

Tesis Doctoral

Rol del óxido nítrico en la progresión del cáncer de vejiga

Belgorosky, Denise

2016-03-18

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:

Belgorosky, Denise. (2016-03-18). Rol del óxido nítrico en la progresión del cáncer de vejiga. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Belgorosky, Denise. "Rol del óxido nítrico en la progresión del cáncer de vejiga". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-18.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

***Rol del óxido nítrico en la progresión del cáncer
de vejiga***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área: **QUÍMICA BIOLÓGICA**

Denise Belgorosky

Director de Tesis: Dra. Ana María Eiján

Consejero de Estudios: Dra. Elba Susana Vázquez

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Inmunobiología, Área de Investigación

Instituto de Oncología Ángel H. Roffo

Buenos Aires, 2016

Fecha de defensa: 18 de marzo de 2016

RESUMEN

Rol del óxido nítrico en la progresión del cáncer de vejiga

El óxido nítrico (NO) es un radical libre altamente reactivo, que puede actuar como mensajero intracelular e influir en el desarrollo tumoral. Resultados de nuestro grupo de investigación indican que la expresión de la enzima óxido nítrico (NO) sintasa inducible (iNOS) en tumores vesicales humanos es un factor de mal pronóstico que se asocia con recurrencias más tempranas y con un mayor grado histológico.

Teniendo en cuenta que iNOS no se expresa en el urotelio vesical de individuos sanos, y que es una entidad clave del proceso inflamatorio, característico del cáncer de vejiga (CaV), surgió la hipótesis de que la inhibición de esta enzima puede ser un blanco terapéutico para pacientes cuyos tumores expresen iNOS.

Para analizar esta hipótesis comenzamos estudiando el rol del NO como consecuencia de la expresión de iNOS, en la progresión del CaV. Para ello utilizamos un modelo murino de CaV que imita muy bien la patología en humanos. Cuando las líneas celulares MB49 y MB49-I son inoculadas en la vejiga de ratones singéneos generan tumores no invasores del músculo (NMI) y tumores invasores del músculo detrusor (MI), respectivamente. La línea invasora MB49-I, expresa altos niveles de iNOS, y en consecuencia mayores niveles de NO, comparado con la línea MB49. Asimismo, posee incrementados varios pasos del proceso de invasión y metástasis como es su capacidad de migración e invasión, la actividad de enzimas proteolíticas, y la capacidad de generar metástasis pulmonares.

Detectamos que el NO es un factor de supervivencia para células de CaV, que expresan iNOS y que al inhibirlo, se reduce la activación de vías de proliferación como la vía de las MAPK, y parámetros de progresión tumoral como la producción de enzimas proteolíticas, migración, angiogénesis y el crecimiento metastático en pulmón.

Analizamos, por otra parte las consecuencias de la inhibición de iNOS en el crecimiento tumoral empleando tres estrategias. La primera fue evaluar la actividad de L-NAME (inhibidor farmacológico pan NOS) de manera sistémica en ratones portadores de tumores de vejiga creciendo en el subcutáneo o en la vejiga de ratones singéneos. La segunda, fue también una inhibición farmacológica, utilizando el inhibidor específico de iNOS 1400w, en forma local, y la tercera aproximación involucró el silenciamiento

genético de la enzima iNOS en la línea invasora. Las tres estrategias mostraron resultados similares demostrando que tanto L-NAME sistémico, como 1400w local y la ablación genética reducen significativamente el crecimiento tumoral de células que expresan iNOS.

Asimismo, hemos demostrado que los niveles urinarios de NO, determinados como nitrito, son un marcador de seguimiento en tumores de vejiga, y que la disminución de dichos niveles está asociado a una respuesta a tratamiento.

Es así que proponemos que la inhibición de la actividad iNOS sería una terapia promisoría para pacientes cuyos tumores expresen la enzima.

Palabras claves: óxido nítrico, cáncer de vejiga, iNOS

ABSTRACT

Role of nitric oxide in the progression of bladder cancer

Nitric oxide (NO) is a highly reactive free radical, which may act as an intracellular messenger and influence tumor development. Results of our research group indicate that the nitric oxide (NO) production through inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression is a poor prognostic factor associated to earlier recurrences and progression in patients with bladder cancer (Bca).

Since iNOS it is not express in bladder urothelium of healthy individuals, and it is a key on inflammatory processes, -characteristic of Bca-, we hypothesize that the inhibition of this enzyme may be a therapeutic target for Bca patients whose tumors express iNOS.

To test this hypothesis we began studying the role of NO produced by iNOS, in Bca progression. We used a murine Bca model that mimics well the pathology in humans. When Bca cell lines MB49 and MB49-I were inoculated in bladders of syngeneic mice, non-muscle invasive tumors (NMI) and invasive muscle tumors (MI), respectively, were generated. Invasive MB49-I cell line expressed high levels of iNOS and therefore higher levels of NO, compared with MB49. Several properties involved in metastases and invasion such as the activity of proteolytic enzymes, migration ability and angiogenesis were higher in the invasive line.

We detected that NO is a survival factor for Bca cells that express iNOS, and that inhibition of NO, reduced proliferation pathways, such as MAPK and parameters involved in tumor progression, like the activity of metalloproteinase, migration, angiogenesis and metastases development.

We also analyze the consequences of iNOS inhibition in tumor growth, using three different strategies. The first one was administered systemically, L-NAME (pan NOS pharmacological inhibitor). The second one consisted on using 1400w (specific pharmacological iNOS inhibitor) directly on the bladder, and the third approach involved iNOS gene silencing in the invasive line. The three strategies showed similar results, demonstrating that systemically L-NAME, intravesical 1400w and iNOS genetic ablation, significantly reduced tumor growth of Bca cells.

Several substances have been described as markers to monitor or predict patients with Bca, but none of them has proved to be useful enough. We have shown urinary levels of NO determined as nitrite, are a marker for monitoring bladder tumors and their reduction is associated with response to treatment.

In conclusion, we propose iNOS inhibition as a promising therapy for Bca patients whose tumors express the enzyme.

Keywords: nitric oxide, bladder cancer, iNOS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi Directora, Ana, quien me guio a lo largo de estos años para poder llevar a cabo esta tesis. Gracias por permitirme hace ya muchos años, ser parte de este hermoso grupo de trabajo, por confiar en mí, por tu generosidad para enseñarme, por tu paciencia, por tus consejos, por permitirme crecer, equivocarme y estar siempre presente para ayudarme y guiarme. Sos para mí un gran ejemplo como científica! Gracias por transmitirme tu tenacidad y perseverancia en todo lo que haces, pero por sobre todo, gracias por tu calidad humana y por ser una persona de gran corazón!

En segundo lugar quiero agradecer al Instituto Roffo y a todos los integrantes del Área de Investigación, que me han acompañado a lo largo de este lindo proceso. Gracias a Sil, Ali, Gaby, Anto y Mirta por estar siempre predispuestas a ayudarme y por la dedicación con la que hacen todo para que a ninguno nos falta nada para trabajar! Gracias Leo por los ricos mates y lindas charlas mañaneras al llegar al labo! Gracias por darme una mano y una oreja, siempre!! Gracias Dari, por tu buena onda cotidiana y por ayudarme también en todo!

Gracias a Elisa, por sus consejos y por transmitirnos su amor a la ciencia, gracias a todos los investigadores de Biología Celular, a todo UTG, por recibirme siempre con una sonrisa y con algún que otro mate cada vez que iba a pedirles algo! Gracias a todos los chicos de becariato por ayudarme siempre que lo necesite, y por ser compañeros en este largo camino de tesis, gracias a toda la gente de bioterio por su ayuda constante, porque allí pasé muchas horas a lo largo de estos años! Gracias a Martin, por ser mi salvador, y rescatarme en todos mis problemas tecnológicos! No sé qué hubiese sido de mi tesis si no me hubieras salvado la compu! Gracias a Lucas, mi “zeide” adoptivo, por sus ocurrencias, sabiduría y por hacernos los almuerzos entretenidos con sus historias y con los entretelones de la ciencia! Gracias Andre por ayudarme en lo que necesite y por las lindas charlas!

En segundo lugar quiero agradecer especialmente a mi gran grupo de trabajo!! Me siento sumamente afortunada por haberme formado a lo largo de estos años tanto profesionalmente como personalmente junto a ustedes! Sin dudas esta tesis, se debe a un gran trabajo y esfuerzo grupal!

Principalmente, quiero agradecerle a la persona que me introdujo en este hermoso grupo de investigación, y a quien le estoy sumamente agradecida por todo! Gracias Yani por todos estos años de amistad incondicional, que empezaron en aquella primera materia de la carrera y continuaron luego trabajando a tu lado! Gracias por ser mi hermana de la vida, mi medio pomelo, mi amiga incondicional, por ayudarme en todo y por tener siempre la palabra justa! Gracias y más gracias por haberme hecho un lugarcito en tu familia, y por compartir tu vida conmigo!

En segundo lugar quiero agradecerle a Barbi por la linda amistad que formamos, por permitirme entrar en su vida de a poquito, y aceptar, aunque al principio con reticencia, mis abrazos cotidianos!! Gracias por ser mi compañera en las locuras, por nuestras interminables charlas en el confesionario, por bancarme en todas, por ser una amiga incondicional!

Gracias Edu, por haber compartido conmigo a lo largo de estos años todos tus conocimientos científicos, y de la vida! Gracias por asistirme siempre que te necesité y por siempre despejarme dudas en el campo de la medicina! Gracias y perdón, por bancarte mis cacareos en momentos de carcajadas y nuestro cotorreo cotidiano!! Gracias Caty, por la paciencia, por los consejos, por haberme enseñado en mis comienzos en el lab, y por seguir haciéndolo ahora que estas de vuelta! Siempre es un placer charlar con vos sobre ciencia y de la vida! Gracias Natu por tu buena onda cotidiana, por siempre estar dispuesta a ayudarme en todo, por ser una hermosa compañera, una gran cebadora de mates y por bancarte mis canciones para sobrellevar esos largos días de citometria!

Quiero agradecer a la Universidad de Buenos Aires por todos estos años de formación, y al CONICET por haber permitido que pudiera llevar a cabo mi doctorado.

Agradezco también al gobierno de Canadá por haberme otorgado una beca de perfeccionamiento y por haberme permitido llevar a cabo parte de este trabajo de tesis. Gracias a esta beca tuve la oportunidad de viajar a Canadá, crecer profesionalmente y personalmente, y tuve la oportunidad de compartir mi estadía con seres maravillosos. Infinitas gracias a Carlos, Julie y al pequeño Rafael por todo lo compartido, por recibirme con los brazos abiertos y por cuidarme casi como si fuera una hija más! Gracias a Jovane por las largas y divertidas horas compartidas en el labo, y por ser una gran amiga durante mis días allá! Gracias Jess, Valerie, Rock y Carol-Ann por hacerme pasar un invierno divertido!

Gracias a mis amigas del alma. A Polchi, por ser mi hermana de la vida, mi hígado bueno, gracias por seguirme en las locuras! Gracias Leichin por tus ocurrencias, por bancarme y apoyarme siempre y por reír conmigo! Gracias Jesi, y Romi por acompañarme también a lo largo de todo este proceso, siempre dándome aliento y fuerza!

Gracias infinitas a todos mis amigos, Barbu, Bruni, Negri, Pabli, Diegui, Andy, Ricky, Chiari, Lucre, Manchu, Mat, Santi, Lu y los chicos de folkrore!!

Los agradecimientos finales, son para mi familia. Gracias Má, por enseñarme desde chiquita que las cosas sólo se consiguen con esfuerzo, dedicación y corazón! Por alentarme, apoyarme y confiar en mis decisiones, siempre! Gracias a Luiggi y Ani también por el apoyo!

Gracias bro, por bancarme siempre, por entender mis ausencias y por alentarme siempre a hacer esto que tanto disfruto y me gusta!! Gracias a vos y a Andre por darme el mejor título que pueda existir.. el ser tia! La llegada de Vladimir me alegró el corazón! Gracias a mis tios y a todos mis primos por estar siempre!!

Y por último gracias a los que ya no están, pero que estoy segura que en algún lugar se sentirán orgullosos y compartirán mi alegría. Gracias Pá, por transmitirme, aun sin saberlo el amor a la ciencia! Gracias Baba por apoyarme y bancarme siempre y por sobre todo, por tu amor incondicional!

*“Los imposibles de hoy serán
posibles mañana”*

Konstantin Tsiolkovski

INDICE

ABREVIATURAS	16
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES CIENTIFICAS	18
INTRODUCCIÓN.....	22
1. BIOLOGÍA TUMORAL.....	23
1.1 Mecanismos de invasión y metástasis.....	28
1.2 Angiogénesis.....	32
1.3 Inflamación	33
1.4 Rol del estroma en la biología tumoral	36
2. CÁNCER DE VEJIGA.....	38
2.1 Incidencia y mortalidad.....	38
2.2 Etiología	41
2.3 Manifestaciones clínicas	42
2.4 Clasificación	43
2.5 Estrategias terapéuticas.....	46
2.6 Marcadores de pronóstico, diagnóstico y seguimiento en cáncer de vejiga	48
3. ÓXIDO NÍTRICO	50
3.1 Generalidades.....	50
3.2 Óxido nítrico en la biología tumoral	52
3.3 Óxido nítrico, progresión y estroma tumoral	56
3.4 Rol de NO en la angiogénesis tumoral	58
4. MODELO MURINO DE CÁNCER DE VEJIGA	59
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	62
1. HIPÓTESIS	63
2. OBJETIVO GENERAL	63
3. OBJETIVOS ESPECIFICOS	64
3.1 Estudios <i>in vitro</i>	64
3.2 Estudios <i>in vivo</i>	64

MATERIALES Y MÉTODOS	65
1. Líneas Celulares	66
2. Reactivos	66
3. Ensayos in vitro	67
3.1 Evaluación de viabilidad celular	67
3.2 Estudio de la actividad de inhibidores de la producción de NO sobre el crecimiento de células creciendo en monocapa	68
3.3 Estudio de la interacción entre fibroblastos y células tumorales	68
3.4 Preparación de medios condicionados	69
3.5 Evaluación de la producción de óxido nítrico	69
3.6 Preparación de extractos proteicos para Western-blot	69
3.7 Western Blot	70
3.8 Ensayo de gen reportero	71
3.9 Inmunofluorescencia	72
3.10 Extracción de RNA y PCR semi-cuantitativa	72
3.11 Determinación de actividad de MMPs y uPA	73
3.12 Ensayo de migración	74
3.13 Silenciamiento de iNOS	75
4. Ensayos In vivo	79
4.1 Evaluación del crecimiento tumoral	79
4.3 Ensayo de Angiogénesis	82
4.4 Ensayo de metástasis experimentales	82
4.5 Obtención de fibroblastos embrionarios	83
5. Técnicas histológicas	83
5.1 Coloración Hematoxilina & Eosina	83
5.2 Identificación de colágeno por Tricrómico de Masson	84
5.3 Inmunohistoquímica	84
6. Análisis estadístico	85
7. Consideraciones éticas	85
RESULTADOS	86
1. EFECTO DEL INHIBIDOR L-NAME SOBRE LAS LÍNEAS DE CaV	88
1.1 El L-NAME disminuye crecimiento celular y la producción de NO en forma dosis dependiente –Elección de una dosis de trabajo-	88

1.2 El L-NAME disminuye el crecimiento in vitro, la producción de NO y expresión de iNOS de líneas de CaV que expresan la enzima	89
1.2 Modulación de la expresión de iNOS	91
1.3 El L-NAME inhibe la vía de proliferación MAPK.....	94
1.4 El tratamiento con L-NAME reduce la actividad de enzimas proteolíticas de MB49-I	95
1.5 El L-NAME reduce la capacidad migratoria de la línea MB49-I	96
1.6 El tratamiento con L-NAME inhibe el desarrollo de metástasis experimentales en pulmón	97
2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON L-NAME <i>IN VIVO</i>	99
2.1 El L-NAME reduce el crecimiento heterópico de tumores que expresan iNOS	99
2.2 El L-NAME reduce la angiogénesis tumoral	101
3. ROL DEL ESTROMA EN LA PROGRESIÓN TUMORAL. EFECTO ANTITUMORAL DE LA INHIBICION DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO	103
3.1 El L-NAME induce regresión tumoral acompañada de deposición de fibras de colágeno	103
3.2 El L-NAME promueve la proliferación de fibroblastos in vitro	105
3.3 Los fibroblastos tratados in vitro con L-NAME presentan actividad anti tumoral	108
.....	109
4. TRATAMIENTO CON L-NAME EN EL MODELO ORTOTÓPICO	110
4.1 El L-NAME inhibe el crecimiento de tumores de vejiga, la expresión de iNOS y los niveles de nitrito en orina.....	110
5. INHIBIDORES ESPECIFICOS DE iNOS	116
5.1 Inhibidores específicos de iNOS también inhiben la proliferación de células de CaV, los niveles de NO y la expresión de NO.....	117
5.1 1400w inhibe el crecimiento tumoral in vivo	120
5.3 El tratamiento con 1400w reduce la angiogénesis tumoral in vivo	125
5.5 Ablación genética de iNOS	126
5.6 La ablación genética de iNOS disminuye el crecimiento tumoral in vivo	128
DISCUSIÓN	133
CONCLUSIÓN	142
REFERENCIAS	144
BIBLIOGRÁFICAS	144

ABREVIATURAS

NO	óxido nítrico
CaV	cáncer de vejiga
MB49:	línea de cáncer de vejiga murina no invasora del músculo
MB49-I:	línea de cáncer de vejiga murina invasora del músculo
MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteasa de matriz
uPA	activador de plasminogeno de tipo uroquinasa
BMDC	células derivadas de la medula ósea
ROS	especies reactivas del oxígeno
RNS	especies reactivas del nitrógeno
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
NFκB	factor nuclear potenciador de cadenas ligeras κ de células B activadas
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
NOS	óxido nítrico sintasas
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
NMI	no músculo invasores
MI	músculo invasores
RTU	resección transuretral
L-NAME	Nω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
PI3K	fosfoinositol 3-kinasa
MAPK	proteína activadora de la mitosis

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES CIENTIFICAS

Los resultados presentados en esta tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

2014- “The Inhibition of Nitric Oxide is a Good Therapeutic Target for Bladder Tumors that express iNOS”. **Belgorosky D**, Langle Y, Prack Mc Cormick B, Colombo L, Sandes EO, Eiján AM. Nitric Oxide Journal, dx.doi.org/10.1016/j.niox.2013.10.010

2012- “Inducible Nitric Oxide Synthase and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma are involved in bladder cancer progression. Sandes, E; Lodillinsku, C; Langle, Y; Belgorosky, D; Marino, L; Gimenez, L, Casabé, A; Eiján AM. Journal Urology ISSN:022-5347 Sep 188(3): 967-73, 2012, IF:4.016

Los resultados presentados en esta tesis han dado lugar a las siguientes comunicaciones científicas:

2015- “Estudio de crecimiento de células de cancer de vejiga silenciadas para iNOS mediante ensayos de bioluminiscencia *in vivo*”. **Denise Belgorosky**, Julie Girouard, Jovane Hamelin-Morrissete, Carlos Reyes-Moreno, Ana Maria Eiján. LX Reunión Anual de La Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Fisiología. 18-21 de Noviembre de 2015, Mar del Plata, Argentina. MEDICINA, Resumen 8, pag 137 volumen 73, supl. III-2013. I-ISSN 0025.7680.

2015- “Estudio de crecimiento y diseminación de células de cáncer de vejiga silenciadas para iNOS mediante bioluminiscencia *in vivo*”. **Denise Belgorosky**, Julie Girouard, Jovane Hamelin-Morrissete, Yanina Langle, Bárbara Prack Mc Cormick, Natalia Balarino, Carlos Reyes-Moreno, Ana María Eiján. XXX Jornadas Multidisciplinarias de Oncología, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo. “*Viejos y nuevos paradigmas de la Oncología. Prevención y nuevos blancos moleculares*”. Buenos Aires, 1 al 4 de Septiembre de 2015.

2013- “La inhibición de la producción de óxido nítrico, una modalidad terapéutica favorable para tumores de vejiga que expresan iNOS”. **Belgorosky D**, Langle Y, Prack

Mc Cormick B, Colombo L, Sandes EO, Eiján AM. LVIII Reunión Anual de La Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Fisiología. XLV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. 20-23 de Noviembre de 2013, Mar del Plata, Argentina. MEDICINA, Resumen 265, pag 186 volumen 73, supl. III-2013. I-ISSN 0025.7680.

