. Estos resultados son consistentes con ciertos trabajos que describen que tiazodilinedionas inhiben la síntesis de colágeno en modelos de fibrosis hepática. [80]. Concluimos entonces que con el tratamiento con RO, no solo las funciones macrofágicas se ven inhibidas sino también las fibroblásticas, revirtiendo así la respuesta a BCG.

Los tumores y las heridas comparten algunos componentes como el contexto inflamatorio donde se encuentran [81]. Sin embargo mientras en las heridas el proceso inflamatorio es transitorio, en los tumores, éste proceso es perpetuado en el tiempo. En 1986, Dvorak postuló el concepto de “tumores como heridas que no cicatrizan”, e hipotetizó que la composición del estroma tumoral semeja al tejido de granulación de una herida cicatrizante, lo cual sugiere que tumores epiteliales promueven la formación de su estroma, para favorecer el crecimiento del propio tumor [82]. Tratamientos que reviertan este comportamiento serían de utilidad en la clínica. Bajo este concepto, podemos hipotetizar que el tratamiento con BCG intratumoral, favorece un proceso de cicatrización que, sumado al efecto sobre el sistema inmune y al efecto directo sobre la célula tumoral finalizan en la inhibición del crecimiento tumoral.

Capítulo 2

Caracterización de un modelo ortotópico con distinto grado de invasión de cáncer de vejiga murino y evaluación de la expresión de PPARg en éste modelo y en pacientes con CaV.

Objetivos

1-DESARROLLAR Y CARACTERIZAR UN MODELO ORTOTÓPICO CON DISTINTO GRADO DE INVASIÓN DE CÁNCER DE VEJIGA MURINO.

2-EVALUAR LA EXPRESIÓN DE PPARg EN ÉSTE MODELO Y EN PACIENTES CON CaV.

Introducción

1-Invasión tumoral y metástasis

La invasión tumoral es un fenómeno que permite a la célula cancerosa alcanzar tejidos vecinos. Es un proceso de múltiples pasos que involucra interacciones célula-célula y célula-MEC y depende no sólo de la célula tumoral sino de las células que conforman el estroma. Comienza con la adhesión de la célula neoplásica a la MEC, seguida por la degradación de la misma por enzimas proteolíticas y finalmente por la migración celular a través de la MEC alterada (Figura 18). En este complejo proceso participan numerosas moléculas con actividades específicas como moléculas de adhesión y sus receptores (integrinas y proteoglicanos de membrana), factores promotores de la motilidad, componentes estructurales de la MEC (laminina, fibronectina), enzimas proteolíticas como catepsinas [83], activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) y metaloproteasas (MMP)[84].

En general se considera al desarrollo tumoral la consecuencia de la proliferación clonal de una célula que acumuló daño genómico suficiente como para malignizarse. Sin embargo, las células de un tumor presentan diferencias genotípicas y fenotípicas entre sí, fenómeno denominado heterogeneidad tumoral. Esto determina que en el seno de un tumor encontremos células con mayor capacidad replicativa, otras que expresan mayor cantidad de enzimas proteolíticas y otras que adquieren una mayor movilidad. Estas dos últimas características se ven fundamentalmente en las células localizadas en la frontera tumor-huésped, se dice que estas células han adquirido un fenotipo invasor y metastático [85].

La colonización de los tejidos circundantes y/o de órganos alejados del tumor primario constituye un proceso fisiopatológico de profunda relevancia clínica. La diseminación metastásica provoca en el huésped un impacto sistémico severo, siendo el acontecimiento que ensombrece el pronóstico del paciente oncológico. Tanto la invasión como la metástasis representan dos obstáculos enormes en la terapéutica de las neoplasias. La metástasis un proceso de baja eficiencia donde pocas células malignas logran sobrevivir en el torrente circulatorio y colonizar órganos alejados. Se trata de un proceso dinámico, complejo y selectivo, resultante de la sucesión de múltiples etapas y dependiente de la interacción de factores producidos por las células normales y malignas del paciente oncológico [85].

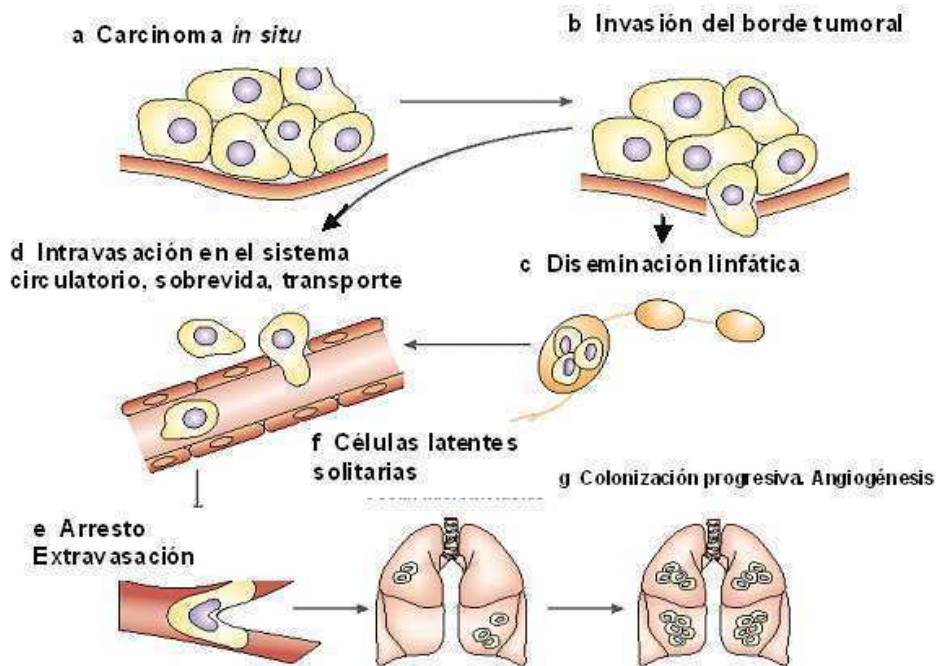


Figura 18: La metástasis es un proceso complejo que se ejecuta en múltiples pasos: (a) inicialmente tenemos un carcinoma in situ rodeado por una membrana basal indemne. (b) la invasión requiere cambios en la adherencia célula-célula y célula-matriz extracelular; degradación de proteínas de la matriz y el estroma y movilidad celular. Las células metastásicas pueden entrar por vía linfática (c) o por vía sanguínea (d). La célula tumoral se arresta y sobrevive en circulación (e), luego se extravasa y coloniza un sitio distante (f) permaneciendo en estado latente o como micrometástasis oculta, para ir creciendo progresivamente (g) hasta dar una metástasis angiogénica. Cascada metastásica. Adaptado de Steeg PS et al, 2003 [86].

2-Enzimas proteolíticas involucradas en el proceso de invasión y metástasis

Las enzimas proteolíticas que degradan la matriz extracelular son responsables en condiciones fisiológicas de la remodelación y mantenimiento de la organización tisular. Sin embargo, un incremento desregulado de la actividad proteolítica está asociado con la progresión tumoral. Como se mencionó anteriormente el activador de plasminógeno (PA), la catepsina B (CB) y las metaloproteasas (MMP) son enzimas cuya desregulación está asociada al proceso metastático.

El sistema PA está compuesto por dos serino proteasas de estructura similar: uPA, (activador de plasminógeno tipo uroquinasa) y tPA (activador de plasminógeno tipo tisular). Mientras que ambos son capaces de convertir el plasminógeno inactivo a plasmina activa, sólo el uPA participa en procesos de invasión tumoral y metástasis [87]. La actividad de uPA está regulada por la acción de inhibidores denominados PAIs, del inglés plasminogen activator inhibitor. El balance entre uPA y sus inhibidores determina la actividad enzimática crítica para desarrollar un fenotipo invasivo.

Las MMPs comprenden una familia de endopeptidasas dependientes de Zinc capaces de digerir los componentes de la matriz extracelular bajo condiciones fisiológicas. Estas proteasas son generalmente producidas en concentraciones muy bajas y son inducidas principalmente a nivel transcripcional durante la remodelación de la matriz. La actividad de uPA y MMPs, están asociadas con la capacidad invasiva en condiciones fisiológicas y patológicas. La sobreexpresión de uPA y MMPs, en varios tumores malignos está fuertemente correlacionada con el fenotipo invasor y peor pronóstico [88,89].

Las catepsinas son otro grupo de enzimas asociadas con los procesos de invasión y metástasis en cáncer [90]. De ellas la CB ha cobrado gran importancia ya que esta puede degradar componentes de la matriz extracelular y también es capaz de activar otras enzimas como el uPA y MMPs.

La CB es una cisteino-proteasa lisosomal con dos dominios globulares cuyo sitio activo se halla a nivel del surco interlobar y requiere un residuo cisteína (C29) y uno histidina (H199) para su acción catalítica [91]. Se sintetiza en el retículo endoplásmico rugoso (RER) en forma de pre-procatepsina B que es glicosilada en forma co-traducciona con

residuos de glucosamina, fucosa y manosa-6-fosfato. Este último azúcar es reconocido en forma específica por el receptor manosa-6-fosfato (M6PR) que forma parte de la membrana del RER y dirige la molécula de CB a través del trans-Golgi hacia el lisosoma. Durante este transporte la pre-proCB es procesada a procathepsina B (pro-CB) de 45 kDa que luego sufre la pérdida del propéptido por diferentes mecanismos: a) autocatálisis b) procesamiento por otra molécula de CB y c) procesamiento por otras proteasas. Así la pro-CB inactiva, se transforma en CB activa monocatenaria de 33 kDa (CB₃₃). La forma monocatenaria puede sufrir un corte en la cadena polipeptídica dando la forma bicatenaria, que también es activa. La CB bicatenaria tiene una cadena pesada de 27 o 29 kDa según el grado de glicosilación (CB₂₇₋₂₉) y una cadena liviana de 4 kDa [91].

Modificaciones en el pH del medio, originan cambios conformacionales en la molécula de CB, que le permiten actuar como endopeptidasa o exopeptidasa, esta doble función hace que la enzima intervenga en diferentes mecanismos fisiológicos que ocurren a diferente pH, según su localización [92].

En la década del noventa se demostró que durante la transformación neoplásica, la CB está aumentada y se libera extracelularmente [93]. La CB puede actuar sobre diferentes componentes de la matriz extracelular como las moléculas de colágeno, fibronectina y laminina colaborando en la degradación de la matriz extracelular. También puede activar otras proteasas asociadas a procesos de invasión como el uPA y las MMPs. En esa misma época se demostró que líneas celulares de cáncer de vejiga invaden membranas basales, mediante la secreción de CB [94]. Estas observaciones indican una clara asociación entre la CB y el proceso de invasión tumoral que llevará finalmente a la formación de metástasis. (Figura 19).

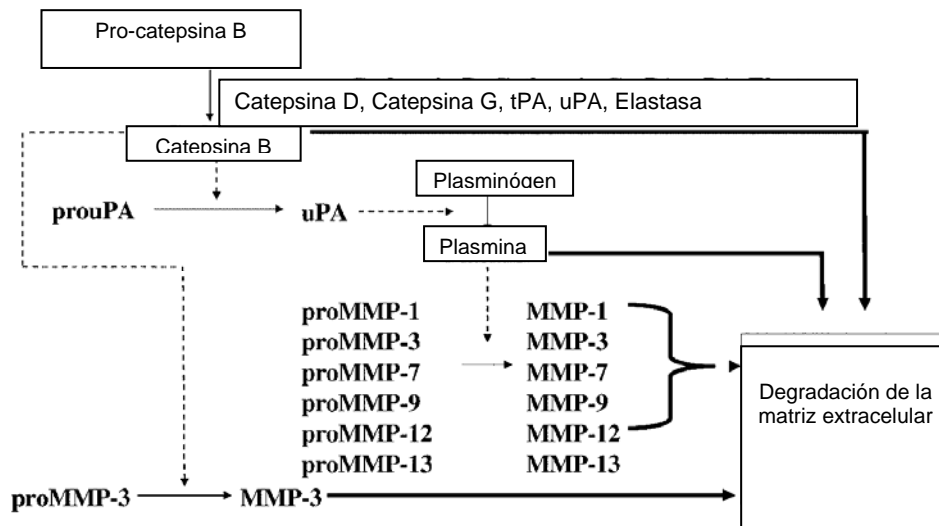


Figura 19: Cascada proteolítica que interviene en la degradación de la MEC.

Las flechas de líneas finas representan pasos donde una pro-enzima se transforma en su forma activa. Las flechas de líneas punteadas representan los pasos en los cuales las diferentes proteasas funcionan como activadoras de otras. Las flechas de líneas gruesas representan la degradación directa de la matriz extracelular por las diferentes formas activas. Podemos ver que CB juega un rol central no solo en la activación de serino y metaloproteasas, sino que actúa directamente en la degradación de la MEC. Adaptado de Yan S et al, 2003 [95].

3 - Catepsina B y microambiente tumoral

Se conoce que la interacción del tumor con su microambiente afecta la expresión de MMPs y serino proteasas [96,97]. El incremento de estas enzimas en el tumor puede reflejar cambios en los niveles de expresión dentro de la célula tumoral o bien ser producto de la actividad de otros tipos celulares (fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células endoteliales) del microambiente tumoral. [98]

En modelos murinos transgénicos de carcinoma de células escamosas la expresión de MMP-9 se debe, principalmente, a células inflamatorias, facilitando la invasión, la proliferación y la angiogénesis [99,100].

Se ha reportado aumento de la expresión de MMP-2 y MMP-9 en células de carcinoma de endometrio durante la progresión histológica de G 1 a G 2 y G3 [101]. En carcinoma de mama está aumentada la expresión de uPA, su inhibidor PAI-1 y de la MMP-2 en fibroblastos del estroma tumoral [102].

Es menos conocido, como las interacciones del tumor y su microambiente afectan la expresión de cisteino-proteasas, particularmente de catepsina B y como esta interacción podría impactar en la proteólisis.

En 1957 Sylven y Malmgreen reportan que las cisteino-proteasas son afectadas por el microambiente, al observar que la actividad “cateptica” en un medio ácido en presencia de cisteino-activadores fue mayor en la periferia de tumores sólidos transplantados [103]

Los estudios indican que una pauta terapéutica para reducir la proteólisis tumoral debería apuntar a 1) más de una familia de proteasas, 2) las células tumorales, 3) las células asociadas al tumor (fibroblastos y células inflamatorias) y 4) a la interacción entre células tumorales con otros tipos celulares y elementos estromales que comprenden el microambiente tumoral.

3.1- Catepsina B y cáncer de vejiga.

Un hallazgo consistente es el incremento en la expresión de CB en tumores humanos y murinos [104], observándose también en lesiones epiteliales premalignas. Diferentes tumores humanos han mostrado aumento en la expresión de CB como la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN) [105] y en el esófago de Barrett [106]. Los tumores de colon presentan aumento de la expresión de CB en células tumorales, macrófagos inflamatorios asociados al tumor y fibroblastos estromales [107]. Algunos casos muestran elevados niveles de expresión en los macrófagos del frente de invasión en tumores colónicos, mientras que en las células tumorales no se ve expresión [108]. También se ha reportado niveles elevados de CB en células de carcinoma de próstata del frente de invasión, comparado con las células más internas de la masa tumoral [109].

Antecedentes de nuestro grupo de trabajo demuestran que los niveles de expresión de CB en la orina y en plasma de pacientes con carcinoma transicional de vejiga estaba aumentada[90,110]. También un antecedente de nuestro laboratorio es la demostración de

que la expresión medida por inmunohistoquímica y Western Blot, de las formas activas de CB es mayor en tumores invasores comparado con tumores superficiales. Además, tejido proveniente de vejiga normal expresa sólo la isoforma de 29 kDa, mientras que tanto los tumores como la línea celular de cáncer de vejiga humano T24, expresan tanto la isoforma de 33 kDa como las isoformas de 27-29 kDa sugiriendo que la progresión tumoral está asociada con cambios cuanti y cualitativos en la expresión de CB.[90].

4-Angiogénesis

La formación de nuevas estructuras vasculares a partir de un lecho vascular existente, conocida como angiogénesis, es un proceso complejo que comprende la proliferación de las células endoteliales, la digestión proteolítica de la matriz tisular, la migración de las células endoteliales y la diferenciación de los capilares funcionales. Durante la vida adulta, la actividad angiogénica es casi nula, exceptuando procesos fisiológicos como la curación de un tejido luego de una herida, la menstruación, el embarazo [111]. El proceso angiogénico se encuentra finamente regulado por la actuación de factores pro y antiangiogénicos, estableciendo un balance que determina que la vasculatura permanezca en estado quiescente y la tasa de proliferación de las células endoteliales se mida en miles de días. Sin embargo en respuesta a un estímulo como la hipoxia o la inflamación, las células endoteliales comienzan a dividirse con mayor velocidad. En muchas patologías este estímulo se convierte en excesivo y el balance entre las señales estimuladoras e inhibitorias se rompe promoviendo la neoangiogénesis. En las fases más tempranas del proceso de invasión y metástasis tumoral se produce este proceso que implica el desarrollo y organización de nuevas estructuras vasculares sobre la masa tumoral primaria y posibilita la nutrición y el crecimiento de las células malignas. Los nuevos capilares en formación tienen membranas basales fragmentadas y son porosas, lo que permite la penetración de las células tumorales con más facilidad que en los vasos maduros. El comportamiento quimiotáctico invasor de las células endoteliales en las asas capilares resulta facilitado por la liberación de enzimas degradativas que, a su vez, colaboran en la entrada de las células tumorales dentro de las nuevas estructuras vasculares [112].

La hipoxia acontece rápidamente en el desarrollo de un foco tumoral debido a la alta tasa proliferativa de las células que lo componen. Las células tumorales no pueden crecer más allá de 100 μm de distancia a un vaso sanguíneo ya que la difusión del oxígeno se torna escasa. Bajo estas condiciones, los tumores pueden permanecer en estado latente meses e incluso años hasta que una subpoblación adquiere la capacidad de inducir angiogénesis. En este estado se dice que el tumor tuvo un cambio o “switch” angiogénico y es entonces capaz de expandir su tamaño. Mientras las células tumorales no sean capaces de inducir la formación de nuevos vasos, la masa tumoral no alcanzara un tamaño mayor a 1-1,5 mm de diámetro [113].

5- Transición epitelio mesenquimática

El epitelio normal es una estructura de tejido sumamente regulada que requiere un dialogo estrecho entre células vecinas. Las uniones fuertemente adhesivas entre células y entre células y la MEC inhiben el movimiento de células individuales y permiten la formación de una capa celular epitelial uniforme con superficies apicales y basales polarizadas.

La pérdida de adhesión entre las células, el aumento en la motilidad celular y la desdiferenciación reversible son eventos que suelen ser más marcados en los procesos de cicatrización, y sobre todo en embriogénesis durante la migración de células de la cresta neural y en la gastrulación [114], cuando el mesodermo se está formado. Los cambios morfológicos y fenotípicos que ocurren durante estos últimos procesos se definen como la transición epitelio-mesenquimática (EMT). La EMT causa la pérdida de los rasgos epiteliales que incluyen la pérdida de E-cadherina, placoglobina y citoqueratinas y el desmontaje de uniones adherentes y desmosomas, acompañado por la adquisición de características mesenquimáticas, incluyendo la expresión de vimentina, actina de músculo liso, la N-cadherina, miosina, fibronectina, metaloproteasas además de cambios morfológicos asociados con la capacidad de desarrollar la motilidad invasora. Estos cambios morfogenéticos, que caracterizan a la EMT, son controlados por un número de genes maestros, incluyendo Slug, Snail, ZEB y Twist, los cuales también están inducidos en algunos cánceres invasores [115,116].

5.1- Transición epitelio mesenquimática y cancer

Un porcentaje importante de los cánceres son de origen epitelial. A medida que estos se desarrollan, las células tumorales invaden el tejido circundante como células solas o grupos de células formando un frente invasor. Las células tumorales para llevar a cabo el proceso de invasión y metástasis exhiben propiedades epiteliales o mesenquimáticas a diferentes tiempos o al mismo tiempo [117]. Las células que entran en la TEM exhiben disminución de la adhesión célula-célula, incremento de la expresión de proteasas, y moléculas de la matriz extracelular [118]. Simultáneamente se observa disminución en marcadores clásicos de las células epiteliales como la E cadherina, y citoqueratinas (CK) e incremento en marcadores de células mesenquimáticas. La vimentina es el marcador mesenquimático más asociado con la TEM, Su expresión aberrante está asociada a procesos de migración e invasión tumoral [119] y este tipo de transición se ha asociado a la progresión tumoral. Si bien la TEM puede ser activada por diferentes caminos, la vía Wnt y la del TGF-beta parecen tener un papel preponderante promoviendo la expresión de moléculas represoras de la expresión de E-cadherina como son los factores de transcripción Twist, Snail, Slug y SIP1. [116].

6- Modelos animales en cáncer de vejiga

Los modelos animales son de gran utilidad para el estudio de la progresión tumoral y/o diseño de nuevas modalidades diagnósticas y terapéuticas. Para que sean útiles es necesario que presenten la mayor similitud posible con la patología en humanos. Muchos de los modelos tumorales utilizan la inoculación de líneas celulares que han sido seleccionadas por sucesivos cultivos in vitro. Estos modelos tienen la ventaja de ser fáciles de obtener sin embargo los resultados a partir de ellos son muy acotados ya que los tumores son entidades más complejas. Ellos están formados por varias poblaciones celulares normales y tumorales con diferentes grados de agresividad que interactúan entre sí para dar las características biológicas al tumor. Las líneas celulares tumorales usadas

para generar modelos animales frecuentemente están compuestas por un único tipo celular el cual no semejaría las condiciones fisiopatológicas. Como se dijo anteriormente los tumores están compuestos por varios tipos celulares diferentes, tanto malignas como normales derivadas del hospedador, cuyas interacciones favorecen o inhiben el crecimiento tumoral.

El sitio de inoculación tumoral también es un punto importante. La mayoría de los estudios se realizan utilizando la inoculación subcutánea. Este tipo de inoculación presenta la ventaja de ser fácil de inocular y de evaluar el crecimiento. Sin embargo la inoculación ortotópica es la que permite evaluar más correctamente las interacciones huésped-tumor. El modelo de xenotransplante, si bien imitaría la patología humana ya que involucra la implantación de células tumorales humanas, la mayoría derivada de pacientes, en animales inmunodeficientes [120], no representa la realidad ya que las interacciones entre células y el microambiente no es asemejable a tumores provenientes de otras especies. Otras opciones son los modelos animales singeneicos y dentro de estos los transgénicos. Dentro de los grupos de modelos singeneicos se incluyen los químicamente inducidos. Los tres carcinógenos más comúnmente usados son N-butil-N-(4-hidroxibutil) nitrosamina (BBN), el N-(4-(5-nitro-2-furyl)-2-tiazol) formamida (FANFT) y N-Metil-N-nitrosourea (MNU). Las ventajas de este modelo podrían incluir un bajo costo y un hospedador inmunocompetente, mientras que una desventaja podría ser que suelen ser necesarios tiempos prolongados para llevar a cabo su inducción. Los modelos transgénicos son muy importantes en cáncer de vejiga, el ejemplo más comúnmente usado es la mutación de H-ras [121]. Este tipo de modelos facilita la investigación en defectos genéticos particulares durante la carcinogénesis pero requieren la presencia de promotores artificiales y son muy caros.

7-Alteraciones cromosómicas y genéticas

El cáncer está asociado con anormalidades cromosómicas, tales como deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones. Se identificaron más de 640 rearrreglos cromosómicos balanceados recurrentes en cáncer, que involucran cerca de 100 genes. Las

translocaciones pueden producir la desregulación de genes que conducen a la transformación celular y la producción de tumores, ya que pueden posicionar genes bajo el control de promotores fuertes o formar genes de fusión [122]. Por otra parte, las deleciones, la pérdida de un brazo o del cromosoma entero, pueden producir la pérdida de uno de los alelos de un gen supresor de tumor y revelar mutaciones recesivas del otro alelo [123]. Las anormalidades en el cariotipo pueden afectar también el número de los cromosomas, dando lugar a la aneuploidía, definida como ganancia o pérdida de cromosomas individuales. La aneuploidía está presente durante la progresión de todos los tumores y es causada por una incorrecta segregación de los cromosomas durante la mitosis [124].

Resultados

PARTE I -Caracterización de un modelo ortotópico con distinto grado de invasión de cáncer de vejiga murino.

Obtención del nuevo modelo de estudio

Obtención de la línea celular MB49-I: Por sucesivos pasajes con trocar del tumor primario generado por MB49, obtuvimos una nueva línea MB49-I

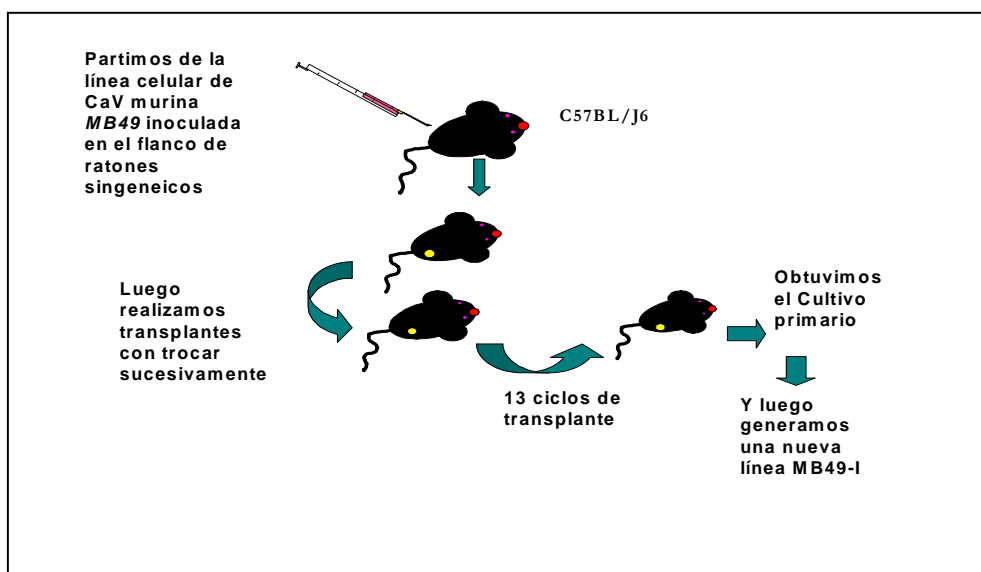
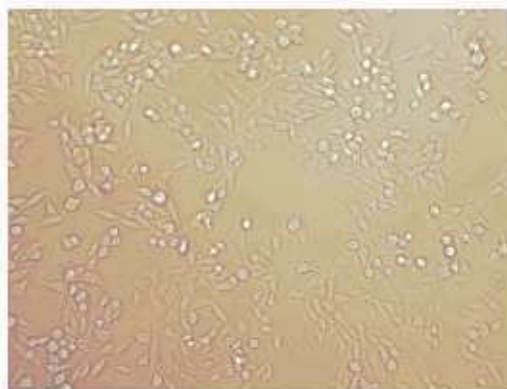


Diagrama de obtención de la línea celular MB49-I.



MB49



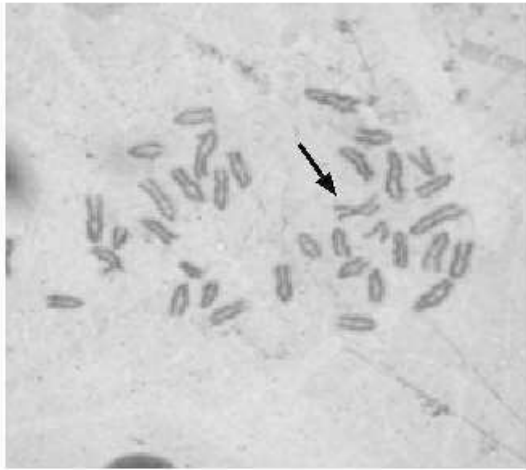
MB49-I

Figura 20. Imagen de contraste de fase de ambas líneas celulares creciendo en monocapa. (400x). La línea celular parental MB49 presenta gran proporción de células ahusadas, observándose también células redondeadas compatibles con células en división. Las células de línea la obtenida MB49-I presentan un mayor tamaño celular con respecto a las que conforman a MB49, con abundante citoplasma y morfológicamente más poligonales. Sólo en condiciones de crecimiento en baja densidad presentan una morfología fusiforme. Esta nueva línea tiene menor velocidad de crecimiento in vitro y menor proporción de células redondeadas.

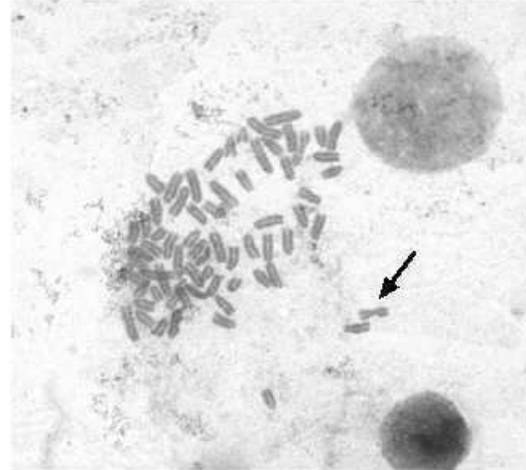
Análisis del Cariotipo

El estudio del número de cromosomas de la línea parental MB49 reveló la presencia de dos poblaciones celulares, una con un número modal de 40 cromosomas, con un rango de 37 a 43 cromosomas, y en la otra población se encontró un número modal de 80 cromosomas y un rango de 70 a 83 cromosomas. El análisis de las metafases mostró la presencia de alteraciones cromosómicas derivadas de translocaciones Robertsonianas, las cuales denominamos marcadores cromosómicos. Estos marcadores, un cromosoma submetacéntrico y un cromosoma metacéntrico pequeño, no fueron encontrados juntos en una misma célula. Hemos observado dos subpoblaciones de células, ambas con número cromosómico diploide y tetraploide que presentaban ya sea un marcador ó el otro. El análisis del bandeo G reveló que ambos marcadores involucraban al cromosoma 19. Hemos encontrado también un cromosoma largo acrocéntrico como resultado de una translocación que no ha sido todavía identificada.

La línea celular obtenida MB49-I presenta un 24% de células cuyo rango del número de cromosomas es diploide, 32-46 cromosomas con un número modal de cromosomas de 40 y un 76% de células con un rango triploide-tetraploide (50-87 cromosomas, con un número modal de 80 cromosomas). El análisis del cariotipo reveló la presencia de las dos subpoblaciones de células observadas también en la línea celular MB49, con el mismo marcador cromosómico derivado del cromosoma 19. Ambas subpoblaciones fueron encontradas con un rango de cromosomas diploide y poliploide.



MB49



MB49-I

Figura 21. Fotos representativas de metafases teñidas con Giemsa de ambas líneas celulares donde se observan los marcadores descritos.