2013- La inhibición de la producción de óxido nítrico: Una buena modalidad terapéutica para tumores de vejiga que expresan iNOS". **Belgorosky D**, Langle YV, Prack Mc Cormick B, Colombo L, Sandes EO, Eiján AM. XXIX Jornadas Multidisciplinarias de Oncología del Instituto "Ángel H. Roffo". "Nuevas Tecnologías: Mitos y verdades". 10-13 de Septiembre de 2013 resumen 40 del libro de actas de resúmenes de la jornada. **Ganador del premio Eugenia Sacerdote de Lustig.**

2013- "The use of 1400w, an specific inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in an orthotopic bladder cancer murine model". **Belgorosky D**, Langle YV, Eiján AM. Advances in Molecular Oncology: Translating Molecular Biology into Cancer Treatment. Sao Paulo, Brazil, February 3th-8th 2013.

2012- "Utilización del inhibidor específico de la óxido nítrico sintasa inducible, 1400w, en un modelo de cáncer de vejiga murino. **Belgorosky, D.**; Langle, Y.; Eiján, AM. LVII Reunión Anual de La Sociedad Argentina de Investigación Clínica. LX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. 14-17 de Noviembre de 2012, Mar del Plata, Argentina. MEDICINA, Resumen 218, pag 241 volumen 72, supl. II-2011. I-ISSN 0025.7680.

2012- "Rol del óxido nítrico en un modelo murino de cáncer invasor". **Belgorosky, D.**, Langle y., Eiján AM. XXVIII Jornadas Multidisciplinarias de Oncología del Instituto "Ángel H. Roffo". "Un siglo marcando pautas en el conocimiento". 11-14 de Septiembre de 2012 resumen 46 del libro de actas de resúmenes de la jornada.

2011- “Rol del óxido nítrico en el cáncer de vejiga utilizando un modelo murino con distintos grados de invasión”. **Belgorosky D.**, Langle Y., Lodillinsky C., Sander E., Eiján AM. LVI Reunión Científica Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 16-19 de Noviembre, Mar del Plata, Argentina. MEDICINA, Resumen 721, pag 185-186 volumen 71, supl. III-2011. I-ISSN 0025.7680. Presentación Oral.

INTRODUCCIÓN

1. 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 innumerables etapas en las cuales existen alteraciones en el control de procesos celulares tales como la proliferación, la interacción célula-célula y la muerte celular.

En el año 1837 Johannes Muller describía que el cáncer “estaba hecho de células”, un descubrimiento que sería el punto de partida para años de investigación, que se centrarían en discriminar entre células tumorales y normales [3]

El uso de modelos experimentales animales, llevó a postular que el desarrollo tumoral procede a través de un mecanismo de evolución Darwiniana, donde las células tumorales adquieren ventajas proliferativas y de sobrevivencia, generadas a partir de alteraciones de genes involucrados en el ciclo celular [4]. Sin embargo, luego de un siglo de estudios centrados en la célula tumoral, se produce un cambio en la manera de visualizar a los tumores, proponiendo que las variaciones dentro de las células tumorales se encuentran acompañadas de alteraciones en la matriz extracelular (MEC), capaz de influir sobre la proliferación, invasión y el pronóstico del tumor [5, 6].

Estos descubrimientos cambiaron el foco de las investigaciones, donde se llevó a pensar en los tumores como redes de interacciones complejas entre distintos tipos celulares que establecen relaciones tanto homo como heterotípicas (**Figura 1**). Las células aparentemente normales presentes en el tumor, como fibroblastos y adipositos, células de la inmunidad adaptativa e innata, y células de la vasculatura linfática y sanguínea, así como células mesenquimáticas especializadas (propias de cada microambiente tisular), son por lo tanto, participantes activos de la progresión.

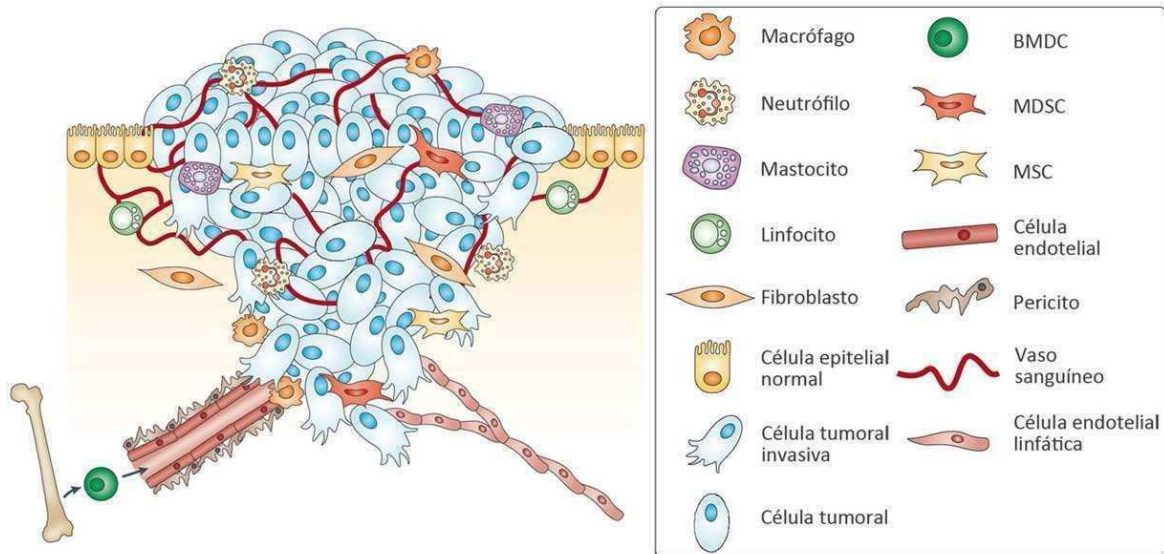


Figura 1: Microambiente de un tumor primario. En el tumor primario las células tumorales se encuentran rodeadas por un microambiente complejo con numerosos tipos celulares, incluyendo células de la circulación linfática y sanguínea y distintas células derivadas de la médula ósea (BMDCs) como macrófagos, células mieloides supresoras (MDSCs) y células madre mesenquimales (MSCs). Adaptado de Joyce, JA y J.W Pollard. Nat Rev Cancer, 2009.

Luego de pensar a los tumores como redes de interacciones complejas, Brown descubrió que las células que sufrían transformaciones malignas, eran capaces además, de modificar otras células. En este contexto, las células tumorales tienen la capacidad de reclutar complejos vasculares y estroma a partir de la producción y secreción de factores de crecimiento y citoquinas. 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 MEC y/o la producción de enzimas proteolíticas para su degradación.

Estos estímulos también pueden generar cambios fenotípicos en 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 estas interacciones pueden actuar modulando la respuesta de células no tumorales o del estroma, favoreciendo la angiogénesis, degradando la MEC o bloqueando la respuesta del sistema inmune, determinando que el tumor proliferen en forma descontrolada, colonizando el órgano propio, y llegando a órganos alejados (metástasis), eventos que caracterizan a la progresión tumoral [7, 8].

En este contexto, el desarrollo del cáncer depende en gran parte de la habilidad de las células malignas a secuestrar y explotar los procesos fisiológicos normales del huésped[9]. Los tumores, tanto benignos, como los malignos, tienen entonces dos componentes básicos: 1) células tumorales en proliferación que constituyen su *parénquima*, y 2) el tejido conectivo que las rodea, constituyendo el *estroma* [10]. El crecimiento y la evolución de las neoplasias dependen en gran medida de su interacción con el estroma. En base a su componente parenquimatoso, la nomenclatura para los tumores malignos incluye, entre una gran variedad, a los denominados habitualmente “sarcomas”, que surgen en tejidos mesenquimales, y los “carcinomas”, que se originan en células epiteliales.

A su vez, este microambiente tumoral “activado” por el huésped (compuesto por células y componentes extracelulares) modifica el comportamiento proliferativo e invasivo de las células tumorales.

En un intento por explicar el complejo proceso de transformación maligna, Hanahan y Weinberg, en el año 2000, propusieron que existían seis modificaciones en el funcionamiento celular que adquieren las células tumorales, de cualquier origen, durante este proceso: autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), replicación ilimitada, inducción de la angiogénesis, activación de mecanismos de invasión de tejidos y metástasis [11]. Es importante mencionar que aunque presentadas como “características distintivas del cáncer”, las primeras cinco, también se aplican a tumores benignos, mientras que sólo la capacidad de invadir y metastatizar es exclusiva del cáncer [12]. Durante la última década este concepto se fue consolidando y expandiendo,

lo que motivó la revisión de estas características, modificando la formulación original para incluir nuevos rasgos y profundizar en el rol y las contribuciones del microambiente a la biología tumoral [13]. Se describieron dos *características habilitantes* que permiten la adquisición de las seis funciones ya descritas: *la inestabilidad genómica* que genera mutaciones al azar y re-arreglos cromosómicos en las células tumorales y el *estado inflamatorio crónico*, que pueden promover la progresión tumoral mediante diversos mecanismos.

Al mismo tiempo, se agregaron a la lista dos características distintivas nuevas: la reprogramación del metabolismo celular y la evasión del sistema inmune. Esta última, enfatiza el rol dicotómico del sistema inmune, que puede inhibir o promover el desarrollo y la progresión tumoral. La visión general de lo que hoy se conoce como proceso de transformación maligna y los eventos biológicos que contribuyen al establecimiento de un tumor se resume en la **Figura 2**.



Figura 2: Eventos que llevan a la transformación maligna. Resumen de las características que adquieren las células epiteliales y estromales durante el proceso de transformación maligna. Imagen adaptada de Hanahan y Weinberg, 2011.

En base a lo descrito anteriormente, los estudios destinados a comprender la biología tumoral, deben estar basados en la comprensión tanto de la propia célula tumoral, como del microambiente que ellas generan durante la transformación maligna.

A continuación se hará foco en tres de los eventos de malignización como son la *capacidad invasiva*, la *angiogénesis* y la *inflamación*.

1.1 Mecanismos de invasión 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 tumoral. Comienza con la adhesión de la célula neoplásica a la MEC, seguida por la degradación de la MEC por enzimas proteolíticas y finalmente por la migración celular a través de la MEC alterada. En este complejo proceso participan numerosas moléculas con actividades específicas como lo son moléculas de adhesión y sus receptores (integrinas y proteoglicanos de membrana), factores promotores de la motilidad, componentes estructurales de la MEC (lamininas y fibronectina), enzimas proteolíticas, activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y metaloproteasas (MMP) [14].

En general se considera al desarrollo tumoral como 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 tumorhuésped, habiendo adquirido un fenotipo invasor y metastático [15].

A medida que las células epiteliales evolucionan hacia grados patológicos más agresivos, adquieren características que les permiten primero invadir el tejido localmente, degradando la membrana basal, para luego generar metástasis a distancia. Mientras que la resección quirúrgica y la terapia neo-adyuvante logran controlar de manera efectiva el crecimiento primario, el estadio metastático de la enfermedad es incurable, debido a su diseminación sistémica y resistencia a agentes quimioterapéuticos. Es por ellos que resulta de suma importancia, para la generación de terapias efectivas, lograr entender los mecanismos moleculares responsables de lo que se conoce como “cascada metastásica” (**Figura 3**).

Las características que permiten a las células malignas sobrevivir, proliferar y diseminarse se adquieren por distintos mecanismos y en diferentes momentos durante el curso de la progresión tumoral. La biología de la mayoría de los tumores malignos puede dividirse en cuatro fases: 1) Transformación de la célula diana, 2) crecimiento de las células transformadas, 3) invasión local y 4) metástasis a distancia. En el proceso de transformación, la célula acumula mutaciones en genes específicos [16], como protooncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del ADN.

La metastatización es 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 [15].

La colonización de los tejidos circundantes y/o órganos alejados del tumor primario (metástasis) constituye un proceso fisiopatológico de profunda relevancia clínica. La diseminación metastásica provoca en el huésped un impacto sistémico severo, siendo el acontecimiento que empeora el pronóstico del paciente oncológico.

Tanto la invasión como la metástasis representan dos obstáculos enormes en la terapéutica de las neoplasias.

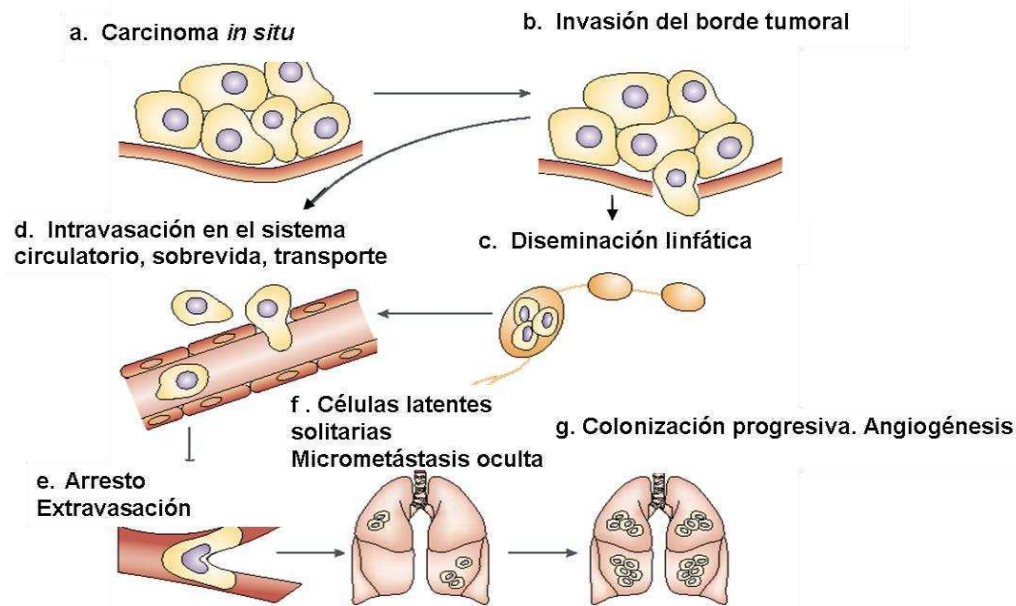


Figura 3: Cascada metastásica. Modificado de, Fidler, I.J. Nat Rev Cancer, 2003 [17] y Joyce, J.A y J.W. Pollard, Nat Rev Cancer, 2009 [18]. La metástasis es un proceso complejo que se ejecuta en múltiples pasos: (a) Inicialmente, un carcinoma *in situ* rodeado por una membrana basal indemne. (b) la 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 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 micro metástasis oculta, para ir creciendo progresivamente (g) hasta dar una metástasis angiogénica.

1.1.1 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, tanto en lo referido a la invasión local del tumor primario como al anidamiento en un órgano blanco de la metástasis. El activador de plasminógeno (PA) y las metaloproteasas (MMP), son enzimas más características cuya desregulación está asociada al proceso metastático.

El sistema PA está compuesto por dos serinas proteasas de estructura similar: uPA (activador de plasminógeno tipo uroquinasa), tPA (activador de plasminógeno tipo tisular). Mientras que ambos son capaces de convertir el plasminógeno inactivo a plasmina activa, sólo uPA participa en procesos de invasión tumoral y metástasis [19]. La actividad de uPA está regulada por la acción de inhibidores de los activadores de plasminógeno (PAIs). 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 Cinc, 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. Las mismas, no sólo son esenciales para la degradación de las proteínas extracelulares, sino que también poseen roles importantes para la señalización celular, como el clivaje de los predominios y subsecuente activación de factores de crecimiento y citoquinas [20].

La actividad de uPA y MMPs, están asociadas a la capacidad invasiva en condiciones fisiológicas y patológicas. La sobreexpresión de uPA y MMPs, en varios tumores malignos está fuertemente correlacionada con un fenotipo invasor y de peor pronóstico [21, 22]. Numerosos trabajos han reportado altos niveles de MMP-2 y MMP-9 asociados con incremento en la generación de metástasis. Hasta el momento, la conclusión a la cual se puede llegar, es que el número y cantidad relativa de de MMPs se ve incrementado con la progresión tumoral en diferentes tipos de tumores. Se ha reportado aumento de la expresión de MMP-2 y MMP-9 en células de carcinoma de endometrio durante la progresión histológica de grado 1 a grados mayores [23]. Asimismo, se ha observado un aumento en la expresión de uPA y MMP-2 en fibroblastos del estroma tumoral, en carcinoma mamario, asociado a un peor pronóstico en los pacientes [24].

1.2 Angiogénesis

El crecimiento de las células tumorales requiere de la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, proceso denominado angiogénesis [25]. El mismo, es un proceso complejo que comprende la proliferación y migración de las células endoteliales, la digestión proteolítica de la matriz tisular y la diferenciación de los capilares funcionales. Durante la vida adulta, la actividad angiogénica es casi nula, exceptuando algunos procesos fisiológicos como la curación de heridas o durante el embarazo [16, 26].

El proceso angiogénico se encuentra finalmente 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 es 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, 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, permitiendo la penetración de las células tumorales con mayor 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 [27]. De esta manera, la angiogénesis mejora el suministro sanguíneo tumoral, proveyéndolo casi ilimitadamente de oxígeno y nutrientes y de un sistema de eliminación de metabolitos tóxicos, permitiéndole un rápido crecimiento [28].

La falta de oxígeno en el centro del tumor (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 100µm 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, donde el tumor es capaz de expandir su tamaño. Dicho cambio es un proceso altamente complejo relacionado con la hipoxia, siendo este, el factor modulador de la expresión de factores angiogénicos en las células tumorales, como lo son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos-b (FGFb) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) [29]. Asimismo, mientras dicho switch permanece “encendido”, capilares nuevos continúan creciendo de manera de llevar el suministro sanguíneo a través del tumor, promoviendo el crecimiento tumoral, y generando nuevas áreas de hipoxia, generando así una nueva necesidad de vascularización.

De aquí en adelante, una serie de pasos limitantes afectan la capacidad de las células tumorales circulantes de establecer tumores secundarios en el sitio metastásico. En cada paso, pueden enfrentarse a diferentes destinos (muerte, latencia o supervivencia), modulados por factores microambientales, incluyendo la formación de escudos por agregados de plaquetas en circulación, la activación de células residentes del estroma y el reclutamiento de diferenciación de BMDCs. La proliferación dentro del parenquima de un órgano distante específico completa el proceso metastático. Para continuar creciendo, las micrometástasis deben desarrollar una red vascular y evadir la destrucción por las defensas del huésped.

1.3 Inflamación

1.3.1 Inflamación y cáncer

La inflamación es un proceso complejo que induce al sistema inmune en respuesta a diferentes noxas, entre ellas virus y bacterias que injurian al organismo. Además de infecciones bacterianas y virales, injurias físicas como la radiación UV y las químicas, como las producidas por las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del

nitrógeno (RNS), pueden inducir inflamación de los tejidos [30]. Tales estímulos activan señales intracelulares que regulan la expresión de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina-1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral- α (TNF α) y la interleuquina-6 (IL-6), junto con quimoquinas y moléculas de adhesión celular, para promover el reclutamiento y la activación del sistema inmune.

Los procesos de inflamación aguda son en general autolimitantes, dado que la producción de citoquinas proinflamatorias promueve la liberación de otras citoquinas antiinflamatorias para frenar el proceso. Si el estímulo causante de la reacción no es eliminado o falla su autolimitación, la inflamación se perpetúa en el tiempo y se transforma en crónica. Diversas enfermedades se encuentran asociadas a la persistencia de la inflamación y entre ellas, se destaca el cáncer [31-33].

La inflamación crónica se caracteriza por un daño tisular sostenido que induce proliferación celular y mecanismos de reparación tisular inadecuados. En este contexto se producen cambios del fenotipo celular, conocido como metaplasia, que es reversible cuando el estímulo inflamatorio desaparece. Si este se perpetúa en el tiempo pueden inducirse cambios en la histoarquitectura tisular, conocidos como displasia, un proceso previo a la generación de carcinoma [34].

Las primeras evidencias de la conexión entre la inflamación crónica y el cáncer datan de 1863 con las observaciones de Rudolf Virchow acerca de la ocurrencia frecuente de tumores en sitios de irritación crónica [35]. Sin embargo, el estudio de esta relación no fue retomado hasta hace unas décadas, con el hallazgo de asociaciones estrechas entre la incidencia de distintos tumores y la inflamación subyacente [36] [37]. Es el caso del desarrollo de carcinomas de estómago, hígado, próstata y páncreas, vinculado a la inflamación inducida por la presencia de *Helicobacter pylori*, la hepatitis crónica, la atrofia inflamatoria de la próstata y la pancreatitis crónica, respectivamente [38, 39]. Pacientes que sufren desórdenes inflamatorios del colon, como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn presentan mayor riesgo de desarrollar cáncer de colon mientras que el tratamiento de la colitis con drogas antiinflamatorias reduce ese riesgo [38, 39].