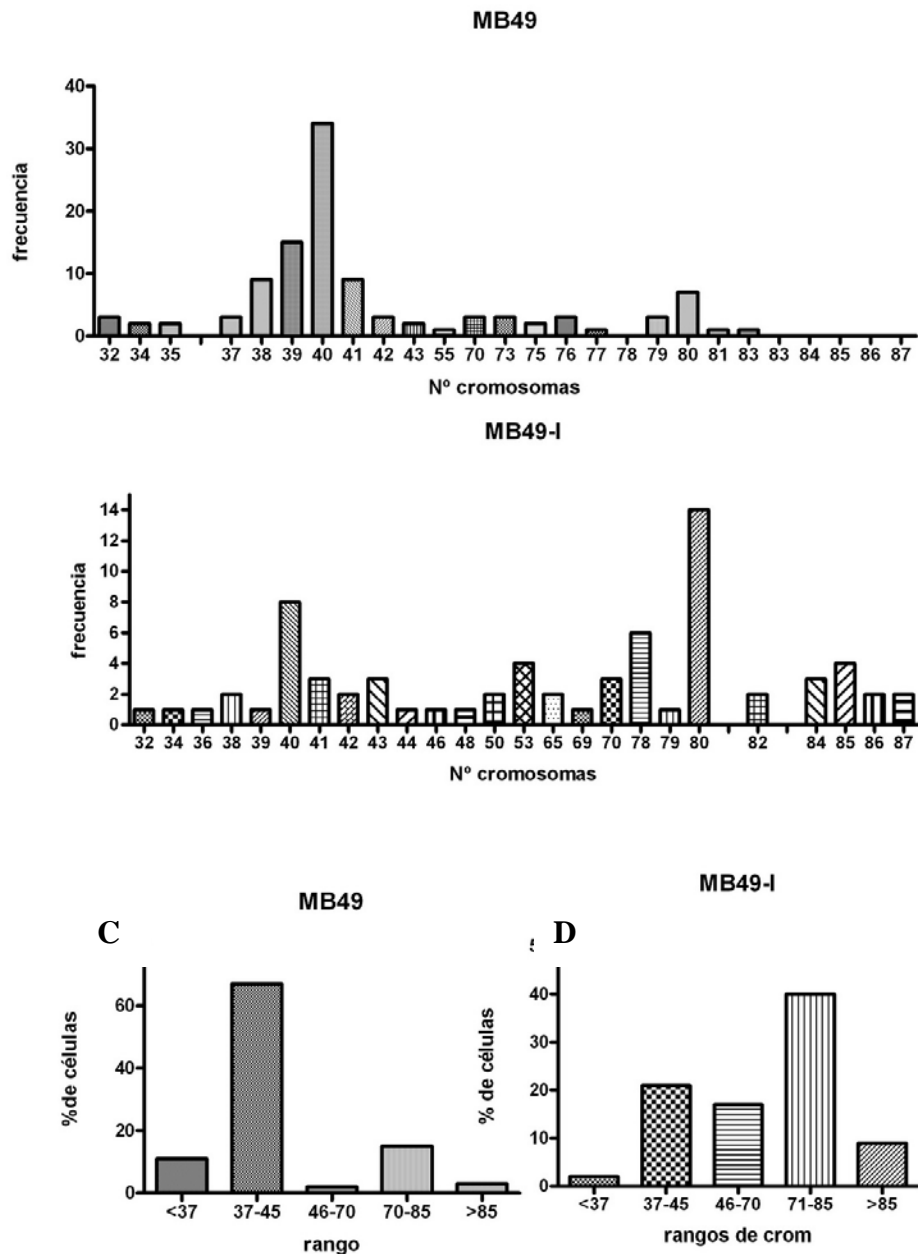


Figura 22: Análisis del número cromosómico. A. Histograma de frecuencia de la línea parental MB49. B. Histograma de frecuencia de la nueva línea obtenida, MB49-I. C. Distribución del número de cromosomas agrupados para MB49. D: Distribución del número de cromosomas agrupados para MB49-I.

MB49-I presenta mayor actividad de enzimas proteolíticas y capacidad invasora in vitro que MB49.

La actividad de uPA fue mayor en MB49-I que en MB49 (fig. 23A). Una banda de degradación gelatinolítica de 105 kDa correspondiente a MMP-9 fue detectada en ambas líneas celulares. Una marcada actividad de MMP-9 fue observada en el medio condicionado de las células MB49-I comparado con su línea parental, la línea MB49 (Fig. 23B & C). MB49-I también presentó una actividad aumentada de la actividad de Catepsina B comparado con MB49. (Fig. 23D). La actividad enzimática de CB de ambas líneas celulares fue inhibida en presencia de CA, un inhibidor específico de dicha enzima. (Dato no mostrado). Para evaluar si el incremento de la actividad de las enzimas antes mencionadas está asociada con la capacidad invasiva llevamos a cabo un ensayo de invasión en matrigel en donde se observó que MB49-I presenta una mayor capacidad invasiva comparado con la línea celular parental (Fig. 23E).

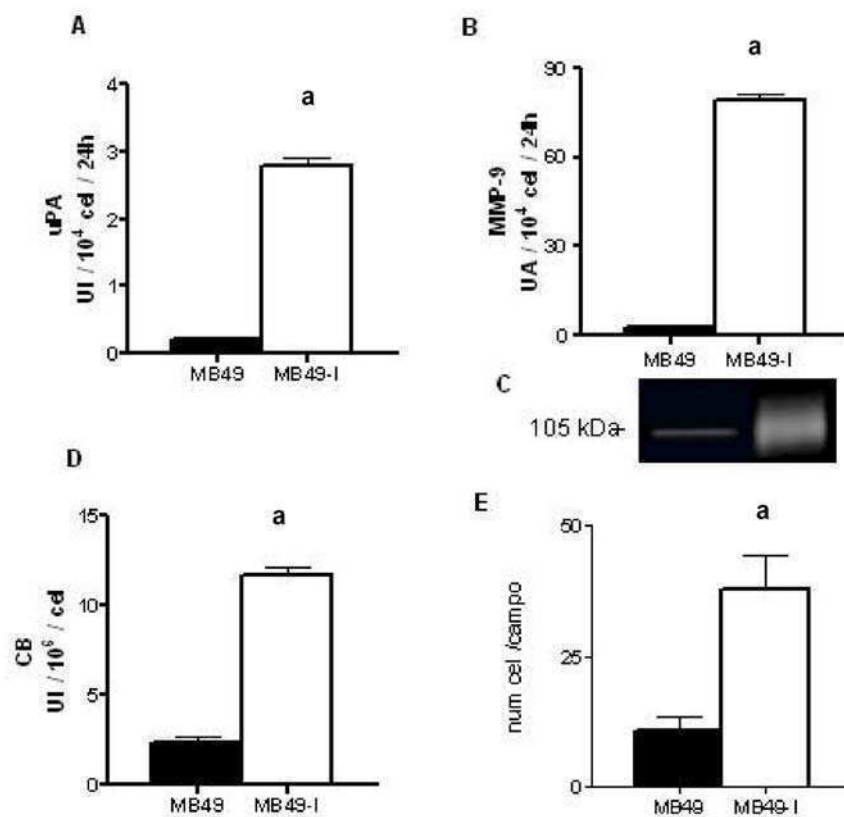


Figura 23. Actividad de enzimas proteolíticas. A: Cuantificación de actividad de uPA por caseinólisis radial. La actividad de uPA secretada fue cuantificada por caseinólisis radial en el Medio Condicionado de cultivos celulares MB49 y MB49-I. B: Cuantificación de la actividad de MMP-9 por zimografía. C: Bandas de actividad proteolíticas fueron cuantificadas con un densitómetro digital, los datos están expresados como unidades arbitrarias. D: Cuantificación de CB a través de un ensayo colorimétrico. CB fue cuantificada por un método colorimétrico usando un sustrato específico en lisados de células MB49 y MB49-I. E: Cuantificación del ensayo de invasión en cámaras Transwell. Los datos están expresados como la media \pm S.D de determinaciones por triplicado, Los experimentos fueron realizados tres veces con resultados similares. La actividad de las tres enzimas y la capacidad invasiva fueron mayores en MB49-I comparado con MB49, $a, p < 0.0001$ (Student's *t* test).

MB49-I presenta mayor velocidad de crecimiento que MB49 creciendo en forma subcutánea.

MB49-I mostró una mayor velocidad de crecimiento subcutáneo y un menor tiempo de latencia que la línea celular parental. Ya que la velocidad de crecimiento de MB49-I es mayor que la de MB49, para evaluar la incidencia de metástasis espontáneas un nuevo set de experimentos fue llevado a cabo donde los pulmones fueron removidos a igual tamaño tumoral. Tanto la incidencia tumoral como el número de metástasis por pulmón fueron significativamente mayores para MB49-I que para MB49 (Tabla III).

Tabla III: Crecimiento heterotópico de las líneas de cáncer de vejiga.

	Latencia (días)	Velocidad de crecimiento (mm ³ /día)	Ratones con metastasis pulmonares	Metástasis pulmonares mediana (rango)	Ratones con ganglios hiperplásicos
MB49	10	1,16 +/- 0,9	8/10	15 (0-22)	2/10
MB49-I	6	23,2 +/- 5 ^a	10/10	30 (10-33) ^b	8/10 ^c

Tabla III. 1×10^5 células MB49 y MB49-I fueron inoculadas sc. MB49-I muestra mayor velocidad de crecimiento y menor latencia comparado con MB49 (a: $p < 0.0001$, Student's t test). Para evaluar la incidencia metastásica espontánea, los pulmones fueron removidos cuando los tamaños tumorales fueron aproximadamente de 400 mm³. La incidencia fue similar mientras el número de metástasis pulmonares fue mayor para MB49-I comparado con ratones portadores de tumor MB49. (b: $p < 0.001$ Chi-square test and Mann-Whitney test respectivamente). El número de ratones con ganglios hiperplásicos fue mayor en MB49-I comparado con la línea parental. (c $p < 0.05$ by Chi-square test). No se detectaron metástasis ganglionares en ningún grupo.

MB49-I desarrolla mayor número de metástasis experimentales pulmonares.

Luego de siete días de la inoculación de 5×10^4 células MB49-I ó MB49 en la vena de la cola de ratones singeneicos, MB49-I generó mayor número de metástasis experimentales pulmonares comparado con la línea MB49. La línea parental presentó una mediana de 62 nódulos metastáticos por ratón rango de 7-76, mientras que los ratones inoculados con MB49-I presentaron 162 nódulos por ratón con un rango de 107-250 (Fig. 5).

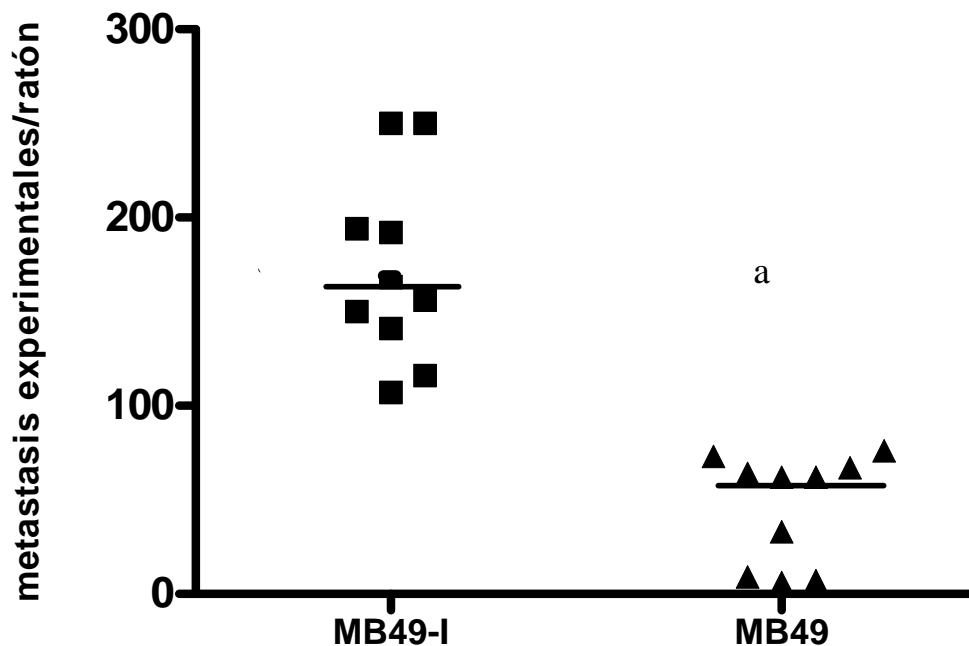


Figura 24. Ensayo de metástasis experimentales pulmonares. El número de nódulos metastásicos pulmonares después de la inoculación de 5×10^4 células MB49 ó MB49-I. La línea celular MB49-I induce un mayor número de metástasis pulmonares que MB49.a: $p < 0.001$ (Mann-Witney test).

MB49-I presenta mayor expresión de Vimentina

In vitro la línea celular MB49, expresa abundante citoqueratina 18 y escasa vimentina mientras que la nueva línea MB49-I expresa vimentina y presenta una disminución de la expresión para citoqueratina 18 (Fig. 25A). Sin embargo, in vivo, los tumores de vejiga generados por inoculación de las líneas MB49 ó MB49-I expresaron citoqueratina y los tumores generados con la línea MB49-I presentan mayor expresión de vimentina. (Fig. 25 B). También el análisis histológico de las metástasis pulmonares generadas por el tumor MB49-I es positivo para la expresión de citoqueratina.

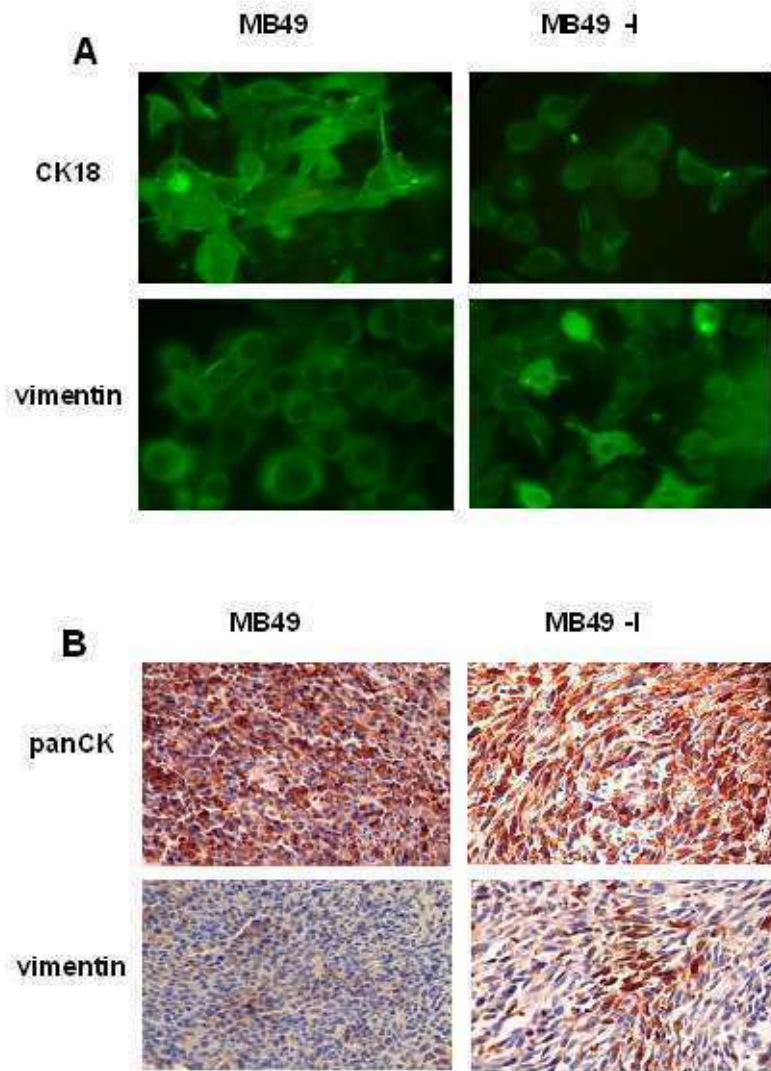


Figura 25. Expresión de citoqueratina y vimentina. A: La inmunofluorescencia muestra que la línea celular MB49 presenta una fuerte expresión de citoqueratina 18 y una insignificante expresión de vimentina. Un perfil de expresión inverso es observado en la línea celular MB49-I donde CK 18 está disminuida y está aumentada la expresión de vimentina (400X). **B:** Por inmunohistoquímica se observa que ambos tumores, generados por MB49 y por MB49-I, expresan citoqueratina mientras que sólo el tumor generado por la inoculación de la línea celular MB49-I expresa vimentina.