Existen diferentes hipótesis no excluyentes que indican que la inflamación podría modular diferentes etapas de la progresión tumoral [40]. Una de ellas propone que en respuesta al estímulo inflamatorio distintas células de la inmunidad innata (mastocitos,

neutrófilos, eosinófilos, etc) son reclutados a los sitios de infección e inflamación, generando ROS y RNS, que pueden iniciar el proceso de la carcinogénesis promoviendo el daño del DNA y aumentando, de esta manera, la tasa de mutaciones [37] (**Figura 2**). La exposición a radicales libres puede modificar proteínas de manera postraduccional y alterar la funcionalidad de los productos proteicos de genes supresores de tumor como p53 [41]. Dado que se requieren de más eventos genéticos y epigenéticos que una única mutación para convertir células iniciadas en células carcinogénicas, la perpetuación de la inflamación en el tiempo se encarga de inducir mayor número de mutaciones.

Otra hipótesis propone que la inflamación pone en marcha mecanismos de cicatrización que implican la producción de factores de crecimiento, como el epidérmico (EGF) y el fibroblástico (FGF) que provocan un desbalance entre señales proliferativas y de muerte celular, debido a la activación de vías de supervivencia. Las citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) activan tales vías de supervivencia, favoreciendo la evasión de la muerte celular [42-44].

Existen diversas vías de señalización presentes en los tumores, la vía del factor inducible por hipoxia (HIF), la del factor de transcripción nuclear potenciador de cadenas ligeras de células B activadas (NF- κ B), y otras a partir de oncogenes como Ras [45, 46].

La generación del cáncer de vejiga (CaV) se encuentra asociada con episodios de inflamación crónica causada por el consumo del tabaco, infecciones del tracto urinario o cistitis crónica [47-49] 118-120]. Se reportó también que la presencia de TNF- α e IL-6, a través de la activación de NF- κ B y el transductor de señal y activador de la transcripción (STAT3), respectivamente [50] se encuentran asociadas a tumores más agresivos y a la baja respuesta a la inmunoterapia endovesical con el Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), y por ende a un peor pronóstico [51-58]. Además, las vías de señalización TNF- α / NF- κ B e IL-6/STAT3 fueron identificadas como los factores principales que transforman leucocitos intratumorales en células con actividad protumoral [51].

Considerando que estos mediadores inflamatorios tienen una función crítica en el crecimiento del CaV, en su diseminación y resistencia a tratamiento, el uso de agentes antiinflamatorios, podría ser un abordaje interesante para disminuir el desarrollo tumoral [50, 52, 59, 60].

Hasta ahora se habló del proceso inflamatorio asociado a la inducción de tumores. Sin embargo, en tumores ya establecidos las propias células tumorales pueden producir moléculas vinculadas con la inflamación que les proporciona ventajas de supervivencia y crecimiento. Entre ellas, la activación del factor de transcripción NFκB, induce entre otros la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), enzima clásica del proceso inflamatorio que produce altos niveles de óxido nítrico (NO). Esta enzima puede expresarse no solo en las células del sistema inmune sino también en células tumorales, proporcionando una ventaja de crecimiento.

1.4 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, donde 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 los oncogenes y genes supresores de tumor. La progresión de un tumor depende, como se mencionó anteriormente, del diálogo entre los diferentes tipos celulares que conforman el tumor, y el estroma, el cual incluye un componente celular y una MEC.

Es posible decir, que la constitución de la MEC puede variar considerablemente en los distintos tumores, dependiendo de las características intrínsecas del modelo de estudio, siendo que el estroma puede promover o inhibir el crecimiento tumoral. Un ejemplo de este proceso ocurre cuando el estroma de un tumor es modificado por las propias células tumorales. Este estroma modificado libera productos que nutren y estabilizan al tumor promoviendo su progresión. Se ha visto que la normalización del estroma por el agregado de fibroblastos normales tiene la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral, lo cual plantea al estroma y no solo a la célula tumoral, como un nuevo blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer [61]

En los tumores sólidos, las células neoplásicas coexisten con un estroma tumoral complejo, compuesto por una gran variedad de células de origen mesenquimal entre ellas, fibroblastos (FB), células endoteliales, pericitos y células asociadas a la respuesta

inmune e inflamatoria. Estas células, junto con la MEC que las rodea, componen el microambiente tumoral

1.4.1 Fibroblastos

Los FB son las principales células del tejido conectivo y se encuentran embebidos en una matriz fibrilar que ellos mismos sintetizan. Las principales funciones fisiológicas de los FB son 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. Sintetizan varios de los componentes que constituyen la MEC como fibronectina y los distintos tipos de colágenos [62, 63]. Contribuyen también a la formación de la membrana basal mediante la secreción de colágeno IV y laminina. Además, son importantes remodeladores de la MEC, ya que liberan varios tipos de MMP, capaces de degradar distintos componentes de la MEC para, de esta manera, mantener su función [64]. Los fibroblastos participan en la homeostasis del epitelio adyacente mediante la secreción de factores de crecimiento y mediante la interacción directa entre células epiteliales y mesenquimáticas [65]. 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 como son los macrófagos. Poseen especializaciones del citoesqueleto que facilitan la contracción y cierre final de la herida [62].

Los fibroblastos aislados de una herida o de un tejido fibrótico se denominan fibroblastos activados. Secretan elevados niveles de proteínas de la MEC y poseen una tasa de proliferación mayor que la de los fibroblastos aislados de un tejido normal. Se caracterizan por la expresión de actina de músculo liso alfa (SMA-alfa) [66]. 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 pueden permanecer “activados”. Se ha reportado que la activación constante de estas células podría conferirles propiedades pro-tumorales [62].

Las células tumorales pueden modificar el estroma, haciendo que este pierda su capacidad para mantener la homeostasis y favoreciendo que trabaje a favor del tumor [67]. Sin embargo, existen algunas diferencias entre un estroma normal y uno “reactivo” asociado al tumor. El estroma normal en la mayoría de los órganos contiene un mínimo número de fibroblastos en asociación con la MEC [68]. En cambio, un estroma reactivo se asocia a un incremento en el número de fibroblastos, una mayor densidad de capilares y una mayor deposición de colágeno I y fibrina [69, 70]. Como se mencionó al inicio de este apartado, hay autores que han planteado que el estroma también puede inhibir el crecimiento tumoral. Un ejemplo de este hecho se da por la acumulación de una densa MEC en algunos tumores, lo cual contribuye a incrementar la presión del fluido intersticial y dificultar la difusión de macromoléculas y del oxígeno, llevando a una necrosis de las células tumorales [71]. Se ha reportado, también, que la adición de fibroblastos normales a masas tumorales es capaz de inhibir el crecimiento tumoral, aunque aún no está claro a través de qué mecanismos [72]. Uno de los mecanismos propuestos postula a los fibroblastos como moduladores de la respuesta inmune, mediante la secreción de citoquinas como Interferón gamma (IFN-gamma), IL-6 y TNF-alfa. Estas citoquinas pueden movilizar a células del sistema inmune como son los linfocitos T, células natural killer y macrófagos. También se ha demostrado que los fibroblastos normales pueden ayudar a prevenir la apoptosis de los linfocitos T [73]. Estos antecedentes han llevado a pensar en utilizar a los fibroblastos como células a las cuales se las podría dirigir para que cumplan un rol anti-tumoral que complemente las terapias ya existentes.

2. CÁNCER DE VEJIGA

2.1 Incidencia y mortalidad

El cáncer de vejiga (CaV) es el segundo tumor más frecuente del tracto urogenital masculino luego del de próstata y ocupa el cuarto lugar entre los tumores sólidos en los

Estados Unidos [74]. A nivel mundial, ocupa el noveno lugar con 430,000 nuevos casos diagnosticados en el año 2012. En nuestro país, ocupa el octavo lugar en mortalidad por cáncer en el hombre con tasa de 4.8 por 100.000/año, mientras que en la mujer es de 0.9/100.000/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 quinta y séptima década de la vida, dándose la mayor incidencia en Europa, Estados Unidos y Egipto, en poblaciones caucasicas (**Figura 4A**) [75]. La mayor tasa de mortalidad en hombres es de 8/100.000/año en Medio Oriente y el Norte de África (**Figura 4B**) [76].

Al momento del diagnóstico el tipo histológico más frecuente es el carcinoma de células transicionales, en más del 90% de los casos. Luego le sigue el carcinoma de células escamosas con un 5-7% en los países occidentales. Sin embargo, en países no occidentales como Egipto asciende al 75% de los casos. Este tipo histológico se encuentra asociado a procesos inflamatorios crónicos como la infección por *Schistosoma haematobium*, la permanencia de catéteres por largo tiempo, la litiasis vesical o vejiga neurogénica, y es generalmente de peor pronóstico que el anterior. El adenocarcinoma de vejiga es un tumor menos frecuente aún y representa sólo el 1.4 % de todos los tumores vesicales. Se caracteriza por tener un pronóstico desfavorable y responder poco al tratamiento quimioterapéutico y quirúrgico [77].

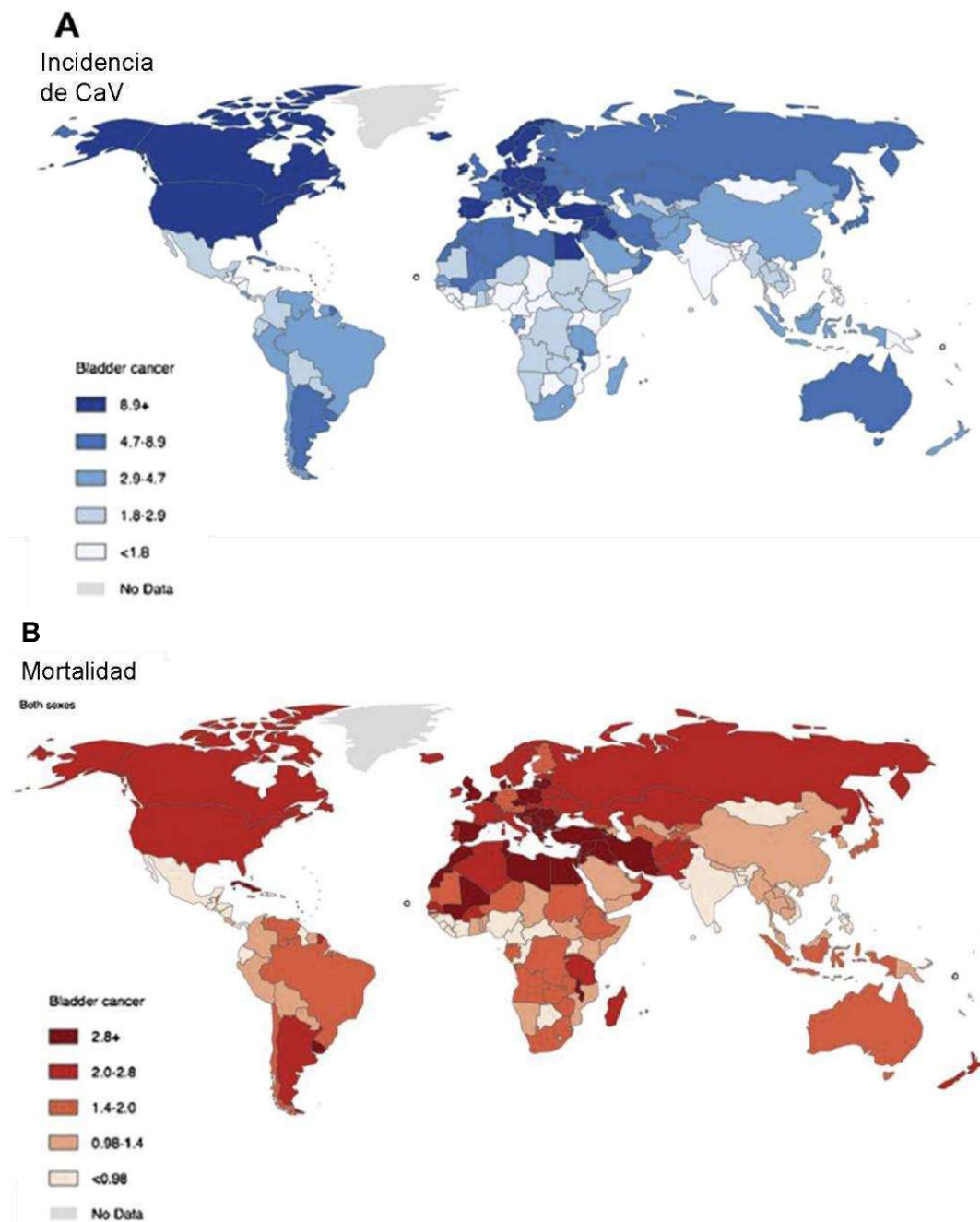


Figura 4: Epidemiología del CaV. A) Incidencia mundial B) Mortalidad. Modificado Malats, N. Hematol Oncolol Clin Am, 2015 [76].

2.2 Etiología

Las causas principales asociadas a la generación de tumores de vejiga son: el hábito tabáquico, la exposición ocupacional a carcinógenos químicos y los procesos inflamatorios crónicos.

El mecanismo por el cual los procesos inflamatorios crónicos aumentan el riesgo de padecer CaV es un tema de debate, sin embargo, algunos investigadores han señalado que la producción de NO y la de compuestos N-nitrosos generados durante el metabolismo de éste podrían ser responsables de la carcinogénesis en vejiga [78-80].

El mecanismo que relaciona al hábito tabaquito con el riesgo de CaV no es claro, pero se cree que una de las causas es la presencia de aminas aromáticas, como el 4-aminobifenilo, en el humo del cigarrillo. Estas arilaminas sufren una transformación metabólica con la consiguiente producción de intermediarios reactivos que tienen la capacidad de formar aductos con el ADN, favoreciendo el proceso de carcinogénesis.

La primera causa bien establecida de CaV, se encuentra relacionada con la exposición ocupacional: la industria textil (por el teñido de telas), la cosmética (fabricación de tinturas), y la industria del caucho, son las actividades que generan una gran exposición a compuestos carcinógenos, como las arilaminas, y se estima que son responsables del 20% de los casos diagnosticados [81]. La mayoría de estas sustancias lleva años de acumulación y largos periodos de latencia antes del desarrollo de una patología tumoral.

Otras ocupaciones han sido relacionadas con el riesgo de CaV a lo largo de estos años incluyendo pintores y trabajadores del cuero, pero su contribución en la incidencia de CaV, es mucho menor [82].

Los procesos inflamatorios también se han asociado con la incidencia de CaV. La cistitis por *Shistosoma haematobium*, patología endémica en Egipto, Irak y Sudeste de África, asociada con el desarrollo de Cav, principalmente asociado al carcinoma de células escamosas y en menor proporción al de células transicionales [77, 83]. El mecanismo por el cual esta infección causa CaV no es claro, sin embargo, algunas publicaciones sugieren que puede deberse al nitrito y compuestos N-nitrosos, generados durante el proceso inflamatorio [78]. Como consecuencia de la infección secundaria con

bacterias nitrato-reductoras, que invariablemente acompañan a la esquistosomiasis vesical, se forman en la vejiga compuestos nitrogenados, tales como nitrosaminas y nitrosamidas, con capacidad carcinogénica [84].

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 [85], atribuido por algunos autores, también a la presencia de NO y compuestos N-nitrosos, durante dicho proceso [79].

2.3 Manifestaciones clínicas

La manifestación clínica más frecuente en el CaV es la presencia de hematuria, observándose en el 80% de los pacientes, generalmente de manera intermitente, pudiendo ser macro o microscópica. En un 20% de los pacientes pueden encontrarse síntomas irritativos, como disuria y polaquiuria, síntomas frecuentemente asociados con tumores vesicales con características más agresivas. Manifestaciones menos frecuentes, como dolor pélvico por compresión nerviosa, edema en miembro inferior por obstrucción venosa o linfática o dolor óseo, por metástasis, pueden suceder también, hablando de una patología en estado avanzado [77].

La estrategia diagnóstica más frecuentemente empleada al inicio, en presencia de hematuria, es la ecografía y un urograma excretor, analizando así el tracto urinario completo desde la pelvis renal hasta la vejiga. Luego del estudio radiológico, lo indicado es realizar una endoscopia diagnóstica, permitiendo establecer la apariencia macroscópica, localización número y patrón de crecimiento de la o las lesiones con la consiguiente toma de biopsia para diagnóstico histológico [77]. Dado que los tumores uroteliales, sufren generalmente exfoliación de células hacia la orina, el estudio citológico de una muestra seriada de orina resulta de gran ayuda en aquellas lesiones de muy pobre definición macroscópica, y con células muy indiferenciadas.

2.4 Clasificación

2.4.1 Estadificación

Los tumores de vejiga se estadifican según el sistema T.N.M. Este sistema tiene en cuenta el grado de invasión del tumor primario (T), la presencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia de metástasis distantes (M) [86].

Aproximadamente, el 70% de los nuevos casos detectados de CaV está constituido por tumores no invasores del músculo detrusor (NMI). Dentro de este grupo, el 70% son tumores papilares exofíticos, confinados a la mucosa (Ta), el 25% son tumores papilares confinados a la submucosa (T1), y el 5% restante está constituido por lesiones planas de alto grado, denominadas carcinoma in situ (Tis). Este tipo de carcinoma, si bien se encuentra limitado al urotelio, es una entidad especial que tiene un comportamiento más agresivo con progresión rápida [87] (**Figura 5**).

Los tumores invasores del músculo detrusor se clasifican según su grado de invasión en T2 cuando comprometen el músculo detrusor hasta la mitad interna (pT2a) o la mitad externa (pT2b), T3 cuando alcanzan el tejido perivesical, de manera microscópica (pT3a) o macroscópica (pT3b), T4a cuando llegan a invadir el estroma prostático, útero o vagina y pT4b cuando invaden la pared pelviana o abdominal.

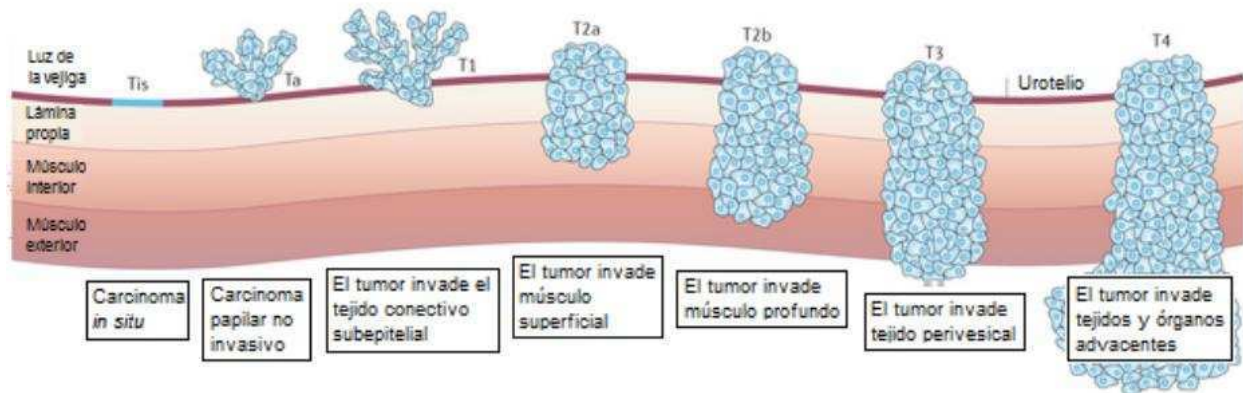


Figura 5: Clasificación del CaV según el grado de invasión. Los tumores no invasores del músculo (pTa-pT1) son aquellos que comprometen desde el urotelio hasta la lámina propia; mientras los invasores corresponden a aquellos tumores que comprometen el músculo detrusor (pT2), alcanzan la grasa perivesical (pT3) o invaden órganos vecinos (pT4). El carcinoma *in situ* (Tis) se extiende sobre la superficie urotelial. Adaptado de Knowles, M.A, Nat Rev Cancer, 2015 [88].

En cuanto a la distinción entre las componentes N y M del sistema de estadificación TNM, en CaV se denomina ganglio regional a cualquier ganglio perteneciente a las regiones primaria y secundaria de drenaje. Aquellos ganglios ubicados por encima de la bifurcación aórtica son considerados ganglios distantes. En base a esta distinción, según la presencia de metástasis ganglionares en ganglios regionales, se define N0 como la ausencia de metástasis, N1 como presencia de metástasis única en nódulo linfático regional en la pelvis verdadera, N2 como metástasis múltiples en nódulos linfáticos regionales en la pelvis verdadera y N3 como metástasis en ganglio linfático pertenecientes a los ganglios iliacos comunes. La clasificación según metástasis a distancia indica M0 como ausencia de metástasis, y M1 como presencia de metástasis [89].

2.4.2 Grado de indiferenciación histológica

Según el grado histopatológico se clasifica a los tumores vesicales en: Neoplasia papilar urotelial de bajo potencial maligno (PUNLMP), Carcinoma urotelial de bajo grado y Carcinoma urotelial de alto grado. Dicha clasificación fue consensuada en el 2004 por la Organización Mundial de la Salud, relacionando el grado histológico con las alteraciones en genética molecular y valor pronóstico **(Figura 6)** [87].

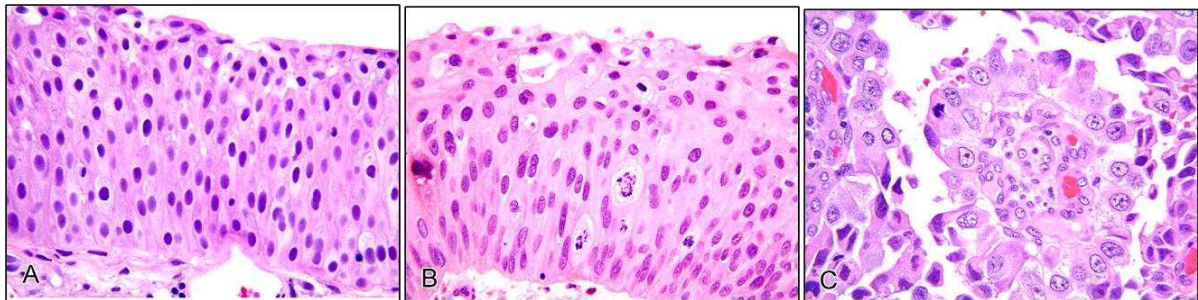


Figura 6: Grado histopatológico de tumores uroteliales: A) Neoplasia papilar urotelial de bajo potencial maligno (PUNLMP); B) Carcinoma urotelial de bajo grado; C) Carcinoma urotelial de alto grado. Extraído de Mac Lennan G. T, et al, Eur Urolo, 2007[1]

2.4.3 Diagnostico histopatológico

En base al tipo celular que dio origen a la lesión, por analisis histopatológico, el CaV puede clasificarse en carcinoima urotelial de células transicionales, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma o carcinoma indeferenciado. El subtipo con mayor predominancia es el carcinoma urotelial de celulas transicionales [89]. En lo sucesivo en esta tesis, cuando se haga referencia al carcinoma de células transicionales, se lo hará como CaV.

2.5 Estrategias terapéuticas

La estrategia terapéutica del CaV se define teniendo en cuenta la histopatología y el grado de profundidad de la invasión, de manera de estimar las probabilidades de recurrencia y de progresar a estadios más avanzados.

El espectro clínico del CaV puede ser dividido en tres grupos que difieren en pronóstico, manejo y objetivos terapéuticos [89]: El primero, se encuentra conformado por tumores NMI, donde el tratamiento se encuentra dirigido a evitar y reducir las recurrencias y prevenir la progresión a estadios más avanzados. Los tumores músculo invasores forman parte del segundo grupo, donde lo importante es determinar si la vejiga debe ser removida o si es posible preservarla, sin comprometer la supervivencia del paciente. Es importante determinar en este grupo si es posible tratar la lesión primaria de manera local, o si tratamientos sistémicos son necesarios, en el caso de que el paciente presente un alto riesgo de diseminación metastásica. El último grupo se encuentra constituido por las lesiones metastásicas, centrando la terapia en intentar mejorar la calidad de vida del paciente y su tiempo de supervivencia.

Al momento del diagnóstico el 75% de los tumores vesicales que se presentan en la clínica son NMI, presentando una alta tasa de recurrencia. Estimativamente entre un 31% y un 78% de los pacientes con tumores confinados a la mucosa o submucosa, experimentan recurrencias dentro de los 5 años luego del tratamiento inicial [90]. De los tumores que recurren, entre un 10 % y un 15 % progresan a la invasión del músculo detrusor. La alta tasa de recurrencias y el riesgo de progresión requiere en los pacientes un compromiso de vigilancia a lo largo de toda la vida. La estrategia terapéutica de elección para los tumores NMI y de bajo grado de indiferenciación es la resección transuretral (RTU) de manera endoscópica.

En el caso de los tumores NMI de alto grado, y en el carcinoma in situ, al poseer un comportamiento agresivo y de tendencia a la progresión, la RTU suele estar acompañada de la instilación intravesical de una suspensión de BCG. Esta inmunoterapia resulta ser el tratamiento más efectivo para la profilaxis de la recurrencia y la progresión de la enfermedad. Sin embargo, en casos de intolerancias a BCG, pueden utilizarse agentes citostáticos como mitomicina C o doxorubicina.

Los tumores de alto grado histológico son los que poseen el peor pronóstico, ya que al momento del diagnóstico, el 50% de los pacientes presentan invasión del músculo detrusor. De los pacientes que presentan el músculo comprometido, el 50% presenta metástasis a distancia dentro de los 2 años, y su expectativa de vida a 5 años es sólo del 40%, a pesar del tratamiento [91]. El tratamiento más ampliamente aceptado para pacientes que presentan tumores de alto grado histológico, NMI (Ta,T1) o carcinoma in situ, que recidivan luego del tratamiento con BCG es la cistectomía radical, con disección de nodulos linfáticos pelvianos y derivación urinaria. Mediante esta estrategia se alcanza un porcentaje libre de enfermedad del 68% a los 5 años y del 66% a los 10 años [92]. Dependiendo del alcance del tumor, la cistectomía radical estándar -en hombres- incluye la eliminación de la vejiga, próstata, las vesículas seminales y los ureteres distales. En la mujer, incluye la eliminación de la vejiga, la totalidad de la uretra y la vagina adyacente, el útero y los ureteres distales. A pesar de los recientes avances en las técnicas quirúrgicas, la cistectomía radical sigue presentando tasas de complicaciones de hasta el 30% y de mortalidad perioperatoria de entre el 2% y del 3% dependiendo de la edad del paciente, las comorbilidades y la complejidad del procedimiento. Asimismo, la derivación urinaria posterior a la cistectomía, presenta efectos a largo plazo sobre la función urinaria, gastrointestinal y sexual, y también provocan cambios en la imagen corporal de los pacientes, comprometiendo de manera significativa la calidad de vida de estos pacientes. Existe un mínimo porcentaje de pacientes que pueden acceder a la formación de una neovejiga, reduciendo al mínimo los cambios en la calidad de vida, sin embargo no se llega a proporcionar un sustituto equivalente para la vejiga original [92] [93].

Solamente en casos excepcionales se aplica un tratamiento conservador, con la máxima RTU del tumor seguido por un tratamiento de quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, el éxito de esta terapia depende de una adecuada selección del paciente, que incluye otros parámetros, tumores invasores de tamaño reducido que no comprometan órganos adyacentes.

En base a esto, es clara la necesidad de identificar nuevos marcadores que permitan subestadificar pacientes con mayor riesgo de recidivar y progresar hacia la invasión y la metástasis. Esto permitirá diseñar terapias más adecuadas en los inicios de

la enfermedad, de manera de proporcionar mayor probabilidad de curación. Al mismo tiempo, la identificación de marcadores de seguimiento que permitan identificar rápidamente y en forma no invasiva la reaparición tumoral es un desafío importante en el tratamiento de esta enfermedad.

2.6 Marcadores de pronóstico, diagnóstico y seguimiento en cáncer de vejiga

Durante décadas y aún en la actualidad, la cistoscopia, ha sido una herramienta fundamental en la detección y vigilancia del CaV, ya que posee una alta sensibilidad, a pesar de ser una técnica sumamente invasiva. Sin embargo, tumores pequeños o el carcinoma *in situ* pueden pasar inadvertidos bajo la cistoscopia estándar [94].

La citología de orina, es el análisis no invasivo más ampliamente utilizado que detecta con buena especificidad y sensibilidad tumores de alto grado. Sin embargo, carece de sensibilidad para tumores de bajo grado [95], y tiene un retardo en la disponibilidad del resultado. Numerosos marcadores urinarios han sido ya investigados con el objetivo de reducir la frecuencia de las cistoscopias [96]. Varios se encuentran disponibles comercialmente, pero ninguno de ellos ha sido adoptado en la rutina estándar de atención al paciente, debido a la poca sensibilidad y/o a su costo. Estos factores hacen necesario el desarrollo de ensayos relativamente no invasivos, rentables y con sensibilidad y especificidad equivalente o mejorados en comparación con las herramientas actuales.

Es así que en la última década se han descrito numerosos marcadores potenciales, que aún se encuentran bajo investigación, y pocos se han validado para el uso en la clínica.

En el año 2005, la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA) aprobó el uso de la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), que puede ser utilizada para detectar células urinarias que presentan anomalías cromosómicas consistentes con un diagnóstico de CaV. Debido a que este método se

basa en anomalías cromosómicas y no en morfología celular, permite una mejor discriminación de células malignas, a partir de cambios celulares asociados con procesos inflamatorios. En la mayoría de los estudios comparativos realizados, esta técnica superó a la citología en todas las fases y grados de CaV, detectando aneuploidias en los cromosomas 3, 7, y 9p21 [97-100]. Sin embargo, hay una alta tasa de falsos positivos y el ensayo es caro, por lo tanto, resultados de FISH se pueden utilizar principalmente cuando los resultados de citología de la orina no son concluyentes. Asimismo, estudios recientes demostraron que la utilización de FISH resulta útil para identificar pacientes con riesgo de recurrencia y progresión tumoral durante la inmunoterapia con BCG, o quimioterapia intravesical [101, 102]. Esta información podría ser utilizada para orientar a los pacientes sobre las estrategias de tratamiento alternativas.

La proteína del aparato mitótico nuclear (NMP2), es otro marcador que se ha estudiado como posible marcador de presencia tumoral, en orina. Se demostró que el uso combinado de cistoscopia y NMP22 mejora los resultados [103]. Sin embargo, el uso de NMP22 no ayudó a tomar decisiones clínicas en pacientes con bajo riesgo de progresión, pero resultó útil en pacientes con alto riesgo de progresión [104].

El uso de ensayos inmunocromatográficos o por ELISA para detectar el Factor H de Complemento Humano (BTA), también fueron aprobados por la FDA como ensayos de diagnóstico y seguimiento del CaV debido a su alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, al igual que los métodos mencionados previamente, también genera falsos positivos, en presencia de cistitis, u orina altamente concentrada [105].

Han sido de utilidad, también, los diagnósticos inmunohistoquímicos en las piezas tumorales. Se han propuesto algunos marcadores tisulares tales como Catepsina B [106], p53, ki67 [107] y E-cadherina [108] entre otros. Sin embargo en la actualidad ninguno de ellos se utiliza en la práctica cotidiana, ya que los marcadores individuales no han mostrado tener un poder de diagnóstico suficiente para reemplazar las estrategias actuales.

3. ÓXIDO NÍTRICO

3.1 Generalidades

El NO es un radical libre de corta vida media. Desde su descubrimiento en el cuerpo humano como el factor de relajación derivado del endotelio, en el año 1987 por Ignarro et al, hasta el momento, el NO se ha convertido en un jugador importante en numerosas vías de transducción de señales. Éste ejerce su acción de mediador fisiológico en los distintos sistemas orgánicos, pero también realiza, directamente o a través de alguno de los metabolitos intermediarios como el peroxinitrito, su acción sobre la respiración mitocondrial produciendo la muerte celular, mecanismo inespecífico de defensa contra huésped.

La historia del NO es muy antigua, ya que en realidad el compuesto químico NO fue identificado a comienzos del siglo XVII por Van Helmont. Más tarde, a finales del siglo XVII Priestley estudió sus propiedades, y recién en 1964, Blanchard logró sintetizarlo.

En 1980 Furchgott e Ignarro, identificaron un “factor relajante del endotelio”, producido por las células, que participa en el mantenimiento del tono muscular de los vasos sanguíneos, y por lo tanto de la regulación de la presión sanguínea. Años después se demostró que este factor era el NO y se identificó el modo en que las células lo sintetizan a partir del aminoácido L-arginina. A partir de ese momento, el interés por el NO creció de modo exponencial, así como el reconocimiento científico a sus descubridores. En 1990 se concedió el Premio Príncipe de Asturias a la Investigación Científica y Técnica al científico hondureño Salvador Moncada por los trabajos que demostraron que el factor endotelial era en realidad el NO.

Se han desarrollado muchas hipótesis acerca del papel del NO, algunas de las cuales todavía se discuten y otras ya están establecidas. La primera, se refiere a que el sistema cardiovascular está activamente dilatado por una liberación constante de NO. Además de ser vasodilatador, es un inhibidor importante de la agregación plaquetaria, y de la proliferación celular del músculo liso, convirtiéndolo en un regulador homeostático de la pared vascular. Por otro lado, hoy en día se sabe también que el NO participa en

funciones diversas tales como la defensa ante microorganismos y es un importante mensajero celular del sistema nervioso central.

A pesar que hay precursores para la producción de NO derivados de la dieta, como nitrato y el nitrito ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$), es principalmente sintetizado enzimáticamente, por una familia de enzimas denominadas NO sintasas (NOS), utilizando L-arginina y oxígeno como sustrato. Se conocen tres isoformas codificadas por tres diferentes genes. La NOS neuronal (nNOS), inicialmente descubierta en cerebro, la NOS inducible (iNOS), expresada principalmente en células del sistema inmune y la NOS endotelial (eNOS), expresada fundamentalmente en el endotelio vascular. Las isoformas nNOS y eNOS son de expresión constitutiva, dependientes de calcio y generan bajas concentraciones de NO (en el orden de nanomoles), mientras que la expresión de iNOS se encuentra inducida por estímulos inflamatorios, tales como IFN γ , TNF α y lipopolisacárido bacteriano (LPS). A diferencia de las otras isoformas, iNOS puede generar altos niveles de NO (del orden de micromoles) durante periodos de tiempo relativamente cortos [109]. La isoforma inducible puede expresarse en varios tipos celulares de mamíferos, tales como macrófagos, células endoteliales e inclusive, en células tumorales.

Todas las isoformas de NOS utilizan L-arginina como sustrato, oxígeno molecular y NADPH como co-sustratos, originando NO y L-citrulina y NADP (**Figura 7**).

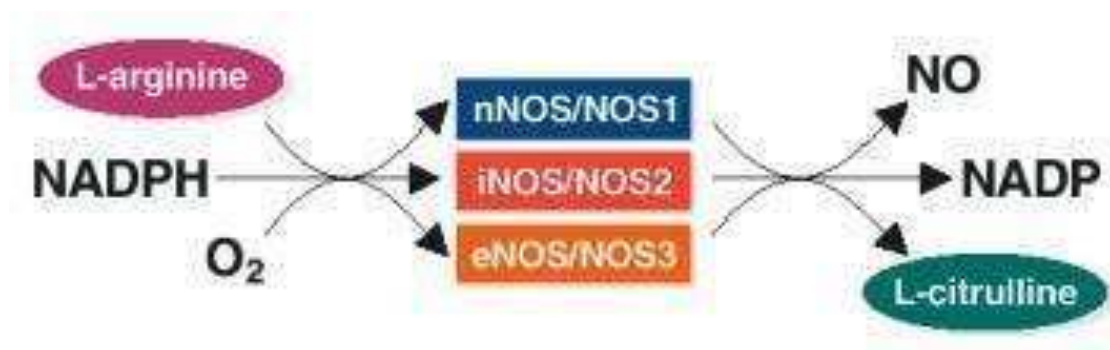


Figura 7 : Esquema de la síntesis de NO por las óxido nítrico sintasas

Debido a su corta vida media, su naturaleza lipofílica y su bajo peso molecular, el NO atraviesa rápidamente las membranas biológicas, ejerciendo sus efectos en la célula

donde es producido y en células vecinas. Los efectos biológicos del NO dependen entonces del tipo celular, de la actividad de la enzima que lo sintetiza y de su sitio de síntesis. Bajo condiciones fisiológicas normales, las células producen bajos, pero significantes niveles de NO, que contribuyen a la regulación de efectos anti-inflamatorios y anti-oxidantes.

Está demostrado que el NO puede ejercer efectos bifuncionales en la supervivencia celular. Generalmente, a altas concentraciones se lo considera citotóxico, mientras que a concentraciones relativamente bajas puede promover la supervivencia celular. A bajos niveles, el NO reacciona con los iones metálicos de los grupos hemo de las enzimas guanilato ciclasa soluble, citocromo C oxidasa, citocromo P450 y las misma NOS. Mientras que a concentraciones más altas, el NO se combina con otras especies oxidantes para formar las especies reactivas del nitrógeno (RNS), que pueden dañar una variedad de blancos celulares incluyendo al ADN y a proteínas, y en última instancia inducir mutagénesis y/o llevar a la apoptosis celular.

La mayoría de los efectos biológicos del NO son mediados a través de vías de señalización celular. Muchas publicaciones han demostrado que el NO modula directamente las vías de Janus Kinasas (Jaks), a la familia de transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs) y la vía de fosfatidil 3-Kinasa (PI3K), desencadenando, luego la activación de numerosos factores de transcripción, alterando la expresión de innumerables genes [110-112].

3.2 Óxido nítrico en la biología tumoral

En la biología tumoral, el NO tiene un rol controversial, ya que hay evidencias que puede tanto inhibir como estimular el crecimiento de células tumorales. Esta respuesta es dependiente del tipo tumoral, la carga genética, los niveles de NO y de la susceptibilidad de las células blanco [59]. El NO puede actuar como un mensajero intracelular, o como un agente citotóxico o mutagénico dependiendo de las concentraciones y del microambiente celular. Así el NO puede ser carcinogénico mediante la generación de compuestos como son las nitrosaminas y por la producción

de alteraciones en el DNA originadas por radicales libres del nitrógeno. También es uno de los mediadores de la inflamación crónica estrechamente relacionada con la generación de tumores. Por otro lado, puede mantener o incrementar el crecimiento de tumores ya establecidos a tres niveles: a) el NO es uno de los mediadores del proceso angiogénico que permite el crecimiento de tumores debido al aporte de nutrientes y oxígeno, b) puede funcionar como un factor de supervivencia para ciertas células tumorales y c) regular negativamente la respuesta inmune hacia el tumor. Estas propiedades que dependen tanto de la concentración como del microambiente le han adjudicado al NO un rol controvertido en la biología tumoral, describiéndose tanto actividad anti-tumoral como pro-tumoral [113, 114].

Desde la década del 90 hasta esta parte, hay innumerables publicaciones que revelan el rol dual del NO en la biología tumoral. Se ha reportado que el NO puede inducir de manera directa la proliferación de las células tumorales activando cascadas de fosforilación mediadas por MAPK, la migración e invasión induciendo la expresión de MMPs y de manera indirecta, a través de la expresión de factores angiogénicos, como VEGF [115-117]. Por otro lado, puede inducir daños a nivel del DNA, inhibición de enzimas reparadoras del DNA, mutaciones genéticas, generalmente en el gen que codifica para el supresor de tumor p53, muerte celular y consecuente regresión tumoral e inhibición de formación de metástasis. Sin embargo, la constante exposición a moderados niveles de NO puede producir resistencia al NO, contribuyendo a la selección clonal y a la adquisición de resistencia al NO, y consecuentemente promoviendo la progresión tumoral [118-120] (**Figura 8**).