La línea celular MB49-I genera tumores de vejiga invasores.

Diferentes números de células MB49-I ó MB49 (10^3 , 10^4 y 10^5 cel/ratón) fueron inoculadas en la vejiga de ratones singeneicos y varios parámetros de crecimiento como hematuria, incidencia tumoral y metástasis fueron evaluados. MB49-I mostró un comportamiento más maligno que la línea MB49, mostrando mayor número de metástasis pulmonares que MB49 cuando se inocularon 10^4 y 10^5 cel/ratón. No se observaron metástasis en los ganglios linfáticos para ninguna de las dos líneas celulares (tabla IV).

Tabla IV: Crecimiento ortotópico de distinto número de células.

	Número de células	Ratones con hematuria	Día de la primer hematuria	Ratones con tumor	Ratones con metástasis pulmonares	Ratones con ganglios hiperplásicos
MB49	1×10^3	0/6	-	0/6	0/6	0/6
	1×10^4	4/6	15	6/6	0/6	0/6
	1×10^5	6/6	9	6/6	0/6	6/6
MB49-I	1×10^3	0/6	-	0/6	0/6	2/6 ^c
	1×10^4	4/6	9	6/6	2/6 ^a	6/6 ^d
	1×10^5	6/6	7	6/6	2/6 ^b	6/6 ^e

Tabla IV. Diferente número de células fueron inoculados luego de la electrocauterización. Los animales fueron sacrificados dos semanas luego de la implantación tumoral. b y c $p < 0.05$; d, e $p < 0.01$ comparado con MB49 Chi-cuadrado test.

Para evaluar el crecimiento tumoral y la incidencia metastásica realizamos un nuevo set de experimentos con diez animales por grupo, usando 1×10^4 cel/ratón. La línea MB49-I presentó un promedio de peso de la vejiga mayor que las vejigas que recibieron la línea MB49 y a su vez la vejiga inoculada con MB49 presentó mayor peso promedio que la vejiga normal, siendo ésta de aproximadamente 20 mg. Metástasis, hematuria y ganglios hiperplásicos fueron detectados en MB49-I pero no en ratones portadores de tumores MB49 (Tabla V). A pesar de que los tumores invasores en pacientes generarían metástasis en ganglios linfáticos drenantes, nosotros no hemos encontrado presencia de metástasis ganglionares pero si se han observado ganglios paraórticos hipertróficos en ratones portadores del MB49-I (Tabla V). El comportamiento clínicopatológico de tumores MB49-I es muy cercano al comportamiento de tumores invasores en pacientes.

Tabla V: Crecimiento ortotópico de 1×10^4 de las líneas celulares MB49 y MB49-I

	Incidencia	hematuria	Peso de la vejiga (mg)	Ratones con metástasis pulmonares	Metástasis pulmonares Mediana (rango) #	Ratones con ganglios hiperplásicos
MB49	10/10	5/10	43,2 +/-12,0	0/10	-	0/10
MB49-I	10/10	10/10 ^a	137,0 +/-30,1 ^b	5/10 ^a	5 (2-10)	7/10 ^c

Tabla V. 1×10^4 células fueron inoculados luego de la electrocauterización. Los animales fueron sacrificados dos semanas luego de la implantación tumoral.

^a $p < 0.05$ ^b $p < 0.0001$ ^c $p < 0.01$ comparado con MB49 por Chi-cuadrado test.

#Metástasis pulmonares fueron calculadas a igual tamaño tumoral.

Estudios histopatológicos revelaron que la inoculación intravesical de células MB49 promueven el desarrollo de papilomas de células transicionales de base gruesa bien definida (sésil) que alcanza el tejido conectivo, tanto como carcinomas sólidos con

pequeños nidos de células moderadamente diferenciados que no invades el músculo. (Fig. 26A).

En los cortes histológicos se puede observar también infiltrado de células inflamatorias y presencia de capilares dilatados en la zona tumoral y en el tejido conectivo.

Las áreas de carcinoma muestran arreglos celulares desorganizados y unas pocas figuras mitóticas (4+/- 1 figuras mitóticas por campo). Se observa también descamación de células de la superficie vesical.

Por otro lado la inoculación de la línea celular MB49-I genera carcinomas con estructura desorganizada, tumores de mayor tamaño mostrando mayor proporción de atipias celulares comparado con el tumor generado por MB49. Se observan también tumores que invaden la capa muscular y causan engrosamiento de la pared de la vejiga. Comparado con el tumor generado por MB49, el tumor generado por MB49-I es pobremente diferenciado con la presencia de aberrantes y abundantes figuras mitóticas (13 +/- 2/figuras por campo). Así, pudimos obtener tumores que traspasen la pared de la vejiga e invadan a órganos adyacentes. Sólo en el caso de tumores generados por MB49-I y no por MB49, creciendo en forma ortotópica se generaron metástasis pulmonares.

El comportamiento histológico del tumor MB49 semeja a tumores con estadios superficiales en pacientes con cáncer de vejiga, al mismo tiempo el comportamiento histológico del tumor MB49-I es muy cercano a los tumores invasores observado en pacientes.

Las figuras 26 A3 y B3 representan cortes histológicos de ganglios linfáticos drenantes de la vejiga de ratones portadores de tumor de MB49 y MB49-I respectivamente. Se puede observar que en el caso de los provenientes de ratones portadores de tumor MB49-I, los ganglios presentan focos hiperplásicos. Las figuras 26 A4 y B4 corresponden a cortes histológicos de pulmón, donde se observa sólo para en el caso de portadores de tumor MB49-I la presencia de focos metastásicos.

MB49

MB49- I

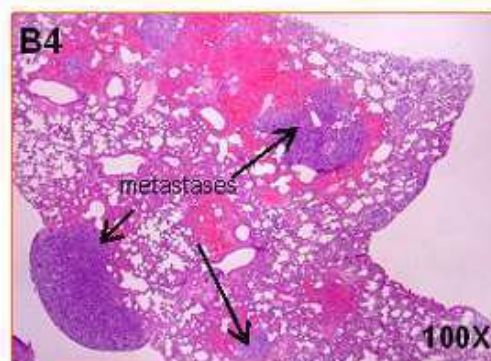
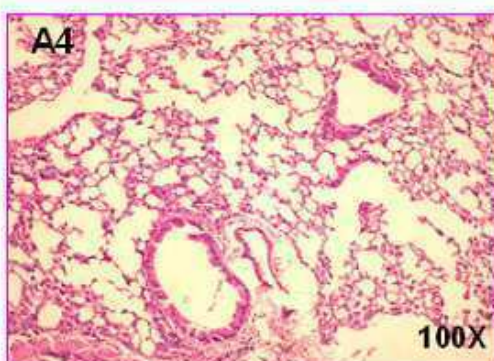
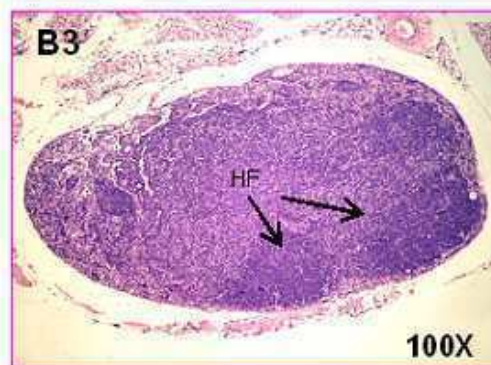
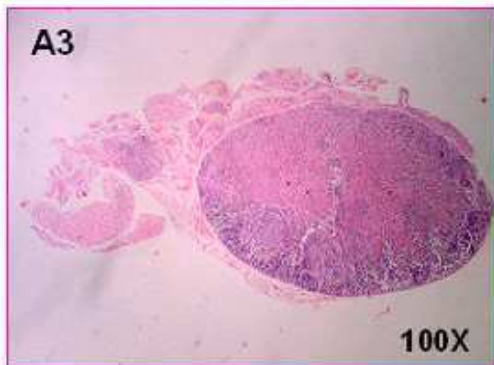
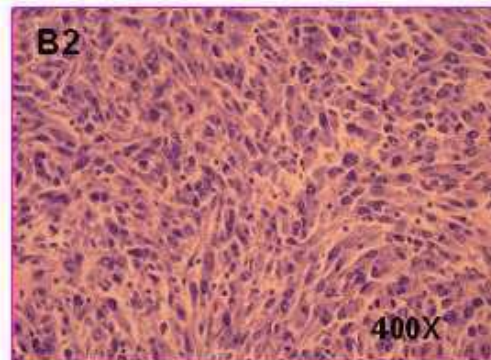
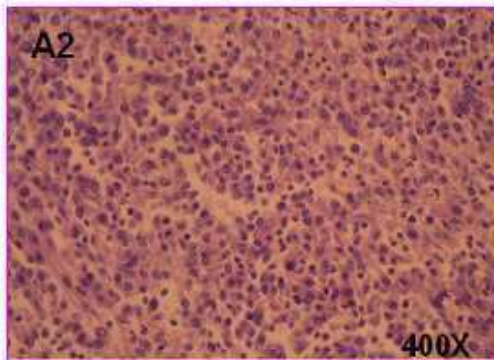
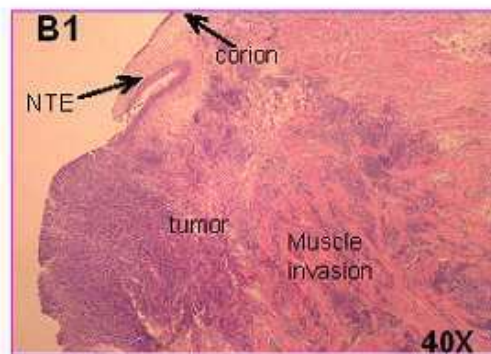
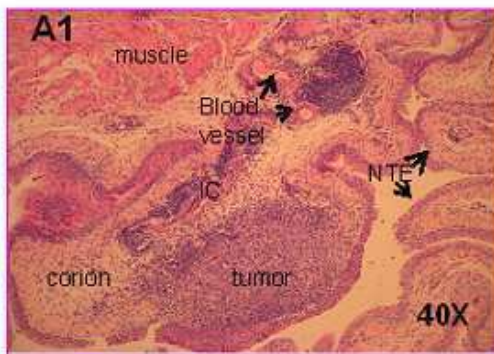


Figura 26. Características histopatológicas de los ratones portadores de tumor. Tinciones para Hematoxilina-eosina de tumores de vejiga (A1 A2, B1 B2), ganglios linfáticos (A3, B3) y pulmones (A4, B4) de ratones portadores de tumor MB49 ó MB49-I. A1: Figura panorámica de vejiga inoculada con MB49: Tumor superficial creciendo en el corion a través del epitelio transicional normal (NTE) sin invasión del músculo, vasos sanguíneos y abundante infiltrado inflamatorio (IC). A2: Carcinoma sólido moderadamente diferenciado con infiltrado de IC. A3: Ganglios linfáticos y A4: Pulmones sin metástasis. B1: Tumores inoculados con MB49-I muestran invasión muscular B2 Tumores muestran células pobremente diferenciadas y abundantes figuras mitóticas. B3 Ganglios linfáticos con focos hiperplásicos (HF). B3: Pulmones con metástasis y focos hemorrágicos rodeando a las metástasis. El aumento se encuentra detallado en cada figura.

El tumor MB49-I presenta mayor angiogénesis comparada con el tumor MB49.

Los ratones fueron sacrificados catorce días después de la inoculación ortotópica y las vejigas fueron obtenidas para analizar la expresión de CD31, marcador característico de células endoteliales, con el objetivo de cuantificar los vasos sanguíneos presentes en el tumor. Se puede observar que la vejiga inoculada con la línea celular MB49-I presenta mayor número de vasos sanguíneos que el tumor generado por la línea MB49 (Fig 8A). También a través de la tinción de CD31 y posterior análisis del área ocupada por los vasos sanguíneos con respecto al área total del campo se puede observar que la superficie de los vasos sanguíneos con respecto a la superficie del campo es mayor en tumores MB49-I que en tumores inoculados con la línea parental (Fig 8B).

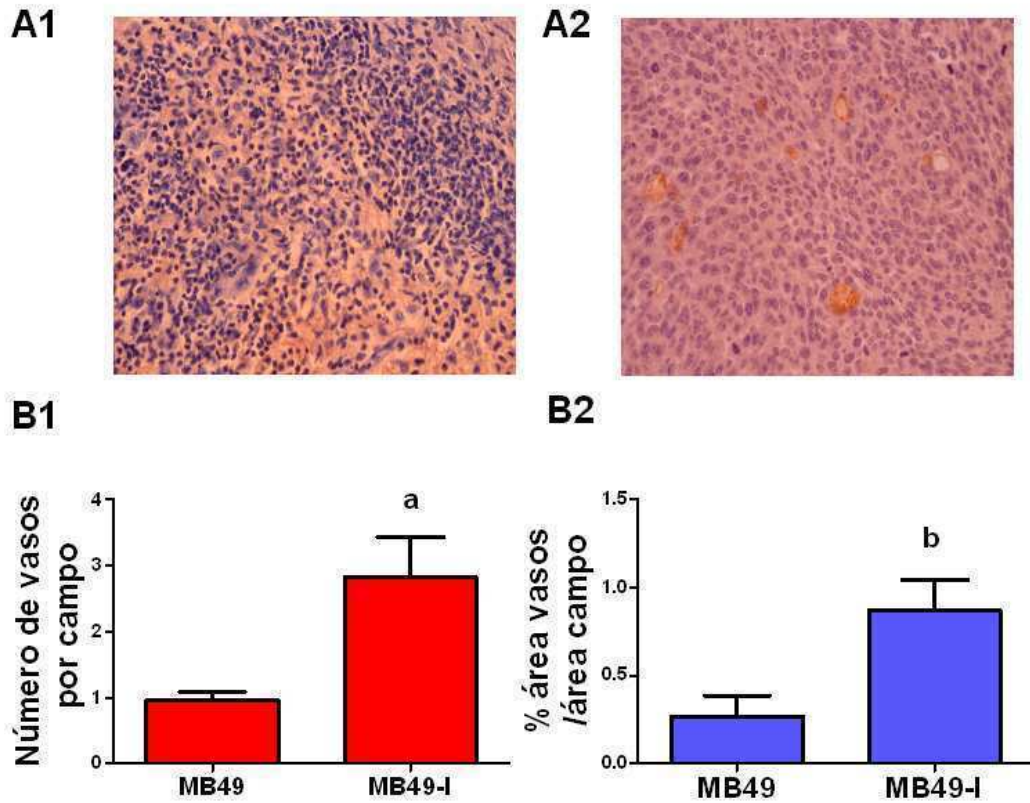


Figura 27: Análisis angiogénico en tumores vesicales: A: Por inmunohistoquímica de la tinción para CD31 se observa que la vejiga inoculada con la línea celular MB49-I (A2) presenta mayor número de vasos sanguíneos comparada con la vejiga que fue inoculada con MB49 (A1). B1: Cuantificación del número de vasos sanguíneos CD31 positivos. B2: Cuantificación del porcentaje del área ocupada por los vasos sanguíneos relativizados por el área total que ocupa el campo fotografiado utilizando el programa Image-Pro Plus 6, para medir el área total ocupada por los vasos sanguíneos se estandarizó a una medida previamente fijada. Por ejemplo $0,17 \text{ mm}^2$ en un campo de 400X. a: $p < 0.01$ y b: $p < 0.001$ vs MB49.