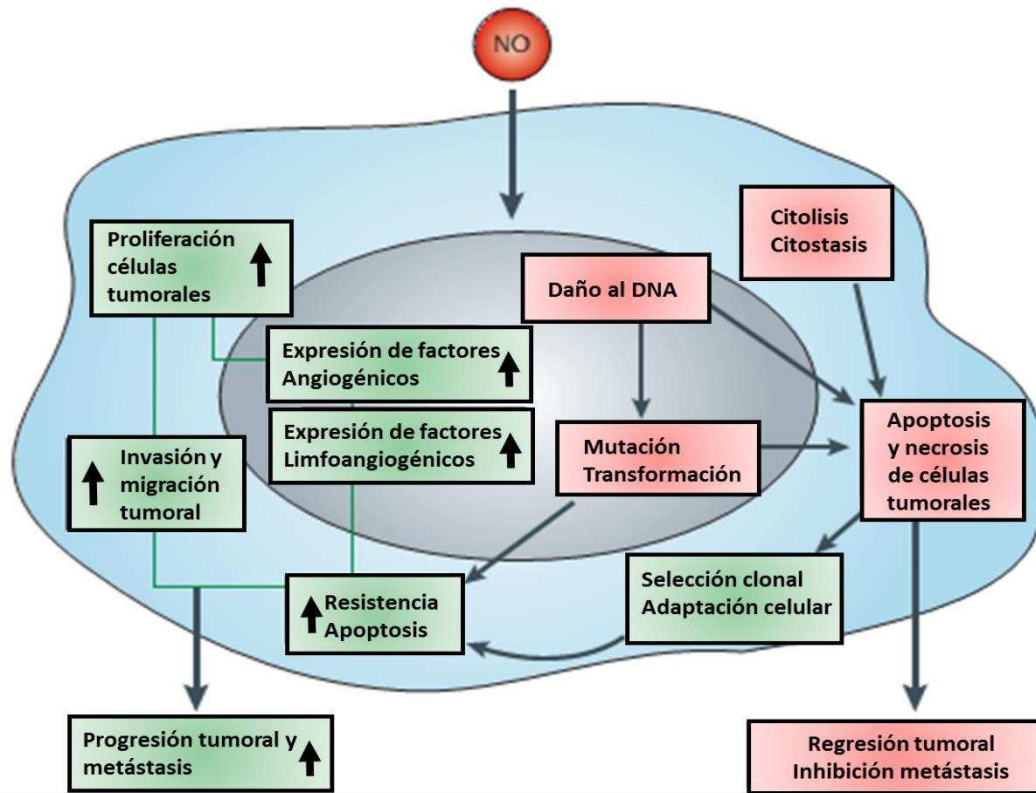


Figura 8: Mecanismo de acción del NO en células tumorales. El NO puede inducir progresión (verde) y regresión tumoral (rojo) dependiendo de las dosis y el tiempo de duración de la exposición y a la sensibilidad de las células al NO. Adaptado de Fukumura, D Nat Rev Cancer, 2006 [2].

3.2.1. iNOS en la biología tumoral

Dado que la presencia de las 3 isoformas de NOS en la células, son un reflejo de los niveles de NO producidos, numerosos informes han demostrado que la relación entre el NO y el crecimiento tumoral está ligado a ciertas características determinantes. Entre dichas características, se destacan que las tres isoformas presentan diferentes patrones de expresión dependiendo del tipo celular, distintos niveles de producción de NO,

incluyendo la duración de dichos niveles y las interacciones químicas de este producto con las células [121].

Como se mencionó anteriormente, iNOS se distingue del resto de las isoformas, ya que genera niveles mayores de NO, y es expresada luego de estímulos inflamatorios en distintos tipos celulares, incluyendo células epiteliales, mesenquimales y mieloides, modulando importantes sucesos relacionados con procesos tumorales, tales como la transformación maligna, angiogénesis y metástasis [122, 123].

La expresión aberrante de iNOS ha sido documentada en diferentes tumores humanos, incluyendo cabeza y cuello, mama, colon, estómago y cáncer de pulmón, entre otros [124-127]. Numerosos autores reportaron que su alta expresión se encontraba asociada a una menor supervivencia en pacientes con tumores de mama, pulmón, cabeza y cuello y colorectales [128-130]. Sin embargo, otros autores afirmaron que altos niveles de NO y la alta expresión de iNOS podían revertir propiedades invasoras y la generación de metástasis en tumores de próstata y melanoma entre otros [131], convirtiéndolo en un buen blanco terapéutico en ambos casos. Antecedentes previos de nuestro laboratorio demuestran que el NO es letal para células murinas de cáncer de mama que no lo producen, mientras que por el contrario, las células tumorales con capacidad de producirlo, son resistentes a la injuria por un generador de NO [132].

Por otro lado, se ha observado que las células del endotelio vesical pueden producir NO luego del tratamiento con la inmunoterapia con BCG, lo cual llevó a postular que era éste radical el que mediaba la muerte de las células tumorales [133]. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que iNOS no se expresa en la vejiga normal pero sí lo hace en el 50% de los pacientes con CaV, detectándose tanto en el tumor como en tejido vesical no tumoral [134]. Observamos que el 80% de los pacientes con CaV cuyos tumores expresaban iNOS presentaban recurrencia dentro de los 12 meses post-tratamiento, mientras que solo el 20% de los pacientes que no expresaban la enzima recurrían en ese mismo lapso de tiempo [80]. Identificamos que la expresión de iNOS y la producción de NO no sólo se relacionaban con una recaída temprana, sino también con un mayor grado de invasión [135]. Estos resultados nos llevaron a postular que la expresión de esta enzima es un factor de mal pronóstico para pacientes con CaV [80]. Posteriormente, otros autores señalaron que pacientes cuyos tumores de vejiga

expresaban iNOS, eran refractarios al tratamiento con BCG, reforzando la idea de que el NO en el CaV favorece el crecimiento tumoral o por lo menos se opone a la inmunoterapia [136]. Estos resultados ponen en evidencia que iNOS y el NO estarían involucrados en la progresión y/o recurrencia del CaV, y que la inhibición de la actividad de iNOS sería un novedoso blanco terapéutico.

3.3 Óxido nítrico, progresión y estroma tumoral

Está ampliamente descrito que así como el NO se encuentra asociado con tumores, se asocia también con el microambiente tumoral, que involucra células del tejido vascular y células del estroma. Existe una interacción dinámica entre las células tumorales y las del estroma, que va cambiando de acuerdo al cambio de condiciones.

En algunos tumores humanos, además de observarse expresión de iNOS en el tumor, se observó también en fibroblastos y en células del sistema inmune. Algunos autores reportaron que macrófagos asociados a tumores que expresaban iNOS o fibroblastos asociados, presentaron actividad anti tumoral [137] [138] [139]. Wei *et al* demostró también que las células del estroma pueden producir NO, y que las mismas pueden ejercer un rol pro o anti tumoral frente al tumor primario [140].

El NO puede contribuir a la progresión tumoral y a la metástasis manteniendo el flujo sanguíneo hacia el tumor y por ende contribuyendo a la formación de neovasculatura y la dilatación vascular.

Asimismo, el NO induce una hiperpermeabilidad vascular que contribuye a la formación de matriz extracelular y al aumento de angiogénesis hacia el tumor. Por otro lado, contribuye a la disminución de la adhesión leucocitaria y a la consecuente evasión tumoral del sistema inmune. En contraposición, los efectos citotóxicos del NO podrían producir la reducción de numerosos factores de crecimiento en células estromales no neoplásicas, contribuyendo a la regresión tumoral (**Figura 9**) [2].

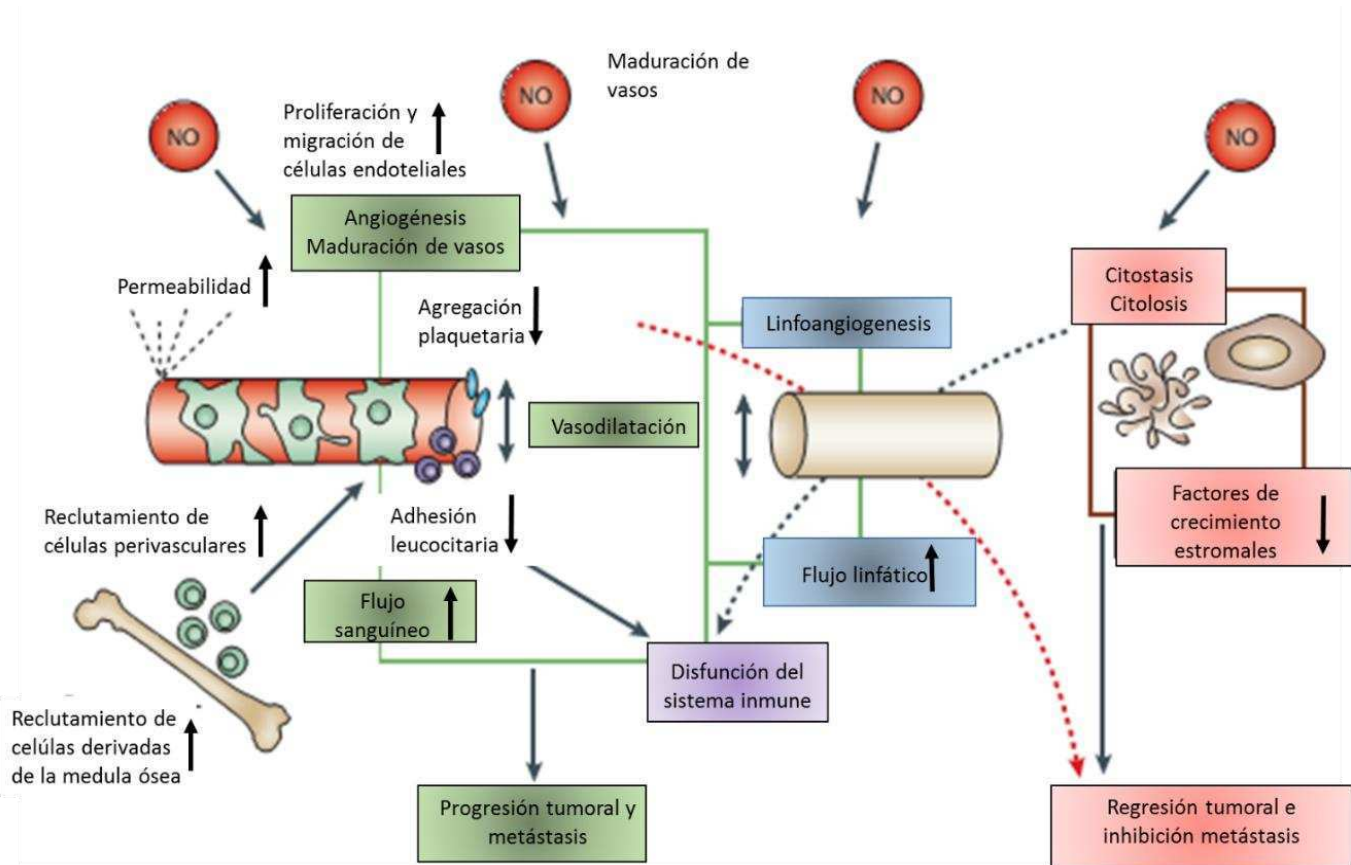


Figura 9: Mecanismo de acción del NO en células del hospedador: El NO promueve la progresión y la metástasis (cuadrados verdes) manteniendo el flujo sanguíneo a través de la angiogénesis, la maduración y dilatación de vasos. El NO induce la proliferación de las células endoteliales y la migración, y el reclutamiento de células perivasculares y de la medula ósea. La inducción de la hiperpermeabilidad por el NO, contribuye a la formación de matriz extracelular y al aumento de la angiogénesis y del crecimiento tumoral. Asimismo, disminuye la adhesión leucocitaria y los efectos citotóxicos del NO podrían permitir la evasión del tumor al sistema inmune. La linfoangiogénesis y el mantenimiento del flujo sanguíneo también podrían contribuir a la metástasis linfática. Por otro lado, los efectos citotóxicos del NO (cuadrados rojos) reducen los niveles de algunos factores de crecimiento que son derivados de células estromales no neoplásicas y podrían resultar en una regresión tumoral. Dado que la agregación plaquetaria contribuye a la metástasis, su reducción por el NO podría inhibir la metástasis. Adaptado de Fukumura, D Nat Rev Cancer, 2006 [2]

3.4 Rol de NO en la angiogénesis tumoral

Se ha demostrado que el NO puede mediar el proceso de angiogénesis, ya sea por mecanismos directos o indirectos (**Figura 9**). En primer lugar, aumentando la proliferación y migración de células endoteliales a través de la vía cGMP o a través de la S-nitrosilación de ciertas proteínas target. En segundo lugar, se ha demostrado que el NO puede mediar la función de muchos factores angiogénicos, [114] [141], a través de la inducción de eNOS que promueve expresión de VEGF, y angiopoyetinas. Numerosos reportes muestran una alta expresión de eNOS en la vasculatura de varios tumores humanos, cuando se lo compara con muestras de tejido normal, asociado a un aumento en la angiogénesis tumoral y la alta permeabilidad vascular.

En la década del 90, comenzaron a aparecer las primeras publicaciones proporcionando las primeras evidencias de la contribución del NO en el crecimiento tumoral. Numerosos autores comenzaron a realizar ensayos preclínicos utilizando inhibidores farmacológicos de las NOS, para el tratamiento de tumores, evidenciando reducción del crecimiento tumoral y aparición de metástasis espontáneas, en modelos animales de adenocarcinoma mamario y de colon [142-144]. La inhibición del crecimiento tumoral, restringiendo la vasculatura tumoral, utilizando inhibidores NOS, llevó a investigadores a pensar que el NO estaba involucrado en la progresión tumoral [115, 143-146]. Algunos autores, sugirieron que la expresión de iNOS por las células endoteliales de la neovasculatura, promovía angiogénesis, el flujo sanguíneo en la vasculatura y por ende, la sustentación de nutrientes al tumor. Esta sugerencia fue reforzada por otros investigadores y validada por Jenkins, quien demostró la asociación entre la expresión de iNOS y el aumento de la neovasculatura en un modelo de adenocarcinoma de colon [147].

En tercer lugar, se ha reportado que elevados niveles de NO producidos por un tumor, pueden resultar en una sobreexpresión de VEGF, asociado a un peor pronóstico y a un potencial metastásico [148, 149].

Estas evidencias demuestran, entonces que el NO cumple un rol importante en la angiogénesis y la progresión tumoral.

4. MODELO MURINO DE 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. Los tumores están formados por varias poblaciones celulares no tumorales y tumorales, con diferentes grados de agresividad que interactúan entre sí para dar 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.

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 en el tiempo. Sin embargo, la inoculación ortotópica es la que permite evaluar más correctamente las interacciones huésped-tumor. El modelo xenográfico si bien imitaría la patología humana ya que involucra la implantación de células tumorales humanas, la mayoría derivada de pacientes, en animales inmunodeficientes [150] no representa la realidad ya que las interacciones entre célula y el microambiente no es asemejable a tumores provenientes de otras especies. Otras opciones son modelos animales singéneos y dentro de estos los transgénicos. Dentro de los grupos de modelos singéneos se incluyen los químicamente inducidos. Los tres más comúnmente usados son N-butil-(4-hidroxibutil) nitrosamina (BBN), el N-[4-(5nitro-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 [11]. Este tipo de modelos facilita la investigación en defectos genéticos particulares durante la carcinogénesis pero requieren la presencia de promotores artificiales y son muy costosos.

En nuestro laboratorio contamos con un modelo de cáncer de vejiga que asemeja a la patología humana, y resulta de gran utilidad para estudiar mecanismos relacionados con la progresión tumoral. Este modelo cuenta con las líneas de CaV murinas MB49, obtenida a partir de una transformación neoplásica in vitro de cultivos primarios de epitelio de vejiga murina inducida con el carcinógeno 7,12-dimethylbenz[a]anthraceno [151] y la línea MB49-I, originada a partir de la línea MB49 luego de 13 trasplantes subcutáneos sucesivos en ratones singeneicos C57BL/6j. Cuando se las inocular de manera subcutánea u ortotópica en la vejiga de ratones, las mismas generan tumores NMI e invasores respectivamente. Se demostró que mientras iNOS no se expresa en el urotelio de la vejiga normal, si se expresa en citoplasma de las células tumorales de tumores MB49, sin haber expresión en el urotelio adyacente. Mientras que los tumores invasores MB49-I presentaron mayor expresión de la enzima a nivel citoplasmático y nuclear, tanto a nivel de las células tumorales como en el urotelio adyacente (**Figura 10**). A pesar de que la expresión de iNOS está descrita como de localización citoplasmática, los núcleos de las células tumorales invasoras presentaron también expresión nuclear.

Pudimos evidenciar esto mismo analizando tumores humanos, donde observamos que los tumores NMI presentaron una leve expresión de la enzima, mientras que todos los tumores músculo invasores presentaron una intensa expresión de iNOS, y que la misma se correlacionaba con el grado de histológico de esos tumores.

La similitud del modelo murino, con lo que ocurre en la patología humana lo convierte en una herramienta útil para estudiar mecanismos involucrados en la progresión tumoral y para identificar posibles blancos terapéuticos, en particular los vinculados con la expresión de iNOS y la producción de NO.

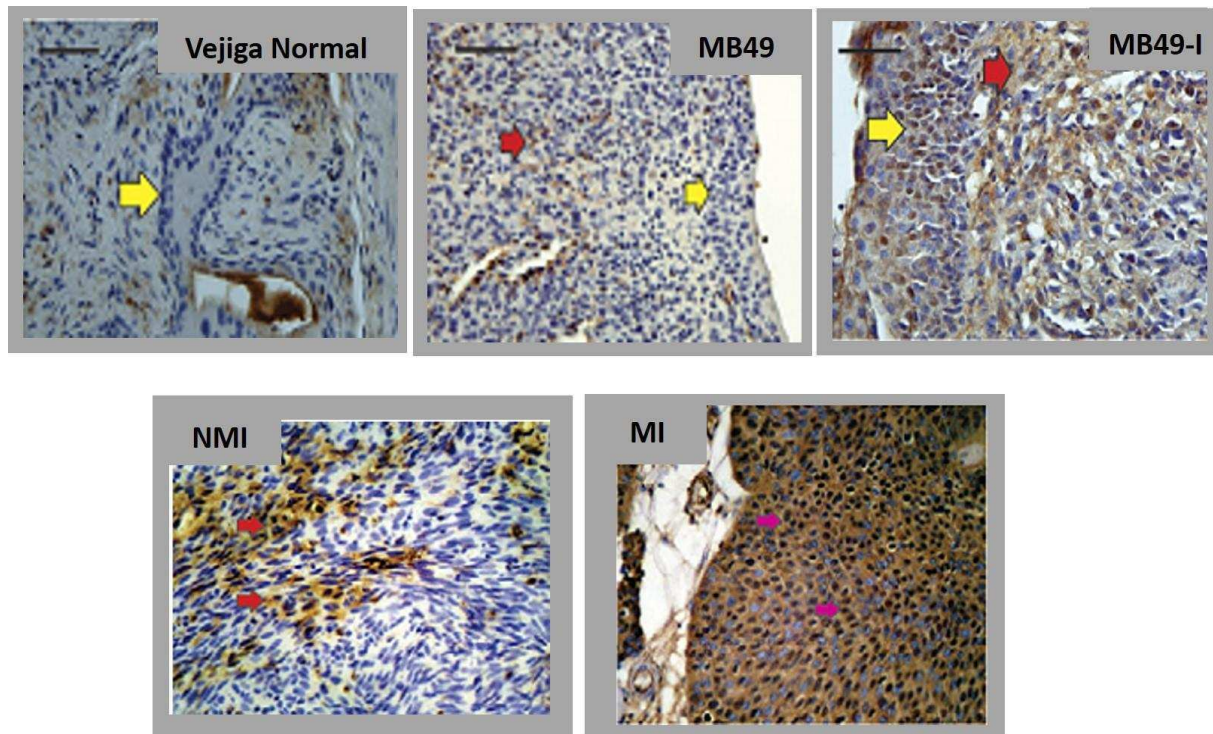


Figura 10: Expresión de iNOS en la vejiga de ratones normales, portadores de tumor ortotópico MB49 o MB49-I y tumores humanos NMI y músculo invasores por inmunohistoquímica. El urotelio normal de ratones no expresa iNOS (flecha amarilla); expresión citoplasmática en células tumorales de ratones portadores de tumor MB49 (flecha roja), y expresión negativa en el urotelio adyacente (flecha amarilla); intensa expresión a nivel citoplasmático y nuclear en tumores y urotelio de ratones portadores de tumor MB49-I (flechas rojas). En el caso de los tumores humanos, la inmunohistoquímica revela una marcación citoplasmática en los tumores NMI (flecha roja) y una intensa marcación nuclear y citoplasmática en el caso de los tumores invasores (flecha violeta). Adaptado de Sandes E J. Urology, 2012 [135].