El tumor inoculado con MB49-I presenta mayor expresión y actividad enzimática de CB comparada con los tumores MB49.

Los ratones fueron sacrificados catorce días después de la inoculación ortotópica y las vejigas fueron obtenidas para analizar la expresión y actividad enzimática de Catepsina B. La tinción inmunohistoquímica muestra que la vejiga normal no expresa CB. Se puede observar que tanto la vejiga inoculada con la línea celular MB49 como la inoculada con MB49-I expresan CB en el citoplasma de células epiteliales, en células del corion adyacente siendo la vejiga inoculada con la línea celular MB49-I donde se observa una mayor expresión de CB. La expresión de CB no es evidente en áreas más alejadas al a la zona tumoral. (Fig 28 a).

La actividad enzimática de CB basal en la vejiga normal es de $12,41 \pm 1,20$ UI/ug de proteína, mientras que la actividad de CB fue significativamente incrementada en las vejigas con tumor MB49-I comparada con aquellas inoculadas con MB49. ($33,65 \pm 3,35$ vs $24,10 \pm 2,40$ UI/ug proteína) (Fig 28 b). La actividad de CB en homogenatos de tumor creciendo en el subcutáneo fue también mayor en el caso de los tumores generados por MB49-I comparado con los generados por inoculación de MB49. (MB49: $17,5 \pm 1,9$ MB49-I: $38,2 \pm 3,5$ n=4 UI/ug proteína. Ambas actividades enzimáticas de ya sea, tumores ortotópicos como tumores subcutáneos fueron inhibidas en presencia de el inhibidor específico de CB, el CA-074.

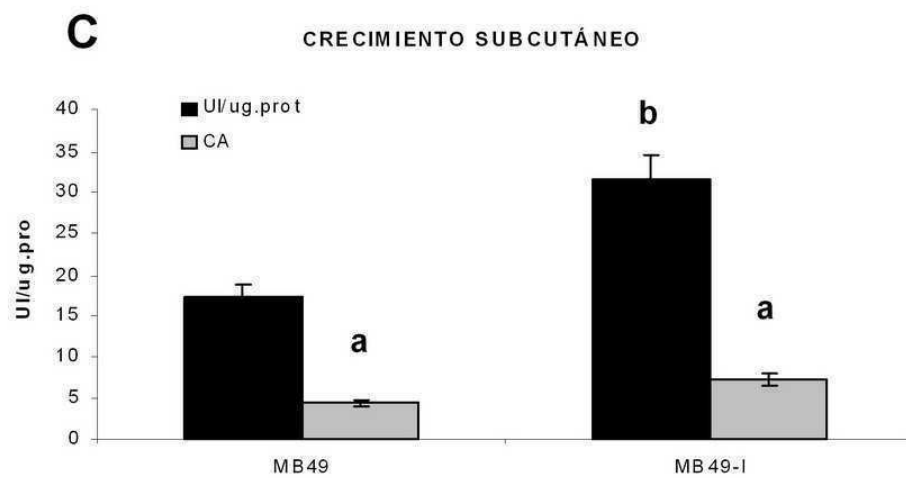
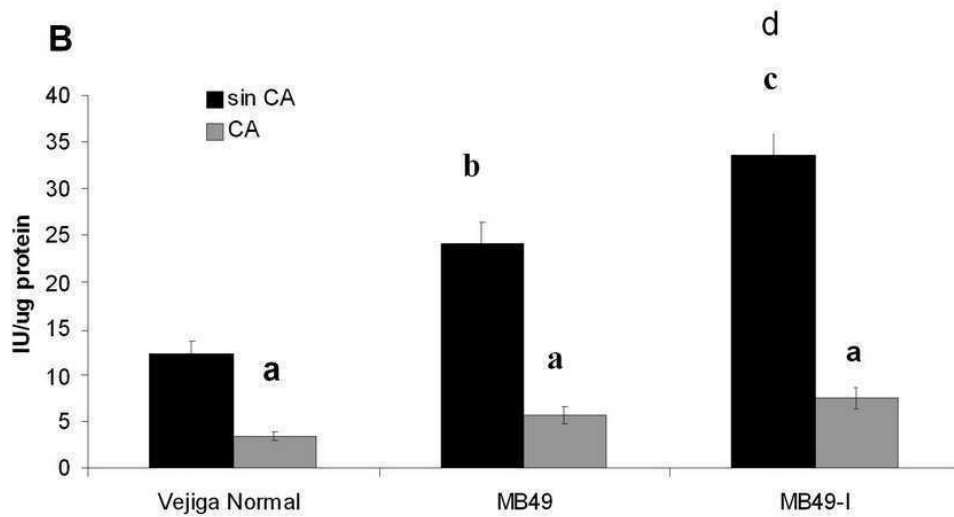
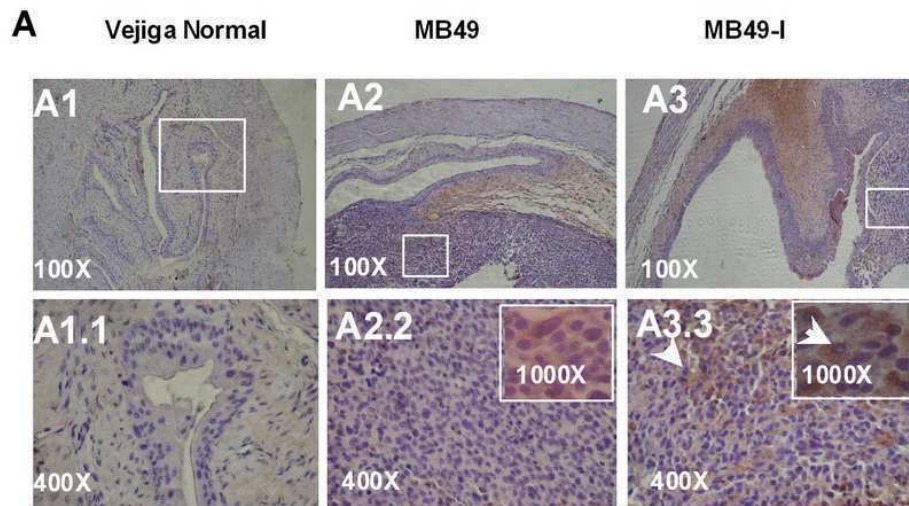


Figura 28. Expresión y actividad de CB en tumores vesicales y subcutáneos:

A: Por inmunohistoquímica se observa que la vejiga normal es negativa para CB (A1). Los tumores inoculados con MB49 y MB49-I muestran áreas de expresión positiva para esta enzima. El corion cercano al tejido tumoral muestra también expresión de CB siendo más intensa la marca en el caso de los tumores MB49-I. (A2, A3). En mayor detalle se observa que la expresión citoplasmática de CB es mayor en el tumor MB49-I comparado con el MB49 (A2.2, A3.3). **B:** La actividad de CB es significativamente mayor en ambos tumores vesicales comparado con la vejiga normal. b y c, $p < 0,001$. Los tumores generados por MB49-I tienen una actividad de CB mayor que los tumores MB49. d, $p < 0,01$. CA (CA074-Me) un inhibidor de la actividad enzimática de CB anula la actividad tisular de dicha enzima. $p < 0,001$ vs sin CA. (Student's *t test*). **C:** Los tumores generados en forma subcutánea por MB49-I tienen una actividad de CB mayor que los tumores MB49. b, $p < 0,01$. CA (CA074-Me) un inhibidor de la actividad enzimática de CB anula la actividad tisular de dicha enzima. a, $p < 0,001$ vs sin CA. Student's *t test*).

PARTE II- Evaluación de la expresión de PPARg en el modelo desarrollado y en pacientes con CaV.

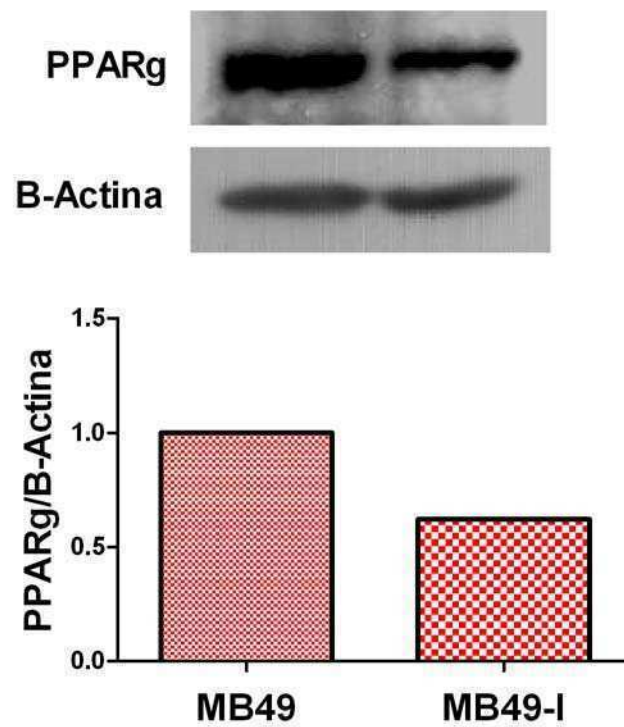
Expresión de PPARg en un modelo ortotópico de cáncer de vejiga murino.

Se ha descrito que la expresión de PPARg en el urotelio normal es uniforme, mientras que en muestras provenientes de carcinomas humanos de bajo grado la expresión era positiva tanto difusa como focalizada y que en carcinomas de alto grado la expresión fue principalmente focalizada o ausente. En el mismo trabajo se demostró que ligandos de PPARg eran capaces de suprimir el crecimiento de células tumorales in vitro, pero al mismo tiempo se observó que líneas celulares de vejiga humana no neoplásicas resultan más resistentes a la inhibición por los ligandos de PPARg comparado con las líneas celulares neoplásicas [125]. Un año más tarde se publicó un trabajo donde se asocia la expresión de PPARg en forma significativa en tumores papilares pero no han encontrado asociación con el estadio o grado histológico. Ellos, en cambio, si observaron que la expresión de PPARg estaba asociada con la baja incidencia de recurrencia y progresión tumoral, indicando que la expresión de PPARg podría ser indicativo de un factor de buen pronóstico o a la inversa que su falta de expresión debería ser considerada como un factor de mal pronóstico [126]. Por otro lado, Yoshimura y col han reportado que no hay una expresión marcada en muestras de vejiga no tumoral y que su expresión fue significativa en tumores vesicales humanos. Además observaron que la expresión de PPARg es mayor en carcinomas de células transicionales de alto grado comparado con los de bajo grado [127]. En este último punto del trabajo hemos analizado la expresión de PPARg en cortes histológicos de vejiga normal y tumoral generados con la línea MB49 y MB49-I, así como también la expresión de dicho receptor en las líneas celulares in vitro.

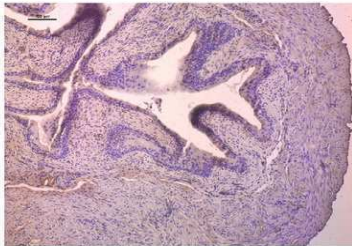
Nuestros resultados muestran que la línea invasora, MB49-I, pierde aproximadamente la mitad de la expresión de PPARg con respecto a la línea parental, MB49 (Fig 29A). Por inmunohistoquímica observamos que, la vejiga normal de ratón es negativa para PPARg mientras que los tumores vesicales superficiales, generados por MB49, presenta una marca intensa de PPARg. En cuanto al tumor con características invasoras generados por MB49-

I, se observa que la expresión de PPARg es de una intensidad menor cuando se la compara con la vejiga con tumor no invasor.

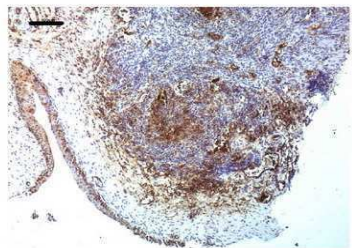
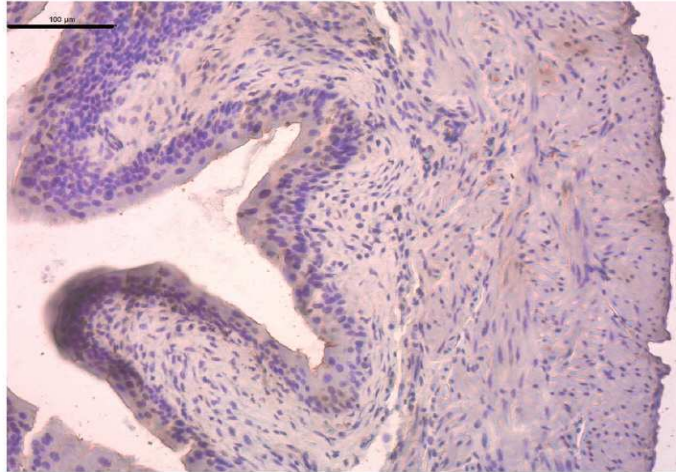
A



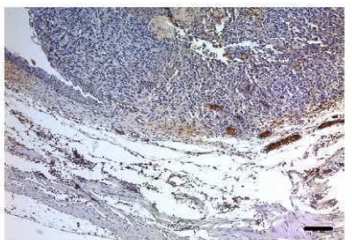
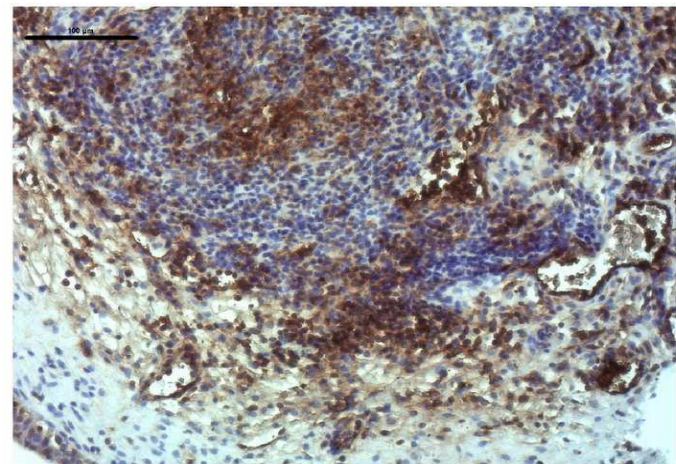
B



vejiga normal



vejiga MB49



vejiga MB49-I

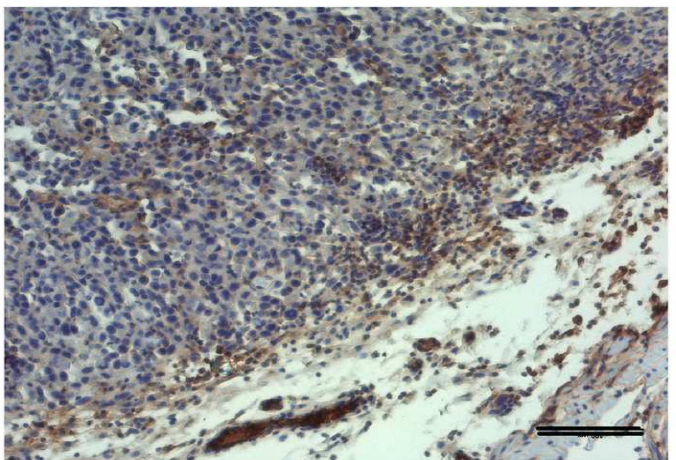


Figura 29. Expresión de PPARg in Vitro e in vivo en el modelo murino ortotópico: A: Por Western Blot se evaluó la expresión de PPARg en ambas líneas celulares. La expresión fue cuantificada y relativizada con respecto a la expresión de B-Actina. B. Por inmunohistoquímica se observa que la vejiga normal es negativa para PPARg. Los tumores inoculados con MB49 muestran áreas de expresión intensa para PPARg. En los tumores inoculados con MB49-I ésta expresión disminuye. La barra corresponde a 100 µm.

Expresión de PPARg en pacientes con CaV

Para entender más acabadamente el rol de PPARg en el CaV, evaluamos su expresión en muestras de carcinoma de vejigas humanas. Para llevar a cabo este análisis, contamos con muestras de 51 pacientes obtenidas del archivo del Área de Patología de nuestro Instituto. Teniendo en cuenta el grado de invasión, 18 presentaban tumores invasores y 33 superficiales (no invasores del músculo). Al mismo tiempo, teniendo en cuenta el grado histológico, 38 fueron clasificados en un grado histológico alto, mientras que 13 presentaban un grado bajo.

Al analizar la expresión de PPARg en muestras provenientes de pacientes con CaV definimos tres niveles de expresión nuclear de dicho receptor, muestras con expresión negativa, con un menor al 10% de expresión de núcleos positivos por campo; muestras con baja expresión, considerando menos del 40% pero mas del 10% de núcleos positivos por campo y muestras con alta expresión, definidos como aquellos con una expresión mayor al 40 % de núcleos positivos.

Si bien no encontramos diferencias significativas en cuanto al número de muestras con alta expresión de PPARg de acuerdo al grado de invasión o histológico, un incremento en el número de muestras que expresan bajos niveles de PPARg fue detectado en tumores invasores y de alto grado histológico comparado con los tumores de bajo superficial (de 27 al 61 %) y grado respectivamente (de 8 a 50 %) (Fig 30 A y B). Es decir que en pacientes con tumores de peor pronóstico hay una mayor proporción de muestras con una baja expresión de PPARg, sugiriendo que la pérdida de la expresión se asocia a la progresión tumoral. La proporción de tumores negativos fue más alta en tumores

superficiales en comparación con los invasores, no habiendo diferencia en los tumores según el grado histológico. En pacientes, esta hipótesis podría evaluarse analizando un mayor número de casos y haciendo una curva de Kaplan-Mayer (sobrevida).

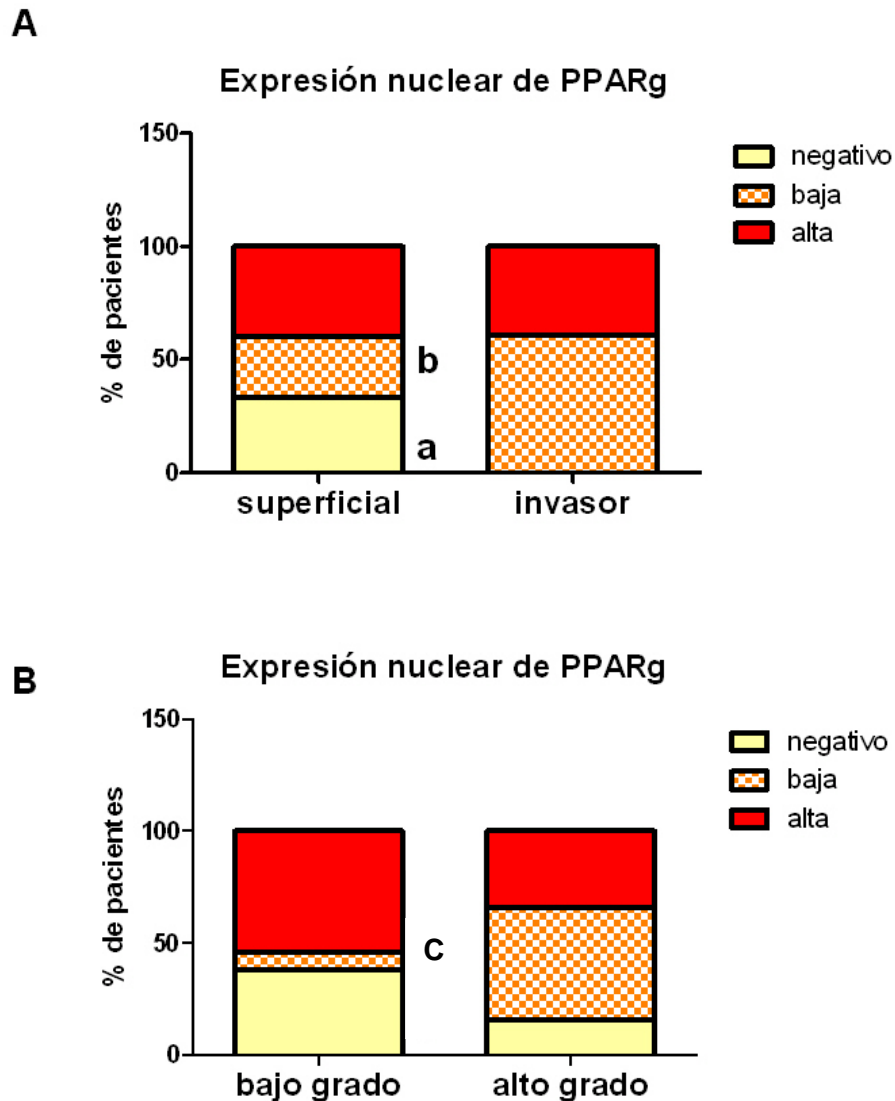


Figura 30. Expresión de PPARg en muestras de pacientes con CaV A: Expresión de PPARg en muestras clasificadas según el grado de invasión (53 pacientes) B. Expresión de PPARg según el grado histológico. En ambos casos los niveles de expresión fueron definidos como negativo (entre 0 y 10 % de núcleos positivos); media (entre 10 y 40 % de núcleos positivos); alta (mayor al 40 %). a: $p=0,0342$,

expresión media de superficial vs invasor; b: $p=0,0046$, expresión negativa de superficial vs invasor; c: $p=0,0083$, baja expresión bajo grado vs alto grado. Test Exacto de Fisher.

Discusión capítulo II

La progresión tumoral se puede entender como una suma de varios pasos secuenciales e independientes que llevan a una célula tumoral hasta su punto cúlmine, la metástasis [128]. Para poder avanzar a través de los diferentes pasos de la progresión maligna, las células tumorales adquieren diferentes alteraciones genéticas y/o epigenéticas cuya aparición puede ser favorecida o inhibida por señales moleculares parácrinas provenientes del microambiente, del estroma y de las diferentes poblaciones celulares que componen los tumores.

Para estudiar la integración de esas señales se requieren de modelos experimentales complejos que puedan emular dichas interacciones, pero la mayoría de los modelos experimentales están compuestos por poblaciones celulares relativamente homogéneas. Esto es útil porque permite estudiar algunos de los mecanismos que ocurren durante la progresión tumoral y/o la metástasis, sin embargo, es una simplificación que no tienen en cuenta que los tumores reales son altamente heterogéneos y que las interacciones entre las distintas subpoblaciones que los componen pueden afectar su comportamiento maligno. El potencial tumorigénico y metastático depende no solo de las células tumorales intrínsecas sino también de otras células que forman parte del microambiente tumoral, y por lo tanto del sitio de inyección [129]. Sin embargo con el objetivo de simplificar la metodología y entender los resultados son frecuentemente usadas líneas celulares puras *in vitro* y/o la inoculación heterotópica de estas en animales. Para focalizar en el concepto de heterogeneidad nosotros desarrollamos en este trabajo una nueva línea celular de cáncer de vejiga murino obtenida luego de 13 trasplantes sucesivos *in vivo* de un tumor originado por inoculación subcutánea de la línea MB49. A través del cultivo primario de este tumor hemos obtenido una nueva línea celular denominada MB49-I para luego analizar sus características biológicas *in vitro* e *in vivo* después de la inoculación ortotópica.

En la actualidad se utilizan cuatro modelos murinos principales de CaV. Estos incluyen modelos xeno o singeneicos, y dentro de éste grupo, los inducidos químicamente y los transgénicos. La implantación ortotópica hace los resultados más reales siendo, dentro de los modelos singeneicos, las líneas MB49 y MBT2 singeneicas de la cepas cepas murina C57-J6 y C3H respectivamente, las más frecuentemente utilizadas. El cáncer de vejiga

inducido en ratas y ratón son utilizados para estudios de quimioprevención. Aunque los agentes utilizados para inducir el cáncer son específicos del urotelio este modelo requiere un prolongado período de tiempo para el desarrollo tumoral, mientras que las ventajas del modelo ortotópico que nosotros usamos en este trabajo son, además del bajo costo y la utilización de un hospedador inmunocompetente, la posibilidad de obtener tumores con parámetros de relevancia clínica en un período de quince días, obteniendo tumores con una baja concentración de células, con alta incidencia y reproducibilidad [129].

Durante la progresión tumoral se ponen de manifiesto diversos mecanismos celulares y moleculares, teniendo algunos de ellos homología con mecanismos que tienen lugar a lo largo del desarrollo embrionario. Uno de estos procesos es la transición epitelio mesenquimática (TEM) durante la cual células de estirpe epitelial adquieren un fenotipo mesenquimático que le confiere capacidad migratoria. En este proceso las células epiteliales pierden marcadores característicos de este linaje, como citoqueratinas y adquieren la expresión de moléculas como vimentina, actina de músculo liso entre otras [114]. Es ampliamente aceptado que ésta plasticidad celular también es un proceso fundamental durante la progresión tumoral [116].

La línea celular MB49 ha sido obtenida a partir de una transformación neoplásica in vitro de cultivos primarios de epitelio de vejiga murina inducida con el carcinógeno 7,12-dimetilbenzotraceno [130]. En este trabajo nosotros mostramos que la línea celular MB49 expresa citoqueratina 18, una proteína marcador de linaje epitelial. Durante la selección de las subpoblaciones celulares del tumor llevada a cabo por el hospedador, no solo la nueva línea celular mostró diversidad morfológica sino que además la expresión de citoqueratina fue disminuyendo mientras la expresión de vimentina aumentó. Estos cambios indicarían que una transformación epitelio mesenquimática ha tenido lugar durante los sucesivos pasajes in vivo, aunque procesos celulares como fusiones entre células no pueden ser descartadas.

Se ha descrito que en tumores animales que se mantienen por trasplantes in vivo (durante alrededor de 200 trasplantes) es posible que se produzca un proceso denominado transformación sarcomatosa. Mediante este proceso los carcinomas se diferencian a tumores con características mesenquimáticas dando origen a la formación de un sarcoma. Para evaluar esta posibilidad estudiamos la expresión de citoqueratinas en los tumores vesicales generados por la línea MB49-I y en las metástasis pulmonares generados por estas. Observamos que el tumor generado por MB49-I aumenta la expresión de vimentina,

detectándose al mismo tiempo la expresión de citoqueratina. Así mismo las metástasis pulmonares generadas por éste tumor son citoqueratina positivas indicando que en nuestro modelo ha ocurrido una transición epitelio mesenquimática. De esta manera las líneas celulares MB49 y MB49-I podrían ser una herramienta para el estudio de mecanismos relacionados con TEM durante la progresión tumoral.

Para conocer similitud genética entre la línea parental y la línea MB49-I realizamos el análisis del cariotipo. Este reveló la presencia de dos subpoblaciones celulares en ambas líneas celulares, una con un número diploide de cromosomas y la otra con una población distribuida en un rango tetraploide de cromosomas. Las metafases mostraron alteraciones cromosómicas derivadas de translocaciones Robertsonianas, un cromosoma submetacéntrico y un pequeño cromosoma metacéntrico que fueron observados en MB49 y también en MB49-I. Estos datos indicarían que MB49-I es una línea celular derivada de MB49 ya que MB49-I comparte las aberraciones cromosómicas con la línea parental.

Las enzimas proteolíticas han ganado un lugar importante en el estudio de los procesos de progresión tumoral, debido a su capacidad de clivar componentes de la matriz extracelular permitiendo a las células tumorales penetrar e infiltrar el tejido estromal subyacente. Las alteraciones en la producción de enzimas proteolíticas se encuentra íntimamente relacionado con la progresión tumoral, el proceso angiogénico y capacidad metastásica [97]. El uPA, la CB y las MMPs son enzimas cuya desregulación está asociada al proceso metastático.

El sistema uPA también juega un rol importante en los procesos de invasión y metástasis tumoral interviniendo en la proteólisis, adhesión y migración de la célula tumoral. [88,131]. Fue descrito que los niveles de uPA plasmáticos son mayores en pacientes con cáncer de vejiga comparado con controles sanos y que en pacientes con CaV, un mayor nivel en plasma de uPA es un factor independiente que predice peor pronóstico después de la cistectomía radical. [132]

Las metaloproteasas son una familia de enzimas asociadas con el fenotipo invasor en varios tipos de tumor. En pacientes con cáncer de vejiga se encuentra incrementado tanto la expresión como la actividad, estando estos parámetros asociados con un peor pronóstico, como mayor invasión y mayor grado histológico. Dinney et al, desarrolló un modelo ortotópico xenogéneo donde caracteriza variantes metastásicas derivados de un carcinoma transicional humano implantado en la vejiga de ratones atímicos. Este modelo xenogéneo reveló características importantes que incluyen incremento en la expresión de

MMP-9, IL-8 y factores proangiogénicos como el (factor de crecimiento de endotelio vascular) VEGF y (receptor del factor de crecimiento epidérmico) EGFR. La expresión incrementada de MMP-9 fue una de las primeras diferencias identificadas en la línea celular metastásica humana 253J B-V comparado con su contraparte no-metastásica y la mucosa normal. Los mismos marcadores en pacientes con CaV han resultado tener correlato con el estadio y la progresión [133].

La CB es una cisteino-proteasa lisosomal que se sintetiza en el retículo endoplásmico rugoso (RER) en forma de pre-procathepsina B para luego ser glicosilada. En la década del noventa se demostró que durante la transformación neoplásica la CB está aumentada y se libera extracelularmente [93]. La CB puede actuar sobre diferentes componentes de la matriz extracelular como las moléculas de colágeno, fibronectina y laminina colaborando en la degradación de la matriz extracelular. También puede activar otras proteasas asociadas a procesos de invasión como el uPA y las MMPs. En esa misma época se demostró que líneas celulares de cáncer de vejiga invaden membranas basales, mediante la secreción de CB [94]. La expresión de CB está también asociada con la invasión tumoral en pacientes con CaV [90]. Nuestro grupo de trabajo demostró que los niveles de expresión de CB en la orina y en plasma de pacientes con carcinoma transicional de vejiga estaba aumentada [134].

La capacidad de predecir progresión a estadios de mayor invasión y/o metástasis es particularmente relevante. El hecho de entender los mecanismos de invasión, metástasis y angiogénesis en cáncer de vejiga permitiría el desarrollo de nuevos agentes blancos que tengan mejor capacidad de inhibir esa vía molecular y así generar beneficios terapéuticos para pacientes con enfermedad avanzada.