En el presente trabajo se utilizará además de la línea no invasora MB49 y la invasora MB49-I (ambas productoras de NO), la línea de CaV MBT2, que genera tumores de vejiga en ratones C3H y no produce NO.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

El rol de NO en la progresión del CaV ha sido poco estudiado. Trabajos de nuestro laboratorio en pacientes, han demostrado que mientras iNOS no se expresa en el urotelio vesical de individuos sanos, es detectada en aproximadamente el 50% de los tumores de vejiga. La enzima se detecta tanto en el tumor como en zonas de epitelio vesical que no presentan evidencia histológica de malignización, sugiriendo que la expresión inadecuada de esta enzima estaría vinculada con la carcinogénesis vesical. En pacientes cuyos tumores expresan iNOS, existe una disminución del tiempo libre de enfermedad, comparado con pacientes cuyos tumores no expresan la enzima. Además, se observó que la expresión de iNOS es un factor de mal pronóstico, asociados al estado de invasión y el grado de indiferenciación tumoral en pacientes con CaV. En base a estos antecedentes nuestra hipótesis de trabajo sostiene que la expresión de iNOS y en consecuencia la producción de NO son un factor de mal pronóstico, ya que favorecen el crecimiento de las células tumorales, la invasión, la angiogénesis y el crecimiento metastásico. En consecuencia, la inhibición de la actividad y/o expresión de la enzima revertirá la progresión y crecimiento de tumores de vejiga, siendo así un blanco terapéutico.

2. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente proyecto es estudiar el rol del óxido nítrico y de iNOS en la progresión del cáncer de vejiga y su modulación como posible blanco terapéutico.

3. OBJETIVOS ESPECIFICOS

3.1 Estudios *in vitro*

- ❖ Investigar los efectos de inhibidores farmacológicos de la producción de NO sobre la proliferación y migración de líneas de cáncer de vejiga murino con diferente grado de expresión de iNOS.
- ❖ Analizar las consecuencias de la ablación genética de iNOS, mediante silenciamiento con shRNA, sobre el crecimiento e invasión.
- ❖ Evaluar el rol que cumple el estroma en la progresión de los tumores de vejiga y su modulación luego de la inhibición de la producción de NO.

3.2 Estudios *in vivo*

- ❖ Analizar el efecto de la inhibición de la producción de NO *in vivo*, de manera farmacológica o a través de la ablación genética de iNOS, sobre el desarrollo de tumores, evaluando:
 - El crecimiento tumoral subcutáneo y ortotópico
 - Los niveles de NO en orina de ratones portadores de tumor vesical
 - Propiedades relacionadas con la progresión tumoral como son la angiogénesis, la invasión y la capacidad de generar metástasis.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas Celulares

Las líneas celulares de cáncer de vejiga (MB49, MB49-I, MB49-I-scrambled-Luc, MB49-I-shiNOS-Luc y MBT2) y fibroblastos embrionarios fueron cultivados en medio RPMI 1640 (GIBCO 31800-014) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Internegocios S.A), 2mM de L-glutamina y 80µg/ml de gentamicina (medio completo) en atmosfera humidificada con 5% de CO₂. La línea de fibroblastos NIH3T3 fue cultivada en medio DMEM baja glucosa (GIBCO, Cat # 31600-026) suplementado con 10% de SFB, 2mM de L-glutamina y 80µg/ml de gentamicina en atmosfera humidificada con 5% de CO₂.

La línea celular HEK293, productora de virus, fue cultivada en DMEM alta glucosa (Life technologies, Cat # 11965-092), suplementado con 10% de SFB, 2mM de L-glutamina y 80µg/ml de gentamicina en atmosfera humidificada con 5% de CO₂.

2. Reactivos

N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) (Sigma-Aldrich, Cat # N5751); MTS (Promega, Cat # G11A 22258401); ECL (GE Healthcare, Cat # RPN2106); Bradford (BIO-RAD, Cat # 500-0006); membrana de PVDF para western blot (GE Healthcare, Cat # RPN303F), Inhibidor de proteasas (Calbiochen Cat.# 539134), Kit Luciferasa (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Cat # E1910), Lipofectamina 2000 (Life technologies, Cat # 11668027), Medio de transfección Opti-MEM (GIBCO, Cat # 31985-070), TRizol (Life Technologies, Cat # 15596-018), iScript cDNA Synthesis Kit (BIORAD, Cat # 170-8890), REDExtract-N-Amp PCR Ready Mix (Sigma-Aldrich, Cat # R4775I), 1400w (Cayman Chemical, Cat # 81520), S-Methylisothiurea hemisulfate (SMT) (Sigma-Aldrich, Cat # M84445), QiaAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Cat # 27106), Qiagen Plasmid Mega Kit (Quiagen, Cat # 12183), LB con agar (Sigma-Aldrich, Cat # L2897).

3. Ensayos in vitro

3.1 Evaluación de viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular se emplearon dos técnicas, la determinación de la actividad metabólica mediante un ensayo colorimétrico por MTS y el recuento celular mediante el test de exclusión con azul tripan.

3.1.1 Determinación de la actividad metabólica por MTS

Se sembraron en multiplacas de 96 pocillos 1×10^4 células por pocillo, y al día siguiente, una vez que las células se encontraban en fase de crecimiento exponencial, se incubaron según la condición de cada experimento (detallado más abajo). Se estimó la viabilidad celular a partir de la medición de actividad metabólica mitocondrial por el método de MTS, según las indicaciones de fabricante. Brevemente, las células fueron incubadas con 20 μ l de MTS+ 1 μ l de PMS cada 121 μ l de medio con 5% de SFB a 37 °C, en estufa gaseada durante aproximadamente 45-120 minutos y se midió la densidad óptica en un lector de microplacas (Multiskan Ascent, LabSystem) a 492/620nm. El % de viabilidad se calculó como la razón entre el promedio de los pocillos tratados y el de los controles.

3.1.2 Recuento celular

Las células (líneas tumorales, fibroblastos) fueron sembrados en placas de cultivo de 24 pocillos y fueron tratados según la condición de cada experimento (detallado más abajo). Luego de 24 o 48 hs de tratamiento, las células se levantaron con 200 μ l de tripsina, frenándose dicha reacción agregando 400 μ l de SFB. Las células fueron lavadas con PBS, centrifugadas y resuspendidas en medio sin SFB. Se tomaron 20 μ l de la

suspensión celular y se las diluyó al medio en azul tripan. Se colocó dicha mezcla en una cámara de Neubauer y se procedió a realizar el recuento celular bajo microscopio.

3.2 Estudio de la actividad de inhibidores de la producción de NO sobre el crecimiento de células creciendo en monocapa

Monocapas subconfluentes de células MB49 o MB49-I fueron tratadas durante 24 hs con distintas concentraciones del inhibidor general de las NOS L-NAME (1, 2, 4, 8 mM) o con los inhibidores específicos de iNOS 1400W o SMT (0.6, 1.1, 2.5, 5.0, 10.0 μ M) en medio RPMI1640 con 2% de SFB.

3.3 Estudio de la interacción entre fibroblastos y células tumorales

Se determinó la capacidad de los productos solubles liberado por fibroblastos, de modificar la viabilidad de las células MB49 o MB49-I. Para ello se utilizó medio condicionado (Mc) de fibroblastos embrionarios o de la línea NIH 3T3, previamente tratados o no con L-NAME (2mM), durante 24 hs. El Mc, diluido al medio con RPMI+2%SFB, fue colocado sobre monocapas subconfluentes de células MB49 o MB49-I. Luego de 24hs, se evaluó la viabilidad celular de ambas líneas tumorales.

El efecto de los factores solubles liberados por las células tumorales sobre los fibroblastos, fue evaluada utilizando Mc producido por las células tumorales, tratadas o no con L-NAME (2mM) durante 24hs, colocado sobre monocapas subconfluentes de FB. La viabilidad de los mismos fue evaluada luego de 24 hs de contacto con los Mc correspondientes.

3.4 Preparación de medios condicionados

Para obtener Mc tanto de células tumorales como de FB se procedió de igual forma. Células creciendo en monocapa con 80% de confluencia fueron tratadas con medio con o sin L-NAME (2mM) en ausencia de SFB. A las 24hs, el medio es removido, y diluido al medio con RPMI al 2% de SFB, para su utilización.

3.5 Evaluación de la producción de óxido nítrico

Para determinar los niveles de NO se cuantificó nitrito (NO_2^-), principal producto generado por el NO en solución acuosa. El NO difunde fuera de la célula, se transforma en NO_2^- y puede medirse con el reactivo de Griess. De esta manera, se puede obtener una manera indirecta, pero sencilla una estimación de la presencia de NO en el cultivo celular. El reactivo de Griess consta de dos soluciones: A) 1% de ácido sulfanílico y 30% de ácido acético en agua y B) 0.1% N-(1-Naftil)-etilendiamina y 60% de ácido acético en agua. Se mezclan 50 μl de A con 50 μl de B con 100 μl de la muestra. La densidad óptica fue medida en un lector de microplacas (Multiskan Ascent, LabSystem) a 520/620nm, y los niveles de NO_2^- fueron determinados utilizando una curva standard construida con diferentes concentraciones de NaNO_2 . Esta técnica es utilizada para medir NO_2^- tanto en medio condicionado de células bajo diferentes condiciones experimentales como para determinarlo en la orina de ratones portadores de tumor.

3.6 Preparación de extractos proteicos para Western-blot

Se sembraron 1×10^4 células/ml (MB49/ MB49-I/ MBT2/ MB49-I-scr-Luc, MB49-I-shiNOS-Luc) en placas p100, en medio suplementado con 10% SFB. Las monocapas, fueron tratadas con L-NAME (2mM) Luego del tratamiento, las monocapas celulares fueron lavadas con PBS frío, y luego levantadas con 100 μl de buffer de lisis (50mM Tris-HCl (pH 8.0); 100mM NaCl; 1% Tritón y 10mM EDTA + 1:1000 inhibidor de proteasas) e

incubadas a 4°C durante 40 min. Luego las muestras fueron sonicadas con dos pulsos del 50% de máxima potencia, con el sonicador Misonix, y los lisados fueron centrifugados a 4°C a una velocidad de 13.000rpm (Thermo Scientific Sorvall Legend Micro 17R) durante 10 minutos. Las proteínas fueron recogidas de la fracción soluble, y la concentración de las mismas fue evaluada con el reactivo de Bradford. Luego, las muestras fueron alicuotadas y conservadas a -20°C hasta su utilización.

3.7 Western Blot

Se sembraron 80ug de proteína en geles de SDS-poliacrilamida de diferentes concentraciones (8, 10 o 15 %) dependiendo del tamaño de la proteína a analizar, y se llevó a cabo la corrida electroforética a 100 volts. Una vez terminada la corrida electroforética, las proteínas en el gel fueron transferidas a una membrana de PVDF (previamente activada con metanol), durante 2hs a corriente constante de 0.3A. Terminada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas durante 1h a temperatura ambiente en buffer (buffer de bloqueo: TBS-Tween 0.1% + 5 % caseína o 5% BSA). Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario específico para cada proteína en buffer bloqueo a 4°C over night (O.N) (**Tabla A**).

Anticuerpo	Fabricante	# Catalogo	Origen	Dilución de uso
iNOS	Ab	Ab-15323	PC	1/500
pERK1/2 (E-4)	SC	sc-7383	MR	1/500
ERK1/2 (C-9)	SC	sc-514302	MN	1/500
VEGF(147)	CS	sc-507	PC	1/200
pAKT1/2/3 (Ser473)-R	SC	sc-7985R	PC	1/200
AKT1/2/3 (H-136)	SC	sc-8312	PC	1/1000
β -Actina	S	A5441	RM	1/5000

TablaA: Anticuerpos utilizados para Westernblot. PC (policlonal, de conejo), MR (monoclonal de ratón). Santa Cruz (SC), Abcam (Ab), Sigma (S).

Al día siguiente, se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-Tween 0.1% a temperatura ambiente, y luego se colocó el anticuerpo secundario en buffer bloqueo durante 1-2 horas, también a temperatura ambiente, Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios policlónales: IgG de cabra anti-ratón (1:5000) (Santa Cruz Biothecnology, Cat # sc-2031) o anti-conejo (Sigma-Chemicon) (1:5000), según corresponda, conjugados con HRP. Las membranas fueron luego incubadas con el reactivo ECL durante 5 minutos, y depositadas en un cassette radiográfico junto con placas radiográficas, exponiendo entre 1 y 60 minutos, dependiendo del anticuerpo primario utilizado. Los valores correspondientes a cada una de las bandas de expresión de proteínas fueron normalizados con valores de β -actina, utilizada como control de siembra y con el tratamiento control.

3.8 Ensayo de gen reportero

Para estudiar la actividad transcripcional de NF-kB o PPAR γ , luego del tratamiento con L-NAME (2mM), se empleó el ensayo de gen reportero. Células MB49 y MB49-I fueron transfectadas de manera transiente con 20 μ g de plásmidos conteniendo el gen de luciferasa bajo el control transcripcional del elemento de respuesta a NF-kB o PPAR γ (NF-kB-luciferasa y PPRE-luciferasa respectivamente) en medio de cultivo Opti-MEM. Como control de transfección se utilizó un plásmido conteniendo el gen Renilla bajo control transcripcional del promotor CMV (Renilla). Se utilizó Lipofectamina 2000, como medio de transfección. La actividad se determinó con el reactivo de luciferasa (Dual-Luciferasa Reporter Assay System), siguiendo las especificaciones del fabricante, con un luminómetro (Hidex Turku, Finland), como cuentas por segundo (cps). El valor de luciferasa se relativizó al de Renilla y se expresó como veces de cambio respecto al control.

3.9 Inmunofluorescencia

Monocapas subconfluentes de células creciendo sobre vidrios se fijaron con formaldehído 4% durante 15 minutos. Luego, las células fueron permeabilizadas con Tritón 0.2% en PBS durante 15 minutos a 37°C, y bloqueadas durante 60 minutos con un buffer 0.1% Tween-20 y 2% SFB en PBS a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados fueron diluidos en buffer bloqueo e incubados O.N a 4°C. Al día siguiente, se hicieron 3 lavados con PBS, de manera de lavar el excedente de anticuerpo primario, y se colocó el anticuerpo secundario en buffer bloqueo. Se realizó la contratinción de los núcleos con DAPI y las células fueron observadas en un microscopio de fluorescencia Eclipse de Nikon E400, y se tomaron fotografías con una cámara digital Nikon Refresca PIX 995.

Como anticuerpos secundarios se utilizaron IgGs de cabra anti-ratón y anti-conejo conjugados con Alexa Fluor 594 y Alexa Fluor 488, respectivamente.

3.10 Extracción de RNA y PCR semi-cuantitativa

Se aisló el RNA total de células MB49 y MB49-I utilizando el reactivo TRizol según las especificaciones del fabricante. El cDNA fue sintetizado utilizando el iScript cDNA Synthesis Kit, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El cDNA se utilizó como templado para la PCR semi-cuantitativa usando la REDEXtract-N-Amp PCR Ready Mix, y las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador (Bioneer). Los oligos específicos de ratón utilizados fueron: iNOS (Forward: 5'-TCAACACCAAGGTTGTCTGC-3', Reverse: 5'-AAGGCCAAACACAGCATACC-3'); GAPDH (Forward: 5'-CCAGAACATCATCCCTGCAT-3', Reverse: 5'-GTTGAGCTCTGGGATGACCTT-3'). La expresión de GAPDH fue utilizada como control de la reacción.

3.11 Determinación de actividad de MMPs y uPA

Con el objetivo de determinar la actividad proteolítica en las células de CaV, se realizó la técnica de zimografía, en geles de poli(acrilamida (10%) copolimerizada con gelatina (0.1%) como sustrato. Muestras de medio condicionado de cada condición experimental, conteniendo igual cantidad de proteínas, llevadas a 10 μ l con el agregado de buffer (SDS 5% (v/v), glicerol 20% (v/v) en Tris-HCl 0.4 M, pH 6,8 conteniendo azul de bromofenol sin 2-mercaptoetanol) fueron sometidos a electroforesis en condiciones no desnaturalizantes a voltaje constante de 100V y durante 2 h a 4 °C. Luego de la corrida electroforetica se realizaron 6 lavados, de 5 minutos cada uno, en TritonX-100 2,5% (v/v) para eliminar el SDS presente y tres lavados, de 10 min, en PBS para eliminar el Triton del lavado anterior. Los geles fueron incubados O.N a 37 ° C con agitación, en una solución de Tris-HCl 50 mM; pH 7.4 conteniendo NaCl 0.15 mM y CaCl₂ 30 mM. La solución fue removida luego de la incubación y el gel fue teñido con Coomassie Brilliant Blue G-250 al 0,5% (p/v) en metanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v) por 45 minutos. El gel fue desteñido con una solución conteniendo metanol 5% (v/v) y ácido acético 7,5% (v/v) hasta que la actividad gelatinolitica fue detectada por la presencia de bandas claras sobre un fondo azul. Todo el proceso de tenido y desteñido fue realizado en agitación a temperatura ambiente. La intensidad de las bandas, correspondiente a la actividad enzimática fue determinada con un Imaging Densitometer GS-700 (Bio-Rad), y analizadas con el programa de densitometría Image J. 1.37v. Los datos fueron cuantificados y la actividad de MMP2/9 se expresó como unidades arbitrarias (UA) cada 1×10^4 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 standard de uroquinasa cuyo rango fue de 0.1 a 10 IU/ml, y los resultados fueron expresados como Unidades Internacionales de Uroquinasa (IU)/ 1×10^4 células.

3.11.1 Preparación de Medios Condicionados (Mc) para determinar actividad enzimática

Monocapas subconfluentes de células MB49 o MB49-I fueron tratadas o no con L-NAME (2mM), como se describió previamente. En este caso, luego de las 24hs con tratamiento, el medio fue retirado y cambiado por medio fresco, sin SFB. Al día siguiente, el Mc de cada condición fue colectado, y centrifugado para eliminar restos celulares, y estandarizados por el número de células. La actividad de MMPs y uPA también fue evaluada en tumores originados por ambas líneas. Las muestras provenientes de tumores subcutáneos, tratados o no con L-NAME (0.5g/L) fueron homogeneizadas en buffer (50 mM Tris-HCl (pH:8); 100 µg/ml NaCl; 1% Triton), mediante dos pulsos de 10 segundos a 70% de la potencia utilizando un equipo Ultra Turrax T25 (Laborotechnik). El contenido proteico fue determinado a través del método de Bradford.

3.12 Ensayo de migración

La evaluación de la migración celular se hizo a través de un ensayo de reparación de heridas in vitro (en inglés “wound healing”). Se realiza una herida de aproximadamente 1mm sobre una monocapa celular con 100% de confluencia. Las células migran en el espacio libre. Para evaluar la migración se tomaron fotografías a tiempo 0 de la herida y durante 18hs (tiempos inferiores al tiempo de duplicación), en un microscopio invertido. La migración se evalúa utilizando el programa Image J 1.37v, determinando el área cubierta, por la diferencia entre el área final y el inicial. Se grafica el área de migración en unidades arbitrarias.

3.13 Silenciamiento de iNOS

Para obtener líneas estables silenciadas para iNOS, con actividad luciferasa, se utilizaron los **plásmidos** descritos a continuación:

- **pGL3 básico:** Es un plásmido que contiene el gen de la luciferasa río arriba el sitio de clonado con varios sitios de corte para enzimas de restricción.

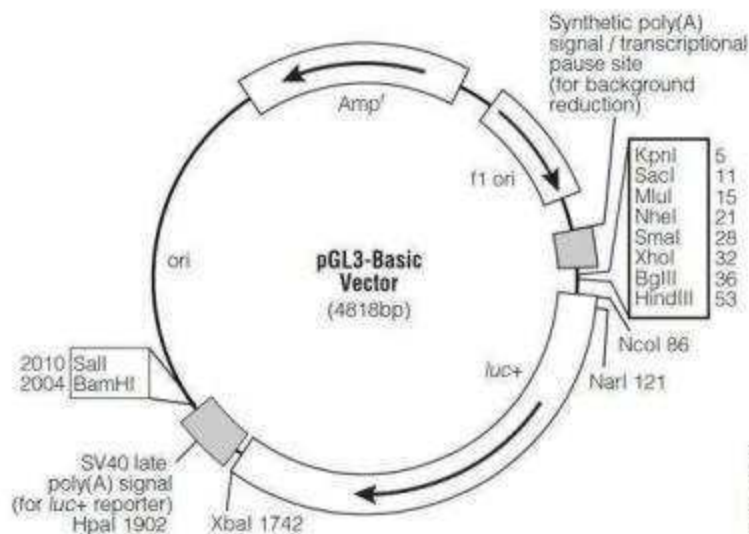


Figura 11: Mapa del plásmido pGL-3-Basic indicando el cDNA que codifica para la luciferasa de luciérnaga (*luc+*), la resistencia para ampicilina (*Amp^r*), el origen de replicación para *E. coli* (*ori*) y el origen de replicación para bacteriófagos.