Dada la asociación de estas tres enzimas en la progresión en cáncer de vejiga, evaluamos dichas actividades en la nueva línea celular comparándola con la línea celular parental. Nuestros resultados muestran que la actividad de CB, MMP-9 y uPA están incrementadas en la línea celular MB49-I asociada con el incremento de la invasión en matrigel in vitro. En concordancia con estas actividades in vitro, MB49-I fue capaz de desarrollar un mayor número de metástasis pulmonares luego de la inoculación tanto intravenosa como subcutánea comparado con la línea parental MB49.

Por inoculación ortotópica de ambas líneas celulares hemos observado que el peso promedio de la vejiga inoculada con la línea MB49-I fue tres veces mayor que la vejiga inoculada con la línea parental MB49. Además, la inoculación ortotópica de MB49-I fue

capaz de generar tumores invasores mientras que MB49 genera tumores superficiales. Los estudios histopatológicos de los tumores de vejiga indican que MB49 crece solo hasta el corion, y por el contrario los tumores inoculados con MB49-I crecen con mayor carácter invasor invadiendo el tejido muscular. El hecho de que MB49 genere tumores de vejiga superficiales mientras que MB49-I genere tumores invasores mimetiza a los dos grandes grupos en los que se clasifican los tumores humanos.

En el CaV humano el primer sitio de diseminación metastásica es el ganglio linfático regional. En nuestro modelo no hemos podido encontrar por histología convencional metástasis en los ganglios linfáticos. Sin embargo no podemos descartar que las metástasis puedan ser identificadas por técnicas más sensibles.

La manifestación clínica más frecuente en pacientes con CaV es la hematuria, presente en el 80 % de los casos, generalmente es intermitente y puede ser macroscópica o microscópica [13]. En éste modelo una mayor proporción los ratones portadores del tumor ortotópico MB49-I presentaron hematuria cuando se los compara con los generados por MB49. Al mismo tiempo sólo los ratones portadores del tumor MB49-I presentaron metástasis pulmonares, generando así un nuevo modelo ortotópico que mimetiza el cáncer de vejiga superficial e invasor teniendo en cuenta además del grado de invasión, ciertas manifestaciones clínico-patológicas.

La capacidad de producir angiogénesis es fundamental para el desarrollo tumoral, dado que es un modo de proveer de nutrientes y oxígeno al interior de los tumores. Nuestros resultados muestran que la vejiga inoculada con la línea celular MB49-I presenta mayor número de vasos sanguíneos que el tumor generado por la línea MB49. Posiblemente la línea MB49-I presente alteraciones en la expresión y/o secreción de factores proangiogénicos como VEGF o EGF los cuales sumados al hecho de que MB49-I presenta más actividad de enzimas proteolíticas secretadas, resultaría en la activación de las células endoteliales y la concomitante generación de nuevos vasos.

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que tejido proveniente de vejiga normal expresa sólo la isoforma de 29 kDa, mientras que tanto los tumores como la línea celular de cáncer de vejiga humano T24, expresan tanto la isoforma de 33 kDa como las isoformas bicatenarias de 27-29 kDa y que la expresión en pacientes con CaV de las formas activas de CB es mayor en tumores invasores comparado con tumores superficiales, sugiriendo que la progresión tumoral está asociada con cambios cuanti y cualitativos en la expresión de CB [90]. Para evaluar si este modelo tiene un

comportamiento similar al observado en humanos evaluamos la expresión y actividad de CB en tumores generados por las líneas MB49 y MB49-I.

Observamos que mientras que la vejiga normal fue negativa para CB, ambos tumores expresan CB no sólo en las células tumorales sino también en el corion adyacente. Además en los tumores generados por la línea MB49-I se observa mayor expresión citoplasmática de CB comparado con los tumores inoculados con MB49. También la actividad de CB fue significativamente mayor en los tumores invasores que en los superficiales y esta actividad enzimática fue inhibida en presencia de CA-074 un inhibidor específico de CB.

A lo largo del capítulo I hemos evaluado el rol de PPAR γ en la biología del cáncer de vejiga. Estudiamos su modulación bajo tratamiento con BCG, tratamiento establecido para tumores que no invaden el músculo, y el efecto de sus ligandos en modelos in vitro e in vivo. En la literatura, la expresión de PPAR γ como indicador de grado de avance tumoral es controversial. Según Yoshimura et al [127], existe en pacientes, una marcada expresión de PPAR γ en tejidos tumorales de vejiga comparado con el urotelio normal, y que altos niveles en la expresión se correlacionan con un mayor grado y estadio de avance. Por otro lado, Nakashiro et al [125], describen que la expresión de PPAR γ es positiva en el urotelio normal, los carcinomas transicionales muestran una tinción intensa, y que dicha expresión fue ausente en los carcinomas de alto grado. Según los resultados en nuestro modelo murino, la expresión de PPAR γ es negativa en la vejiga normal e intensa en tumores vesicales superficiales, mientras que disminuye en tumores invasores, sugiriendo también que la expresión disminuye con la progresión. Basándonos en el conjunto de los resultados podríamos sugerir que las discrepancias entre los escasos trabajos en pacientes puedan deberse a que en cada trabajo se utilizan distintos niveles de corte y no consideran una expresión intermedia como la que nosotros consideramos.

Es interesante discutir que la expresión de PPAR γ en tumores generados por la línea celular MB49, es variable dependiendo del lugar de inoculación. Los tumores MB49 creciendo en la vejiga presentan marcación más intensa para PPAR γ comparado con los tumores creciendo subcutáneamente. Si bien estas tinciones fueron realizadas en diferentes ocasiones y para una correcta interpretación habría que hacerlo al mismo tiempo, podríamos especular que esta discrepancia pueda deberse al diferente microambiente tumoral generado en ambos casos que impactan sobre el tumor y de ahí la relevancia de la utilización de modelos ortotópicos.

Cuando analizamos la expresión de éste receptor en muestras provenientes de pacientes con CaV, pudimos observar que todas las muestras clasificadas como tumores invasores expresaban PPARg de forma baja o alta, sin embargo observamos una mayor proporción de muestras de pacientes que expresan bajos niveles de dicho receptor. Este resultado también se observó al analizar la expresión según el grado histológico. Si nosotros partimos del concepto de que PPARg es una molécula asociada a la diferenciación, podríamos hipotetizar que la expresión de éste factor en tumores superficiales esté dada, de alguna manera, como respuesta a la malignización tratando así de contrarrestarla. Teniendo en cuenta la variabilidad entre pacientes y considerando que en una línea temporal los tumores superficiales y/o de bajo grado histológico progresarán a invasores y/o de alto grado, podríamos hipotetizar también, que el aumento de la proporción de pacientes con baja expresión de PPARg se de a expensas de la alta expresión en tejido superficial, que luego se pierde, o de la expresión nula que aumentaría como respuesta a la progresión. Para profundizar en esta idea son necesarios ensayos funcionales que tiendan a aclarar la funcionalidad de PPARg en este punto. El modelo que presentamos en éste trabajo sería útil para evaluar los mecanismos relacionados con la pérdida de PPARg durante la progresión tumoral.

Conclusión

A lo largo de éste trabajo, hemos demostrado, por primera vez, que PPARg media el efecto inhibitorio de la proliferación inducido por BCG en células de cáncer de vejiga murinas. In vivo BCG inhibe el crecimiento de tumores en ratones singeneicos por un mecanismo parcialmente dependiente de PPARg, ya que BADGE revierte dicho efecto, sugiriendo que agonistas endógenos podrían activar a PPARg inducido por BCG.

Todos estos resultados nos llevan a postular que parte del mecanismo de acción que BCG lleva a cabo para ejercer su efecto inhibitorio está mediado por PPARg.

Observamos que BCG activa la vía de NF-kB en la línea celular MB49 y que la 15-d-PGJ2 la inhibe. Este resultado podría explicar los efectos PPARg independientes en procesos como la inhibición de la inducción de la proliferación de NO. Es decir que los ligandos de PPARg inhibirían la activación de NF-kB y consecuentemente la producción de NO por mecanismos vía NF-kB y no a través de PPARg.

Con el objeto de chequear la posibilidad de usar a los agonistas de PPARg como una posible terapia en el CaV, evaluamos el efecto de RO in vivo. A diferencia de lo observado in vitro, RO se opone al efecto inhibitorio de BCG.

También describimos por primera vez el efecto de BCG sobre el estroma tumoral, observando que BCG induce la proliferación de fibroblastos y dicho tratamiento genera un aumento en la expresión de moléculas como colágeno I, SMA-alfa Y FGF-2 en concordancia con la inhibición del tamaño tumoral y aparición de tejido cicatrizal. Nuestros resultados muestran que RO inhibe la capacidad fagocítica en los macrófagos y varios pasos del proceso de reparación tisular, como proliferación de fibroblastos y depósito de colágeno. Por lo tanto, aunque PPARg este implicado en la inhibición de crecimiento tumoral, nuestros resultados sugieren que la administración exógena de un ligando del receptor sería contraproducente en pacientes con CaV bajo tratamiento con BCG.

Los modelos animales que imiten el comportamiento observado en pacientes son escasos. En este trabajo nosotros describimos una nueva línea celular de cáncer de vejiga, denominada MB49-I, desarrollada por sucesivos pasajes in vivo partiendo de un tumor primario obtenido por inoculación de la línea celular de cáncer vejiga MB49. La línea celular MB49-I tiene incrementado la actividad de enzimas proteolíticas como MMP-9,

uPA y CB. Además la inoculación ortotópica de las células MB49 y MB49-I genera tumores superficiales e invasores respectivamente, homologando a la patología humana. El tumor ortotópico MB49-I expresa y presenta mayor actividad de CB que el tumor generado por MB49, similar también a lo observado en pacientes. El tumor invasor presenta disminución en la expresión de CK y aumento de VM compatible con una transición epitelio mesenquimática proporcionando un modelo útil para el abordaje de éste mecanismo en la progresión del Cáncer de Vejiga.

El modelo sería útil para el estudio de diferentes moléculas y/o mecanismos implicados en la progresión del Cáncer de Vejiga como así también utilizarlo como un modelo de validación preclínica para el estudio de nuevas modalidades terapéuticas. Utilizando este modelo observamos que tanto la línea MB49-I como el tumor ortotópico generado por esta pierden la expresión de PPARg en concordancia con un mayor grado de indiferenciación, sugiriendo la importancia de este factor en la progresión tumoral.

En pacientes, se encontró un mayor número de muestras correspondientes a tumores invasores y de alto grado histológico con una baja expresión de PPARg sugiriendo que la pérdida de su expresión estaría asociada con un peor pronóstico.

Bibliografía

1. Yamaguchi Y, Hayashi S (2009) Estrogen-related cancer microenvironment of breast carcinoma. *Endocr J* 56: 1-7.
2. Porta C, Larghi P, Rimoldi M, Totaro MG, Allavena P, et al. (2009) Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology* 214: 761-777.
3. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M (2001) Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 51: 15-36.
4. de Braud F, Maffezzini M, Vitale V, Bruzzi P, Gatta G, et al. (2002) Bladder cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 41: 89-106.
5. Elena Mattos DIL, Nicolás Zengarini (2003) Atlas de Mortalidad por cáncer en Argentina 1997-2001.
6. Jung I, Messing E (2000) Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression. *Cancer Control* 7: 325-334.
7. Loria D (2006) Atlas de tendencia por cáncer Argentina 1980-2001. www.ASARCOrgar.
8. Silverman DT, Hartge P, Morrison AS, Devesa SS (1992) Epidemiology of bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 6: 1-30.
9. Lucas SB (1982) Squamous cell carcinoma of the bladder and schistosomiasis. *East Afr Med J* 59: 345-351.
10. Badawi AF (1996) Molecular and genetic events in schistosomiasis-associated human bladder cancer: role of oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Lett* 105: 123-138.
11. Stonehill WH, Dmochowski RR, Patterson AL, Cox CE (1996) Risk factors for bladder tumors in spinal cord injury patients. *J Urol* 155: 1248-1250.
12. Tamir S, Tannenbaum SR (1996) The role of nitric oxide (NO.) in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* 1288: F31-36.
13. Lamm DL, Torti FM (1996) Bladder cancer, 1996. *CA Cancer J Clin* 46: 93-112.
14. Casabé A (2008) Pautas en Oncología. Diagnóstico, tratamiento y seguimiento del cáncer. Instituto de Oncología Ángel H Roffo Universidad de Buenos Aires Editores: B. Roth, R. Kirchuk, C. García Salas.
15. Griffiths TR, Mellon JK (2004) Evolving immunotherapeutic strategies in bladder and renal cancer. *Postgrad Med J* 80: 320-327.
16. Sauter G AE, Amin MB, Busch C Cheville J, Passer T et al (2004) Noninvasive urothelial neoplasias; WHO classification of noninvasive papillary urothelial tumors. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the urinary system and male genital organs. Lyon, IARCC 2004.
17. MacLennan GT, Kirkali Z, Cheng L (2007) Histologic grading of noninvasive papillary urothelial neoplasms. *Eur Urol* 51: 889-897; discussion 897-888.
18. Mansure JJ, Nassim R, Kassouf W (2009) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bladder cancer: a promising therapeutic target. *Cancer Biol Ther* 8: 6-15.
19. Gerhold DL, Liu F, Jiang G, Li Z, Xu J, et al. (2002) Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Endocrinology* 143: 2106-2118.
20. Ricote M, Glass CK (2007) PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta* 1771: 926-935.
21. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP (2002) Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 23: 144-150.

22. Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro CM, Torocsik D, D'Avila H, et al. (2009) *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J Immunol* 183: 1337-1345.
23. Natarajan C, Bright JJ (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists inhibit experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 production, IL-12 signaling and Th1 differentiation. *Genes Immun* 3: 59-70.
24. Gosset P, Charbonnier AS, Delerive P, Fontaine J, Staels B, et al. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 31: 2857-2865.
25. Nencioni A, Grunebach F, Zobywlaski A, Denzlinger C, Brugger W, et al. (2002) Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol* 169: 1228-1235.
26. Lawrence T, Fong C The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 519-523.
27. Orłowski RZ, Baldwin AS, Jr. (2002) NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 8: 385-389.
28. Hagemann T, Lawrence T, McNeish I, Charles KA, Kulbe H, et al. (2008) "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. *J Exp Med* 205: 1261-1268.
29. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391: 79-82.
30. Lee SY, Hur GY, Jung KH, Jung HC, Kim JH, et al. (2006) PPAR-gamma agonist increase gefitinib's antitumor activity through PTEN expression. *Lung Cancer* 51: 297-301.
31. Han S, Sidell N, Fisher PB, Roman J (2004) Up-regulation of p21 gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human lung carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 10: 1911-1919.
32. Morrison RF, Farmer SR (1999) Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. *J Biol Chem* 274: 17088-17097.
33. Koga H, Sakisaka S, Harada M, Takagi T, Hanada S, et al. (2001) Involvement of p21(WAF1/Cip1), p27(Kip1), and p18(INK4c) in troglitazone-induced cell-cycle arrest in human hepatoma cell lines. *Hepatology* 33: 1087-1097.
34. Elnemr A, Ohta T, Iwata K, Ninomia I, Fushida S, et al. (2000) PPARgamma ligand (thiazolidinedione) induces growth arrest and differentiation markers of human pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 17: 1157-1164.
35. Okano H, Shiraki K, Inoue H, Yamanaka T, Deguchi M, et al. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma augments tumor necrosis factor family-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Drugs* 13: 59-65.
36. Lubet RA, Fischer SM, Steele VE, Juliana MM, Desmond R, et al. (2008) Rosiglitazone, a PPAR gamma agonist: potent promoter of hydroxybutyl(butyl)nitrosamine-induced urinary bladder cancers. *Int J Cancer* 123: 2254-2259.
37. Michalik L, Wahli W (2006) Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. *J Clin Invest* 116: 598-606.

38. Burgess HA, Daugherty LE, Thatcher TH, Lakatos HF, Ray DM, et al. (2005) PPARgamma agonists inhibit TGF-beta induced pulmonary myofibroblast differentiation and collagen production: implications for therapy of lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L1146-1153.
39. Genovese T, Cuzzocrea S, Di Paola R, Mazzon E, Mastruzzo C, et al. (2005) Effect of rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 on bleomycin-induced lung injury. *Eur Respir J* 25: 225-234.
40. Panchapakesan U, Sumual S, Pollock CA, Chen X (2005) PPARgamma agonists exert antifibrotic effects in renal tubular cells exposed to high glucose. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F1153-1158.
41. Xu J, Xu X, Verstraete W (2000) Adaptation of E. coli cell method for micro-scale nitrate measurement with the Griess reaction in culture media. *J Microbiol Methods* 41: 23-33.
42. Cristina C, Diaz-Torga G, Gongora A, Guida MC, Perez-Millan MI, et al. (2007) Fibroblast growth factor-2 in hyperplastic pituitaries of D2R knockout female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1341-1351.
43. Seabright M (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971-972.
44. Richie JP (1992) Surgery for invasive bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 6: 129-145.
45. Morales A, Eidinger D, Bruce AW (1976) Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 116: 180-183.
46. Akaza H, Hinotsu S, Aso Y, Kakizoe T, Koiso K (1995) Bacillus Calmette-Guerin treatment of existing papillary bladder cancer and carcinoma in situ of the bladder. Four-year results. The Bladder Cancer BCG Study Group. *Cancer* 75: 552-559.
47. Bohle A, Bock PR (2004) Intravesical bacille Calmette-Guerin versus mitomycin C in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology* 63: 682-686; discussion 686-687.
48. Kuroda K, Brown EJ, Telle WB, Russell DG, Ratliff TL (1993) Characterization of the internalization of bacillus Calmette-Guerin by human bladder tumor cells. *J Clin Invest* 91: 69-76.
49. Mitropoulos DN (2005) Novel insights into the mechanism of action of intravesical immunomodulators. *In Vivo* 19: 611-621.
50. Atkins H, Davies BR, Kirby JA, Kelly JD (2003) Polarisation of a T-helper cell immune response by activation of dendritic cells with CpG-containing oligonucleotides: a potential therapeutic regime for bladder cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 89: 2312-2319.
51. Bevers RF, Kurth KH, Schamhart DH (2004) Role of urothelial cells in BCG immunotherapy for superficial bladder cancer. *Br J Cancer* 91: 607-612.
52. Shintani Y, Sawada Y, Inagaki T, Kohjimoto Y, Uekado Y, et al. (2007) Intravesical instillation therapy with bacillus Calmette-Guerin for superficial bladder cancer: study of the mechanism of bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *Int J Urol* 14: 140-146.
53. Sandes E, Lodillinsky C, Cwirenbaum R, Arguelles C, Casabe A, et al. (2007) Cathepsin B is involved in the apoptosis intrinsic pathway induced by Bacillus Calmette-Guerin in transitional cancer cell lines. *Int J Mol Med* 20: 823-828.
54. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, et al. (2008) Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 18: 349-355.

55. DiPietro LA (1995) Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock* 4: 233-240.
56. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953-964.
57. Pawelec G (2004) Tumour escape: antitumour effectors too much of a good thing? *Cancer Immunol Immunother* 53: 262-274.
58. Knowles RG, Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298 (Pt 2): 249-258.
59. Alvarez V, Lodillinsky C, Umerz S, Sandes E, Eijan AM (2005) Inhibition of bacillus Calmette-Guerin-induced nitric oxide in bladder tumor cells may improve BCG treatment. *Int J Mol Med* 16: 565-571.
60. Morcos E, Jansson OT, Adolfsson J, Ehren I, Wiklund NP (2001) Bacillus Calmette-Guerin induces long-term local formation of nitric oxide in the bladder via the induction of nitric oxide synthase activity in urothelial cells. *J Urol* 165: 678-682.
61. Sandes EO, Faletti AG, Riveros MD, Vidal Mdel C, Gimenez L, et al. (2005) Expression of inducible nitric oxide synthase in tumoral and non-tumoral epithelia from bladder cancer patients. *Nitric Oxide* 12: 39-45.
62. Mitropoulos D, Petsis D, Kyroudi-Voulgari A, Kouloukoussa M, Zervas A, et al. (2005) The effect of intravesical Bacillus Calmette-Guerin instillations on the expression of inducible nitric oxide synthase in humans. *Nitric Oxide* 13: 36-41.
63. Liotta LA, Kohn EC (2001) The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411: 375-379.
64. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432: 332-337.
65. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 349-363.
66. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, et al. (2002) Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12877-12882.
67. Castor CW, Heiss PR, Gray RH, Seidman JC (1979) Connective tissue formation by lung fibroblasts in vitro. *Am Rev Respir Dis* 120: 107-119.
68. Singer AJ, Clark RA (1999) Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341: 738-746.
69. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M (2008) Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 16: 585-601.
70. Lamm DL, van der Meijden AP, Akaza H, Brendler C, Hedlund PO, et al. (1995) Intravesical chemotherapy and immunotherapy: how do we assess their effectiveness and what are their limitations and uses? *Int J Urol* 2 Suppl 2: 23-35.
71. Chen F, Zhang G, Iwamoto Y, See WA (2005) BCG directly induces cell cycle arrest in human transitional carcinoma cell lines as a consequence of integrin cross-linking. *BMC Urol* 5: 8.
72. Coleman AB, Metz MZ, Donohue CA, Schwarz RE, Kane SE (2002) Chemosensitization by fibroblast growth factor-2 is not dependent upon proliferation, S-phase accumulation, or p53 status. *Biochem Pharmacol* 64: 1111-1123.
73. Shelley MD, Mason MD, Kynaston H Intravesical therapy for superficial bladder cancer: A systematic review of randomised trials and meta-analyses. *Cancer Treat Rev*.

74. Slomiany BL, Slomiany A (2002) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase during oral mucosal ulcer healing. *J Physiol Pharmacol* 53: 159-169.
75. Yoshida K, Tanabe K, Fujii D, Oue N, Yasui W, et al. (2003) Induction mechanism of apoptosis by troglitazone through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in gastric carcinoma cells. *Anticancer Res* 23: 267-273.
76. Bansal K, Narayana Y, Patil SA, Balaji KN (2009) *M. bovis* BCG induced expression of COX-2 involves nitric oxide-dependent and -independent signaling pathways. *J Leukoc Biol* 85: 804-816.
77. Chen F, Zhang G, Iwamoto Y, See WA (2003) *Bacillus Calmette-Guerin* initiates intracellular signaling in a transitional carcinoma cell line by cross-linking alpha 5 beta 1 integrin. *J Urol* 170: 605-610.
78. Ogawa S, Lozach J, Benner C, Pascual G, Tangirala RK, et al. (2005) Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* 122: 707-721.
79. Turner N, Grose R Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 10: 116-129.
80. Galli A, Crabb DW, Ceni E, Salzano R, Mello T, et al. (2002) Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro. *Gastroenterology* 122: 1924-1940.
81. Yayon A, Klagsbrun M (1990) Autocrine regulation of cell growth and transformation by basic fibroblast growth factor. *Cancer Metastasis Rev* 9: 191-202.
82. Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315: 1650-1659.
83. Szpaderska AM, Frankfater A (2001) An intracellular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer. *Cancer Res* 61: 3493-3500.
84. Netzel-Arnett S, Hooper JD, Szabo R, Madison EL, Quigley JP, et al. (2003) Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 22: 237-258.
85. Schirmacher V (1985) Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts, and impacts for treatment strategies. *Adv Cancer Res* 43: 1-73.
86. Steeg PS (2003) Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 3: 55-63.
87. Skrzydlewska E, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S (2005) Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 11: 1251-1266.
88. Di Carlo A, Terracciano D, Mariano A, Macchia V (2006) Urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) in human bladder tumors. *Oncol Rep* 15: 1321-1326.
89. Bhuvaramurthy V, Schroeder J, Denkert C, Kristiansen G, Schnorr D, et al. (2004) In situ gene expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in transitional cell carcinoma of the human bladder. *Oncol Rep* 12: 909-913.
90. Eijan AM, Sandes EO, Riveros MD, Thompson S, Pasik L, et al. (2003) High expression of cathepsin B in transitional bladder carcinoma correlates with tumor invasion. *Cancer* 98: 262-268.
91. Mort JS, Buttle DJ (1997) Cathepsin B. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 715-720.
92. Roshy S, Sloane BF, Moin K (2003) Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Cancer Metastasis Rev* 22: 271-286.

93. Sloane BF, Moin K, Krepela E, Rozhin J (1990) Cathepsin B and its endogenous inhibitors: the role in tumor malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 9: 333-352.
94. Weiss RE, Liu BC, Ahlering T, Dubeau L, Droller MJ (1990) Mechanisms of human bladder tumor invasion: role of protease cathepsin B. *J Urol* 144: 798-804.
95. Yan S, Sloane BF (2003) Molecular regulation of human cathepsin B: implication in pathologies. *Biol Chem* 384: 845-854.
96. van Kempen LC, Rhee JS, Dehne K, Lee J, Edwards DR, et al. (2002) Epithelial carcinogenesis: dynamic interplay between neoplastic cells and their microenvironment. *Differentiation* 70: 610-623.
97. DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, et al. (2004) Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am J Pathol* 164: 1131-1139.
98. Tang Y, Kesavan P, Nakada MT, Yan L (2004) Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN. *Mol Cancer Res* 2: 73-80.
99. Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, et al. (1999) Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 13: 1382-1397.
100. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z (2000) MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103: 481-490.
101. Di Nezza LA, Misajon A, Zhang J, Jobling T, Quinn MA, et al. (2002) Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion. *Cancer* 94: 1466-1475.
102. Martens JW, Sieuwerts AM, Bolt-deVries J, Bosma PT, Swiggers SJ, et al. (2003) Aging of stromal-derived human breast fibroblasts might contribute to breast cancer progression. *Thromb Haemost* 89: 393-404.
103. Sylven B, Malmgren H (1957) The histological distribution of proteinase and peptidase activity in solid tumor transplants; a histochemical study on the enzymic characteristics of the different tumor cell types. *Acta Radiol Suppl*: 1-124.
104. Podgorski I, Sloane BF (2003) Cathepsin B and its role(s) in cancer progression. *Biochem Soc Symp*: 263-276.
105. Fernandez PL, Hernandez L, Farre X, Campo E, Cardesa A (2002) Alterations of cell cycle-regulatory genes in prostate cancer. *Pathobiology* 70: 1-10.
106. Hughes SJ, Glover TW, Zhu XX, Kuick R, Thoraval D, et al. (1998) A novel amplicon at 8p22-23 results in overexpression of cathepsin B in esophageal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12410-12415.
107. Campo E, Munoz J, Miquel R, Palacin A, Cardesa A, et al. (1994) Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival. *Am J Pathol* 145: 301-309.
108. McKerrow JH, Bhargava V, Hansell E, Huling S, Kuwahara T, et al. (2000) A functional proteomics screen of proteases in colorectal carcinoma. *Mol Med* 6: 450-460.
109. Sinha AA, Gleason DF, Deleon OF, Wilson MJ, Sloane BF (1993) Localization of a biotinylated cathepsin B oligonucleotide probe in human prostate including invasive cells and invasive edges by in situ hybridization. *Anat Rec* 235: 233-240.

110. Bertolesi GE, Farias EF, Alonso DF, Bal de Kier Joffe E, Lauria de Cidre S, et al. (1997) Insight into the profibrinolytic activity of heparin: effects on the activation of plasminogen mediated by urokinase. *Blood Coagul Fibrinolysis* 8: 403-410.
111. Carmeliet P (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9: 653-660.
112. Malonne H, Langer I, Kiss R, Atassi G (1999) Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutic implications: angiogenesis inhibitors. *Clin Exp Metastasis* 17: 1-14.
113. Hori A, Sasada R, Matsutani E, Naito K, Sakura Y, et al. (1991) Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res* 51: 6180-6184.
114. Duband JL, Monier F, Delannet M, Newgreen D (1995) Epithelium-mesenchyme transition during neural crest development. *Acta Anat (Basel)* 154: 63-78.
115. Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, et al. (2006) Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res* 66: 11271-11278.
116. Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2: 442-454.
117. Hay ED (2005) The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* 233: 706-720.
118. Vincent-Salomon A, Thiery JP (2003) Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development. *Breast Cancer Res* 5: 101-106.
119. Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, Hungermann D, Wulfing P, et al. (2005) The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J Pathol* 206: 451-457.
120. Black PC, Dinney CP (2007) Bladder cancer angiogenesis and metastasis--translation from murine model to clinical trial. *Cancer Metastasis Rev* 26: 623-634.
121. Zhang ZT, Pak J, Huang HY, Shapiro E, Sun TT, et al. (2001) Role of Ha-ras activation in superficial papillary pathway of urothelial tumor formation. *Oncogene* 20: 1973-1980.
122. Mills KD, Ferguson DO, Alt FW (2003) The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. *Immunol Rev* 194: 77-95.
123. Callahan R (1996) MMTV-induced mutations in mouse mammary tumors: their potential relevance to human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 39: 33-44.
124. Sen S (2000) Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol* 12: 82-88.
125. Nakashiro KI, Hayashi Y, Kita A, Tamatani T, Chlenski A, et al. (2001) Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its ligands in non-neoplastic and neoplastic human urothelial cells. *Am J Pathol* 159: 591-597.
126. Possati L, Rocchetti R, Talevi S, Beatrice V, Margiotta C, et al. (2000) The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bladder cancer in relation to angiogenesis and progression. *Gen Pharmacol* 35: 269-275.
127. Yoshimura R, Matsuyama M, Segawa Y, Hase T, Mitsuhashi M, et al. (2003) Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human urinary bladder carcinoma and growth inhibition by its agonists. *Int J Cancer* 104: 597-602.
128. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

129. Black PC, Brown GA, Dinney CP (2007) Clinical and therapeutic significance of aberrant differentiation patterns in bladder cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 7: 1015-1026.
130. Summerhayes IC, Franks LM (1979) Effects of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder epithelium in vitro. *J Natl Cancer Inst* 62: 1017-1023.
131. Eissa S, Swellam M, el-Mosallamy H, Mourad MS, Hamdy N, et al. (2003) Diagnostic value of urinary molecular markers in bladder cancer. *Anticancer Res* 23: 4347-4355.
132. Shariat SF, Monoski MA, Andrews B, Wheeler TM, Lerner SP, et al. (2003) Association of plasma urokinase-type plasminogen activator and its receptor with clinical outcome in patients undergoing radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 61: 1053-1058.
133. Dinney CP, Fishbeck R, Singh RK, Eve B, Pathak S, et al. (1995) Isolation and characterization of metastatic variants from human transitional cell carcinoma passaged by orthotopic implantation in athymic nude mice. *J Urol* 154: 1532-1538.
134. Eijan AM, Sandes E, Puricelli L, Bal De Kier Joffe E, Casabe AR (2000) Cathepsin B levels in urine from bladder cancer patients. *Oncol Rep* 7: 1395-1399.