- **pENTR/H1/TO:** Vector de expresión de shRNA, contiene resistencia a zeocina para mamíferos y resistencia a kanamicina para *E. coli*.

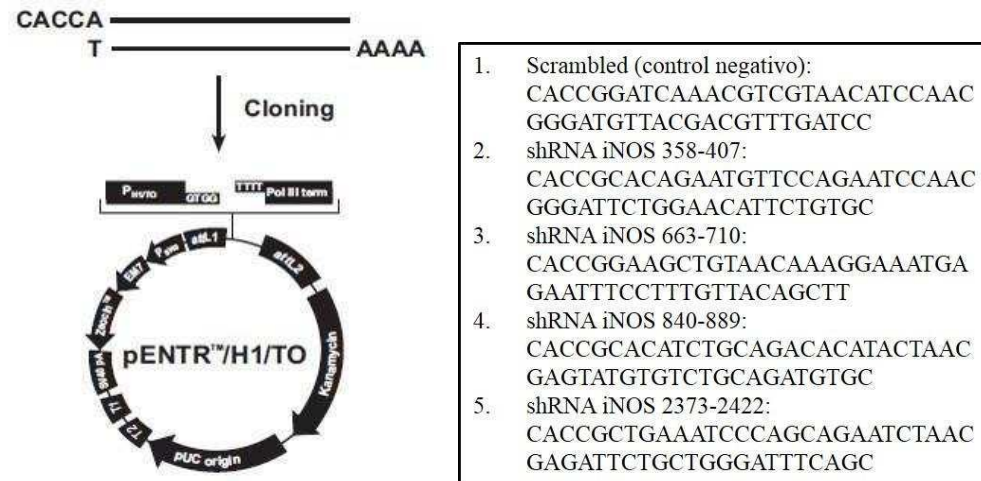


Figura 12: Mapa del plásmido pENTR™/H1/TO, indicando el espacio de secuencia de clonado insertado, con las diferentes secuencias de shRNA iNOS utilizados y el scrambled, el respectivo control negativo. Presenta resistencia a antibióticos para su selección en bacterias y en células eucariotas.

3.13.1 Preparación de bacterias competentes

Para la transformación de bacterias con plásmidos, en primer lugar se prepararon bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α competentes. Para ellos se inocularon 10 ml de medio de cultivo LB sin ampicilina (peptona 1% m/V; extracto de levadura 0.5 %m/V y NaCl 1% m/V pH: 7,5) con dicha cepa de bacterias y se las incubó a 37°C, durante 16h en constante agitación. Luego, se agregó 40 ml de medio LB con 2 ml del cultivo y se dejó en agitación durante 2h a 37°C (hasta densidad óptica de 0.4-0.5 a 600nm). El cultivo se centrifugó a 3000 rpm, a 4°C durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 16 ml de CaCl 250 mM frío, se incubó 15 min en hielo y se centrifugó 2 min a 3000 rpm a 4°C. Nuevamente, se resuspendió el pellet en 2 ml de CaCl 250 mM con glicerol 15 %.

Las bacterias competentes obtenidas se alicuotaron y se guardaron a -80°C.

3.13.2 Obtención del vector de shRNA

Utilizando un buffer Annealing (Life technologies) se produjo la reacción de annealing de los 5 oligos especificados en el punto anterior, a 95°C durante 4 min, de

manera de obtener oligos doble cadena (ds). Luego se dejó enfriar la reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos. Pasado este tiempo las muestras fueron centrifugadas brevemente, y se tomó una alícuota del annealing para verificar la integridad doble cadena en un gel de agarosa 4%.

Una vez obtenidos los oligos ds, los mismos fueron ligados a el vector pENTR™/H1/TO, en presencia de un buffer de ligación (Life Technologies) y T4 DNA ligasa (Life Technologies), durante 5 min a temperatura ambiente, según las especificaciones del fabricante. Luego, las bacterias *Escherichia Coli* competentes fueron transformadas, en hielo durante 30 min. Luego, se realizó un shock térmico de las bacterias durante 30 segundos a 42°C, sin agitación y se las depositó nuevamente en hielo. Se agregó el medio SOC (20gr Triptona, 5gr Extracto de levadura, 2ml NaCl 5M, 2,5ml KCl 1M, 10 ml MgCl₂ 1M, 10 ml MgSO₄ 1M y 20 ml glucosa 1M, en 1L de agua destilada), y se incubó la suspensión de bacterias a 37°C durante 1 hora en agitación. Finalizado este tiempo, se rastrillaron las bacterias transformadas en placas conteniendo LB, solidificado con 100 µg/ml de Ampicilina, y se las dejó O.N a 37°C. Al día siguiente se picaron con un tip 5 colonias por reacción, y se las amplificó en medio LB líquido + 100 µg/ml ampicilina en agitación durante toda la noche, a 37°C.

3.13.3 Aislamiento del DNA plasmidico

Luego de dejar amplificando las bacterias transformadas, se las centrifugó a 6.000g durante 15 min a 4°C. El pellet se resuspendió en buffer P1 (6.06g de Tris Base; 3.72g de Na₂-EDTA-2H₂O; pH 8, volumen final 1L; 100 µg/ml de RNasa A) para lisar las bacterias. Se agregó buffer P2 (8 g de NaOH en un volumen final de 1L, conteniendo 20% de SDS) durante 5 min para desnaturalizar el DNA y luego en buffer P3 (294,5 g de acetato de potasio en un volumen final de 1 L, ajustando el pH a 5,5 con ácido acético glacial) para re naturalizarlo. Este método se basa en que debido a las diferencias de tamaño del DNA cromosómico y del plásmidico, este ultimo de menor tamaño, será el único capaz de re naturalizar. Por lo tanto, se incubo en hielo durante 20 min para favorecer su renaturalizacion y se procedió a centrifugar a 20.000g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se volvió a centrifugar durante 15 min y luego se precipito el DNA con

0,7 volúmenes de isopropanol, y se centrifugó a 15.000 g durante 30 min a 4°C. El pellet fue lavado con etanol 70% y se centrifugo nuevamente a 15.000 g durante 10 min a 4°C. Se dejó secar y el pellet se redisolvió en buffer TE (Tris HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8). El plásmido aislado se cuantifico por medición de la absorbancia a 260 nm en nanodrop (Nanodrop 3300, Thermo).

3.13.4 Obtención de vectores virales y silenciamiento de la expresión de iNOS

La ablación genética fue realizada mediante la infección con lentivirus. Para ello, se utilizaron células HEK293LTV, requeridas para el empaquetamiento lentiviral.

Inicialmente, 2,35 µg de shRNA iNOS 358-407 o 3,15 µg de shRNA iNOS 663-710 o 3,27 µg de Scrambled, o 2.16 µg de pGL3 fueron diluidos en medio Opti-MEM sin antibiotico ni SFB, durante 5 min a temperatura ambiente. Luego, se agregó lipofectamina a cada condición, también en Opti-MEM, incubándose durante 20 min a temperatura ambiente. Cada condición junto con la lipofectamina, fue agregada a placas de 100 mm de diametro conteniendo monocapas subconfluentes de células HEK293LTV, en ausencia de antibiotico de selección, y se los dejó en contacto durante 8hs en estufa a 37°C. Pasado ese tiempo el medio de cultivo fue reemplazado por RPMI con 10% de SFB y kanamicina –antibiotico de selección-.

Durante 24hs, se procedió a colectar el sobrenadante viral, donde se realizó la titulación de la concentración de virus obtenido.

Monocapas subconfluentes de células MB49-I fueron transducidas con los sobrenadantes virales (shiNOS y scrambled) previamente filtrados y titulados, durante al menos 48hs. Luego de ese tiempo, el contenido viral fue reemplazado por medio completo, en presencia de Zeocina, antibiotico de selección. Luego, las células transducidas fueron cosechadas para extracción de proteínas totales, de manera de verificar el % de silenciamiento de iNOS. Se obtuvo un silenciamiento mayor al 50%, clasificando a esta línea estable como “MB49-I-shiNOS-, y su control –MB49-I-scr.

3.14 Obtención células con expresión de Luciferasa

Monocapas subconfluentes de las líneas estables generadas en el punto anterior, fueron transducidas con los sobrenadantes virales obtenidos de pGL3, con el procedimiento descrito anteriormente. Luego, las células fueron cosechadas para medir la actividad de luciferasa (utilizando D-luciferina como sustrato), de manera de verificar que la transducción haya sido exitosa. De esta manera se obtuvieron otras líneas estables: MB49-I-scr-Luc y MB49-I-sh-iNOS-Luc.

4. Ensayos In vivo

4.1 Evaluación del crecimiento tumoral

La evaluación del crecimiento tumoral fue realizada empleando dos sitios diferentes de inoculación. El crecimiento subcutáneo, que es ampliamente usado en investigación oncológica porque es de fácil inoculación y posterior evaluación y la inoculación ortotópica que necesita de operadores bien entrenados pero tiene la ventaja de respetar las interacciones propias del tejido de origen.

4.1.1 Ensayo de crecimiento de tumores subcutáneos

Se realizaron los siguientes experimentos subcutáneos para evaluar:

- Efecto del tratamiento con L-NAME sobre células de CaV con distintos grados de expresión de iNOS:
 1. Se inocularon ratones C57BL/6J machos en el flanco izquierdo de manera subcutánea con 2.5×10^5 MB49 o MB49-I en 0.1 ml/ ratón. Luego, los ratones inoculados con cada uno de los tipos celulares fueron divididos al azar en dos grupos: Aquellos que no recibieron tratamiento –Control- y aquellos

que recibieron L- NAME (0.5g/L en el agua de la bebida) (8 ratones por 1 grupo). El tratamiento comenzó a los 5 días de inoculado el tumor.

2. Se inocularon ratones C3H machos en el flanco izquierdo de manera subcutánea con 2.5×10^5 células MBT2 en 0.1ml/ratón. Los ratones inoculados fueron divididos en dos grupos: Aquellos que no recibieron tratamiento –Control- y aquellos que recibieron L-NAME (0.5g/L en el agua de la bebida) (8 ratones por grupo). El tratamiento comenzó a los 5 días de inoculado el tumor.
- Efecto del silenciamiento de iNOS en MB49-I: Para evaluar el efecto del silenciamiento de iNOS en MB49-I se utilizaron células silenciada por la técnica shRNA, que también expresan luciferasa, de modo que el crecimiento tumoral fue monitoreado por método de luminiscencia in vivo utilizando el sistema Xenogen-IVIS-In vivo Imaging (Xenogen - IVIS ® Spectrum, Universidad de Quebec en Trois Rivieres). Brevemente, se inocularon ratones C57BL/6j con 2.5×10^5 MB49-I-sh-iNOS-Luc o las células control MB49-I-scrambled-Luc en el flanco izquierdo de manera subcutánea en 0.1ml/ratón en las mismas condiciones descritas previamente. Los ratones fueron inoculados 3 veces por semana con D-Luciferina (sustrato de la enzima luciferasa) 0.15ml/ratón (15mg/ml) de manera intraperitoneal, luego fueron anestesiados con isoflurano, por inhalación e introducidos en el equipo de detección de la luminiscencia. El pico de máxima actividad de la luciferasa se detecta entre 5-7 min posteriores a la inoculación del sustrato.
 - Efecto sobre la co-inoculación de células tumorales con fibroblastos: Para evaluar el rol que ocupa el estroma en la evolución tumoral, cultivos primarios de fibroblastos embrionarios fueron tratados in vitro con L-NAME (2mM) durante 48hs. Los fibroblastos (0.5×10^5 /ratón) fueron inoculados conjuntamente con 2.5×10^5 células MB49 o MB49-I/ratón en el flanco izquierdo de manera subcutánea en machos C57BL/6j. A los 7 días se realizó un segundo inculo intratumoral de fibroblastos (1.5×10^5 /ratón) tratados in vitro con L-NAME (2mM) durante 48hs.

En todos los casos, el crecimiento tumoral se evaluó midiendo con calibre dos veces por semana los diámetros mayor (D) y menor (d) y aplicando la fórmula: $0,4 \times D \times d^2$, expresándose como mm^3 .

Los animales fueron sacrificados aproximadamente entre 25 y 30 días post inoculo tumoral.

4.1.2 Ensayo de crecimiento de tumores ortotópicos

Los tumores ortotópicos fueron realizados utilizando hembras C57BL/6j, inoculadas en la vejiga con 2.5×10^4 células MB49 o MB49-l/ratón. Los animales fueron anestesiados mediante la inoculación intraperitoneal de Ketamina (100 mg/kg) + Xilacina (10 mg/kg). Luego, se introdujo un catéter de 24G en la uretra de los ratones, llegando hasta la vejiga, y se realizó una lesión en el urotelio con un electrocauterizador con el fin de que las células tumorales se adhieran. Una vez realizada la cauterización, las células son introducidas dentro de la vejiga. La presencia tumoral se evaluó mediante palpación abdominal y presencia de hematuria. A los 15-22 días de portación del tumor, los ratones fueron sacrificados, y las vejigas fueron extirpadas. El tamaño tumoral se evaluó a través del peso de las vejigas al momento del sacrificio y como control se utiliza el peso de vejigas de animales sin tumor.

- Los ratones fueron tratados con L-NAME (0.5g/L en el agua de la bebida), comenzando cinco días post inoculación tumoral.
- En algunos experimentos se utilizó la vía endovesical para la administración de los inhibidores de NOS. En estos casos el inhibidor L-NAME (2mM) o el inhibidor específico de iNOS 1400w (8 μM) fueron inoculados en la vejiga de ratones previamente anestesiados, dos veces por semana, comenzando 3 días post inoculo de las células tumorales.

Para evaluar el efecto del silenciamiento de iNOS se procedió de igual manera en que se describe en el párrafo anterior, con la única diferencia de que los animales fueron anestesiados con isoflurano, por inhalación, en concentraciones de 1.5 a 3%, de manera continua. El crecimiento tumoral fue registrado tres veces por semana utilizando

el equipo de luminiscencia in vivo como se describió previamente para el crecimiento subcutáneo a través del sistema Xenogen-IVIS-In vivo Imaging (Xenogen - IVIS ® Spectrum, Universidad de Quebec en Trois Rivieres).

4.3 Ensayo de Angiogénesis

La angiogénesis se evaluó mediante la determinación del número de vasos en la piel del ratones C57BL/J6, a los 5 días luego de la inoculación intradérmica de células MB49 o MB49-I ($2 \times 10^4/0.3\text{ml}$). Los ratones fueron sacrificados, exponiendo luego la piel para determinar la zona de inoculación y se tomaron fotografías utilizando una lupa estereoscópica de 16x de magnificación. Las imágenes fueron transferidas a la computadora, donde se cuenta el número utilizando una grilla de 1mm^2 , los resultados se informan como número de vasos/ mm^2 .

En todos los experimentos se incluyó un grupo de animales donde no se inocularon células tumorales, sólo se inoculó medio de cultivo con azul tripan que identifica la zona de inoculación, con el objeto de establecer el número de vasos en animales normales.

Se realizaron dos tipos de tratamiento, a) administración sistémica del L-NAME (0.5g/L) en el agua de la bebida durante los cinco días o b) pre tratamiento de las células tumorales durante 48h con 1400w ($8\mu\text{M}$) e inoculación de 0.1ml del mismo junto con las células tumorales.

4.4 Ensayo de metástasis experimentales

Machos C57BL/6j fueron inoculados en la vena de la cola con 2×10^4 MB49 o MB49-I/ratón, en RPMI 1640, en un volumen de 0.3ml. Los animales fueron randomizados al azar y divididos en dos grupos: Control (sin tratamiento) y L-NAME (0.5g/L, en el agua de la bebida). Diez días posteriores a la inoculación tumoral, los ratones fueron sacrificados y los pulmones fueron extirpados y fijados en solución de

Bouin (ácido pícrico + formaldehído + ácido acético) y el número de nódulos superficiales fue cuantificado bajo lupa estereoscópica con una magnificación de 6.5x.

4.5 Obtención de fibroblastos embrionarios

Ha sido descrito que los FB embrionarios se asemejan a los FB activados protumorales. Por lo tanto, fueron utilizados como células representativas del estroma tumoral. Los fibroblastos embrionarios se obtuvieron de embriones de 13 días de ratones C57BL/J6. Se obtuvo el tegumento de los ratones, el cual se cortó con bisturí en secciones de 1mm³. Dichas secciones se incubaron con 5ml de tripsina (0.25%) a 37°C en agitación durante 30 minutos. La tripsina fue luego inactivada con el agregado de 2ml de SFB, se dejó decantar 2 minutos para eliminar grumos y se colectó el sobrenadante con los fibroblastos, el cual se centrifugó y resuspendió en medio RPMI con 10% de SFB. Se contaron a los fibroblastos con azul tripan y se los sembró en frascos de cultivo.

5. Técnicas histológicas

Fragmentos de tumores de aproximadamente 3mm de lado fueron fijadas en formaldehído 4% durante 24hs, y luego deshidratadas con concentraciones crecientes de alcohol etílico (desde 70 hasta 100%). El aclaramiento fue realizado con xilol, y posterior inclusión en parafina. Posteriormente se realizaron con micrótopo cortes de 5µm, los que fueron montados sobre portaobjetos, desparafinados y rehidratados para permitir la realización de las distintas técnicas histológicas.

5.1 Coloración Hematoxilina & Eosina

Los cortes se colorearon con Hematoxilina de Carazzi durante 10 minutos, removiendo el excedente luego con agua corriente, seguido por un lavado con agua destilada. Luego,

se coloreó con eosina acida durante 1-4 minutos, y se volvió a lavar con agua destilada. Finalmente se realizó la deshidratación de los cortes que fueron montados con Bálsamo de Canadá.

5.2 Identificación de colágeno por Tricrómico de Masson

Para llevar a cabo esta técnica, los cortes fueron coloreados con Hematoxilina de Carazzi, durante 10 minutos, luego lavados con agua corriente, y coloreados con una mezcla de Fucsina-Ponceau de Xilidina-Orange G durante 1 minuto, y lavados nuevamente con agua destilada. La coloración fue diferenciada con ácido fosfomolibdico al 1% durante aproximadamente 5 minutos, y luego se coloreó con Azul de Anilina Acética durante 6 minutos, y se lavó rápidamente con agua destilada. Por último, los cortes fueron deshidratados y montados con Bálsamo de Canadá.

5.3 Inmunohistoquímica

Para realizar esta técnica los cortes histológicos fueron colocados en portaobjetos cargados positivamente. Se eliminó la peroxidasa endógena por tratamiento durante 30 minutos con peróxido de hidrógeno 0.6%. Luego, se realizó la recuperación antigénica por calentamiento de las muestras en buffer citrato pH6 durante 15 min. Posteriormente, las muestras fueron incubadas con buffer bloqueo durante 1h (Vector Laboratories, Cat # PK-4000), luego lavadas 3 veces con PBS durante 5 minutos e incubadas con el anticuerpo primario a 4°C O.N. Al día siguiente, los cortes fueron lavados 3 veces con PBS e incubados con el anticuerpo secundario biotinilado (Vector Laboratories, Cat # PK-4000), diluido 1:500 durante 30 min. Una vez terminado ese tiempo, el complejo de peroxidasa-estreptoavidina diluida en PBS 1:3000, fue agregada a la muestra durante 5 minutos. La reacción de coloración se realizó con 3-3'-diaminobencidina al 0.02% y peróxido de hidrogeno al 0.01%, y los núcleos fueron coloreados con Hematoxilina de Mayer durante 1 minuto. Los controles negativos se realizaron omitiendo el anticuerpo primario.

6. Análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron al menos 3 veces dando resultados similares. Se muestra uno ensayo representativo. En los gráficos de cuantificación de los Western Blot se presentan datos de tres experimentos promediados. Los estudios *in vitro* se realizan por sextuplicado y se expresan como promedio \pm desviación estándar. Se utilizó, el análisis de la varianza (ANOVA) con comparaciones Bonferroni o Test de Student según se indica en los pies de figura de cada ensayo.

Los estudios *in vivo*, fueron realizados en tres ocasiones independientes. Salvo que se aclare especialmente, cada grupo experimental fue compuesto por 8 animales. Los resultados se expresan como mediana y rango cuando tienen una distribución no gaussiana o como promedio y desviación estándar para las distribuciones gaussianas. Para medir crecimiento y peso tumoral se utilizaron test no paramétricos de Kruskal-Wallis con comparaciones de Dunn o Mann-Whitney según corresponda. Para los ensayos de sobrevida se utilizó el test “Log-rank” (Mantel-Cox) para comparaciones globales y luego el Test Gehan-Breslow-Wilcoxon para comparaciones de a pares de tratamientos. Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 5 InStat statistical package (versión 3.01).

7. Consideraciones éticas

Los ratones utilizados en estos estudios fueron obtenidos del Bioterio del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, y fueron tratados según normas éticas del Instituto, coincidentes con las normas internacionales para asegurar el bienestar de animales de experimentación. Concluidos los experimentos o ante síntomas de dolor en los animales, los mismos fueron sacrificados por dislocación cervical o en cámara de CO₂. Los estudios en animales cuentan con la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (Protocolo: 2012/02).

RESULTADOS

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. 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 paracrinas provenientes del microambiente, del estroma y de las diferentes poblaciones celulares que componen los tumores. Para estudiar la integración de esas señales, es necesario de modelos experimentales complejos que puedan emular dichas interacciones. Gracias al modelo de cáncer de vejiga murino con el que contamos, fue posible estudiar la relación que existe entre la expresión de iNOS, la producción de NO y el crecimiento tumoral, de manera de entender el rol del NO en la progresión del CaV

Ya describimos al NO como mediador importante en los procesos inmunológicos, en la inflamación, en los procesos de cicatrización de heridas y en la remodelación tisular. La inflamación crónica es un factor capaz de promover el fenómeno de cancerización de campo y se ha asociado a la inducción y promoción tumoral. Algunos autores consideran al CaV como un fenómeno de campo. Este se describe como un conjunto de alteraciones generalizadas en el tejido, que permiten el desarrollo y el crecimiento de células tumorales. Hemos descrito que en CaV la expresión de iNOS, enzima productora de altos niveles de NO, es un factor de mal pronóstico para pacientes, asociándose con progresión hacia la invasión y con recurrencia temprana [80]. Sumado a nuestros resultados, otros investigadores han sugerido que la expresión de iNOS podría estar asociada a la falta de respuesta al tratamiento con BCG [136]. En base a estos antecedentes decidimos hacer blanco en la regulación de las NOS.

Por este motivo inicialmente decidimos analizar la actividad biológica del L-NAME (inhibidor farmacológico pan NOS).

1. EFECTO DEL INHIBIDOR L-NAME SOBRE LAS LÍNEAS DE CaV

1.1 El L-NAME disminuye crecimiento celular y la producción de NO en forma dosis dependiente –Elección de una dosis de trabajo-

Con el objetivo de analizar si la inhibición de NO ejercía un efecto sobre el crecimiento de células de CaV, se decidió evaluar la proliferación celular bajo la inhibición farmacológica de la producción de NO, utilizando la técnica de MTS. Para ello, utilizamos L-NAME, inhibidor farmacológico de las tres isoformas de NOS, en distintas concentraciones. Realizamos un primer ensayo utilizando las células productoras de NO, MB49 y MB49-I para establecer la dosis respuesta, Observamos que el L-NAME inhibe el crecimiento de las células MB49 y MB49-I y la producción de NO en forma dosis dependiente (**Figura 13**) indicando que el NO es un factor necesario para el crecimiento. Observamos también, que la línea invasora MB49-I produce mayores niveles de NO que la línea NMI, MB49. Para los ensayos siguientes se seleccionó la concentración de L-NAME de 2mM, donde hay una inhibición de proliferación del 50% en ambas líneas tumorales.

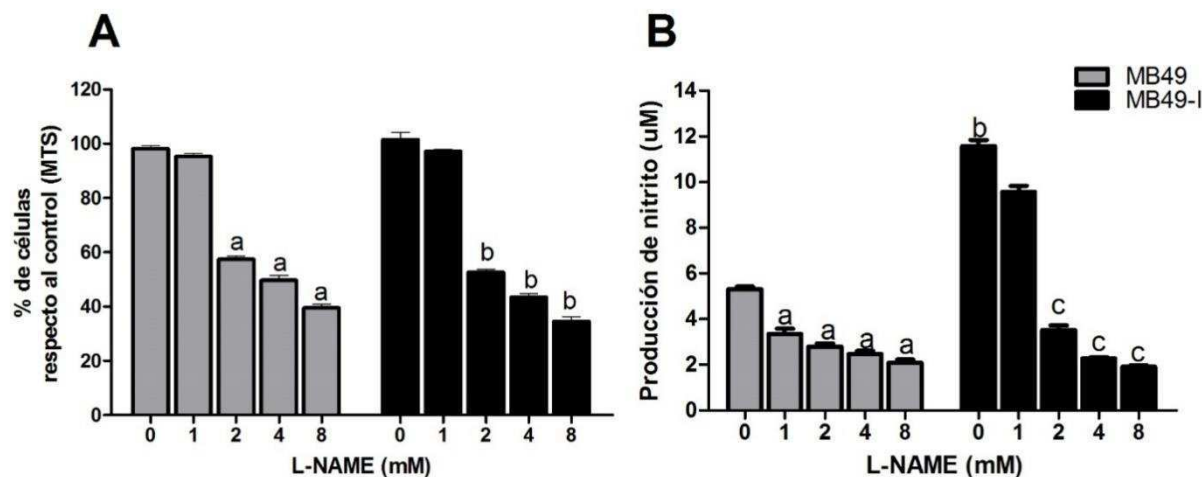


Figura 13: La inhibición de la producción de NO con L-NAME disminuye el crecimiento *in vitro* de la líneas de CaV. A) Proliferación de células MB49 y MB49-I (informado como % de células respecto al control (sin L-NAME), al cual se consideró 100%) tratadas con distintas concentraciones de L-NAME durante 48hs evaluado por MTS. a- $p < 0.0001$ vs control; b- $p < 0.0001$ vs control B) Producción de nitrito en células MB49 y MB49-I tratadas con distintas concentraciones de L-NAME por 48hs. a- $p < 0.001$ vs control; b- $p < 0.0001$ vs MB49; c- $p < 0.0001$ vs control. ANOVA, contrastes de Bonferroni.

1.2 El L-NAME disminuye el crecimiento *in vitro*, la producción de NO y expresión de iNOS de líneas de CaV que expresan la enzima

En una nueva serie de experimentos se incluyó la línea de CaV, MBT2, que no produce NO y no expresa iNOS. Observamos que a diferencia de las líneas que expresan iNOS, el crecimiento de MBT2 no se ve afectado por el tratamiento con L-NAME (2mM) (**Figura 14A**). Observamos que, por western blot y por inmunofluorescencia, la línea invasora MB49-I presenta mayor expresión de la enzima que la línea MB49. El tratamiento con L-NAME disminuye la expresión de iNOS en ambas líneas (**Figura 14C y 15**).

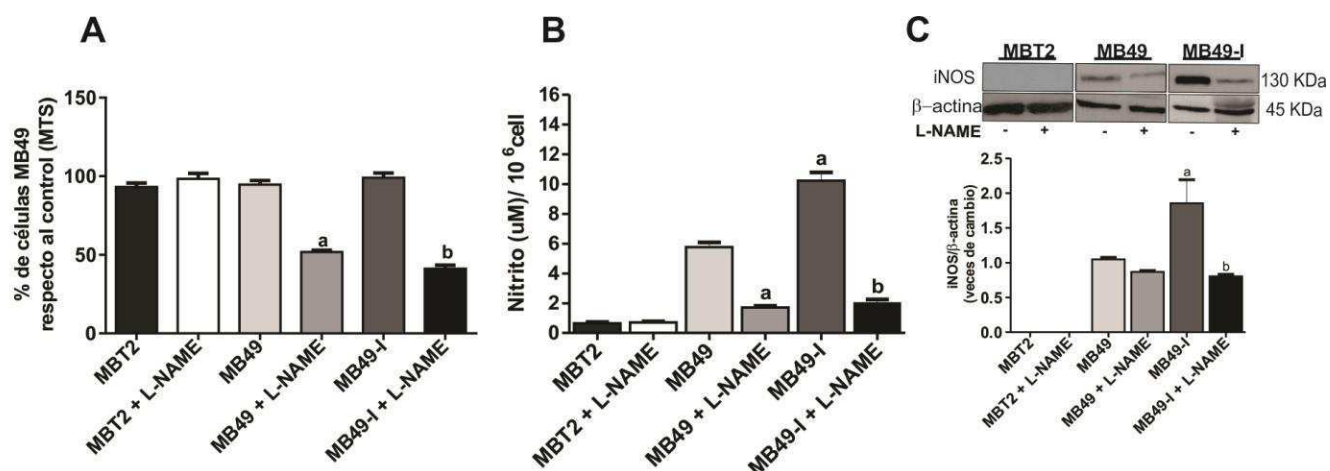


Figura 14: L-NAME reduce la producción de NO y la expresión de iNOS en MB49 y MB49-I. A) Proliferación de células MBT2, MB49 y MB49-I (informado como % de células respecto al control, que se consideró 100%) tratadas L-NAME 2mM durante 48hs evaluado por MTS. a- $p < 0.0001$ vs control; b- $p < 0.0001$ vs control) La producción de NO fue determinada en los sobrenadantes de MBT2, MB49 y MB49-I tratadas o no in vitro con L-NAME (2mM), con el reactivo de Griess. ANOVA, Contrastes Bonferroni: a- $p < 0.001$ vs MB49; b- $p < 0.001$ vs MB49-I. ANOVA, contrastes de Bonferroni. C) El ensayo de western blot revela la mayor expresión de iNOS en MB49-I. El tratamiento con L-NAME (2mM) durante 24hs disminuye la expresión en MB49-I. La expresión de iNOS se relativizó a la de actina-beta y se expresó como veces de cambio respecto al control. ANOVA, Contrastes Bonferroni: a: $p < 0.001$ vs. MB49, b: $p < 0.001$ vs. MB49-I. Densitometria para iNOS utilizando software de imágenes.

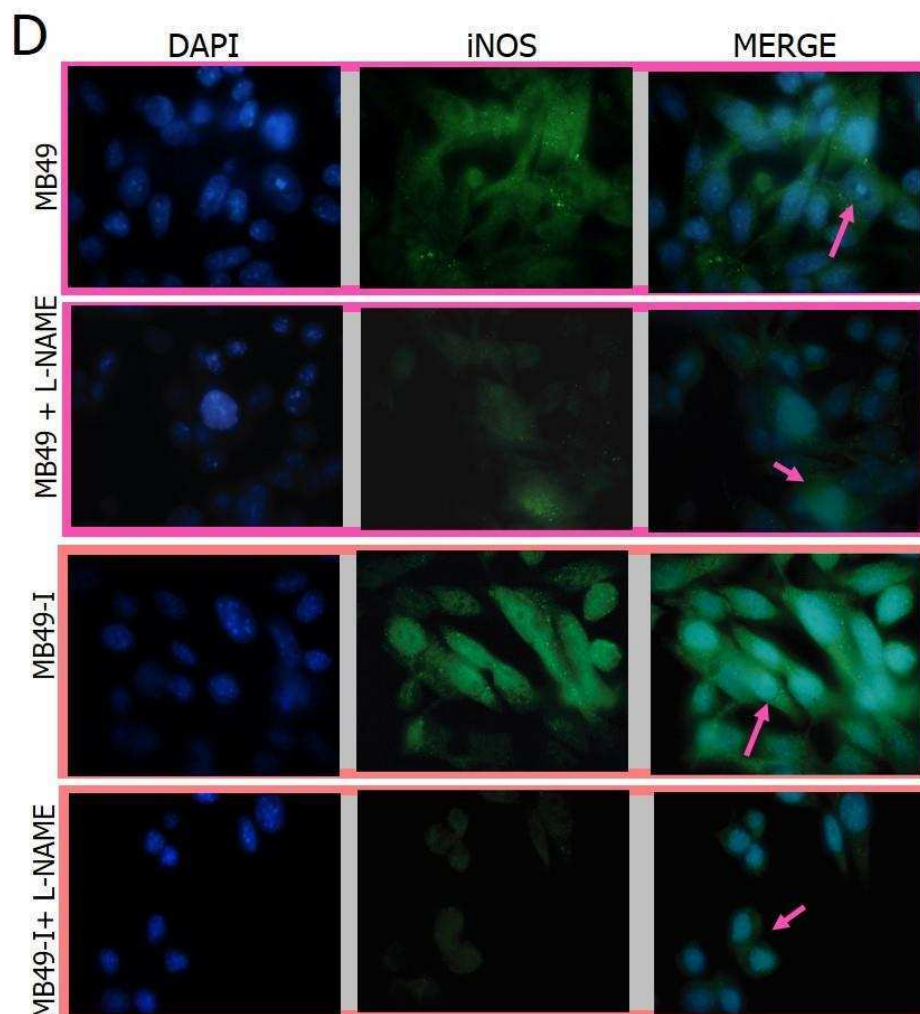


Figura 15: Inmunofluorescencia para iNOS. Se observa una mayor marca citoplasmática (flechas rosas) en MB49-I, a diferencia de MB49, disminuida luego del tratamiento con L-NAME. Los núcleos fueron marcados con DAPI. Magnificación 1000x

1.2 Modulación de la expresión de iNOS

En un intento para establecer si la modulación de la expresión de iNOS que observamos luego del tratamiento con L-NAME, se realiza a nivel de la transcripción, se llevaron a cabo PCRs semi cuantitativas. En la **Figura 16** se puede observar que los niveles de mRNA de iNOS son mayores en la línea MB49-I, que en la MB49, en

concordancia con los niveles proteicos. Sin embargo, L-NAME no moduló los niveles de mensajero en ninguna de las dos líneas. Estos resultados indican que la inhibición de la expresión de iNOS por L-NAME no es a nivel transcripcional.

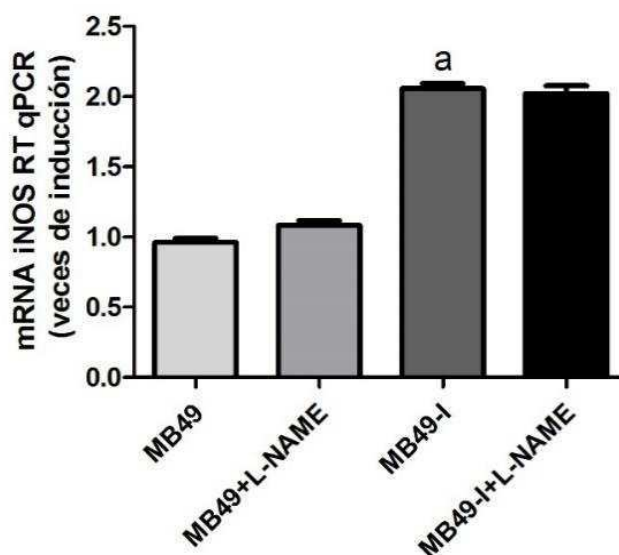


Figura 16: El tratamiento con L-NAME no modifica los niveles de mRNA de iNOS en MB49 y MB49-I. Las células fueron tratadas con L-NAME 2mM durante 24hs. Se muestran las veces de inducción respecto a GAPDH y a los respectivos controles (MB49 o MB49-I). ANOVA, contrastes Bonferroni: $a-p < 0.001$ vs MB49.

Se sabe que en la mayoría de las células, la transcripción de iNOS requiere de la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B. Algunos autores describieron que la inhibición de la expresión de iNOS por numerosos agentes, tales como glucocorticoides o antioxidantes resultaron también en la inhibición de la activación de NF- κ B. Dicha inhibición puede deberse a la captura de este factor por interacciones proteína-proteína, por el bloqueo de la translocación nuclear, o por la inhibición de la transactivación de NF- κ B [152-154]. Otros autores han reportado que puede inhibirse la expresión de iNOS a través de mecanismos de transrepresión de NF- κ B, mediados por receptores nucleares PPAR γ , debido a que ambos compiten por los mismos factores coactivadores [155]. Es

así que decidimos analizar si la inhibición de la expresión de iNOS luego del tratamiento con L-NAME, se debía a la inhibición de la activación de NF- κ B o a la activación de la actividad de PPAR γ . Para ello se realizó un ensayo de gen reportero para luciferasa bajo el control transcripcional de los elementos respondedores de NF- κ B (NF- κ B) y PPAR γ (PPRE). Observamos, que la actividad de NF- κ B no se encuentra inhibida por el tratamiento con L-NAME (**Figura 17A**), y que con L-NAME la actividad de PPAR γ se encuentra levemente más activada luego del tratamiento, pero no de manera significativa (**Figura 17B**). Estos resultados indican que en principio la disminución de la expresión de iNOS por tratamiento con L-NAME no estaría mediado por las vías de NF- κ B ni por PPAR γ . Sin embargo, es posible que al menos en MB49 exista alguna vinculación entre la activación de PPAR γ y la inhibición de iNOS. De todas maneras, no se descarta la presencia de otros mecanismos involucrados.

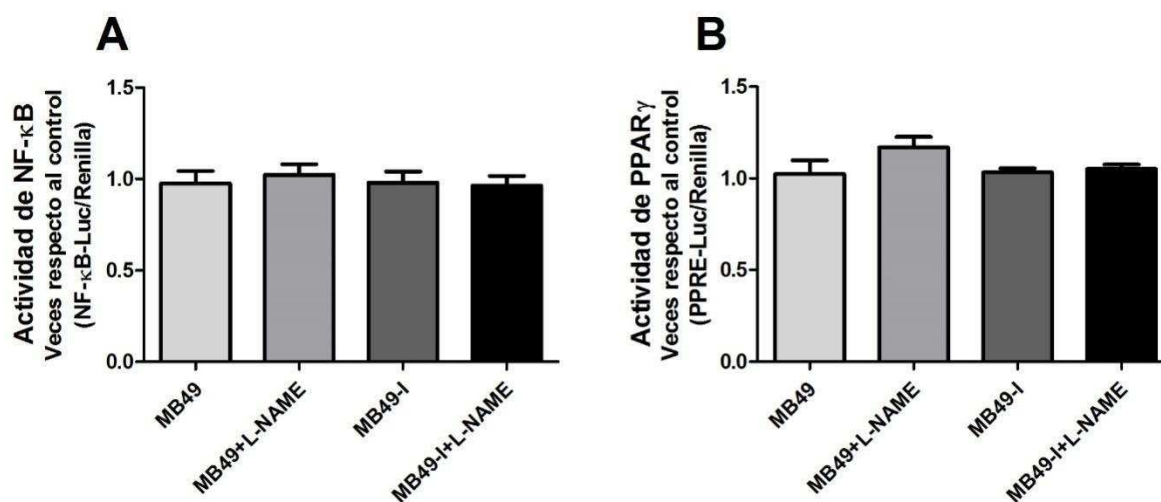


Figura 17: La inhibición de la expresión de iNOS en las células de CaV por el L-NAME no se encuentra regulada por los factores NF- κ B, ni PPAR γ . A y B) Actividad transcripcional de NF- κ B y PPAR γ en monocapas subconfluentes de células MB49 y MB49-I transfectadas con un plásmido que posee el gen de luciferasa bajo el control transcripcional del NF- κ B y PPRE respectivamente y un plásmido que posee el gen de Renilla bajo el control transcripcional de un promotor constitutivo. Las células fueron durante 24hs con +/- 2mM L-NAME. La actividad luciferasa y Renilla se leyó como cuentas por segundo y los resultados de luciferasa se relativizaron respecto a los de Renilla y se graficaron como veces respecto al control.

1.3 El L-NAME inhibe la vía de proliferación MAPK

Ya que demostramos que el L-NAME inhibe la proliferación de las líneas MB49 y MB49-I, el paso siguiente fue analizar las vías de señalización vinculadas a proliferación (MAPK) y sobrevivencia (PI3K). Para ellos analizamos por western blot la expresión de ERK fosforilado (pERK) y Akt fosforilado (pAkt), efectores finales de las vías de MAPK y PI3K respectivamente. . Observamos que el L-NAME disminuyendo la fosforilación de ERK1/2 (**Figura 18A**) mientras que no modifica la fosforilación de Akt. (**Figura 18B**). Estos resultados indican que el L-NAME afecta la proliferación de las células sin modificar la vía de sobrevivencia.

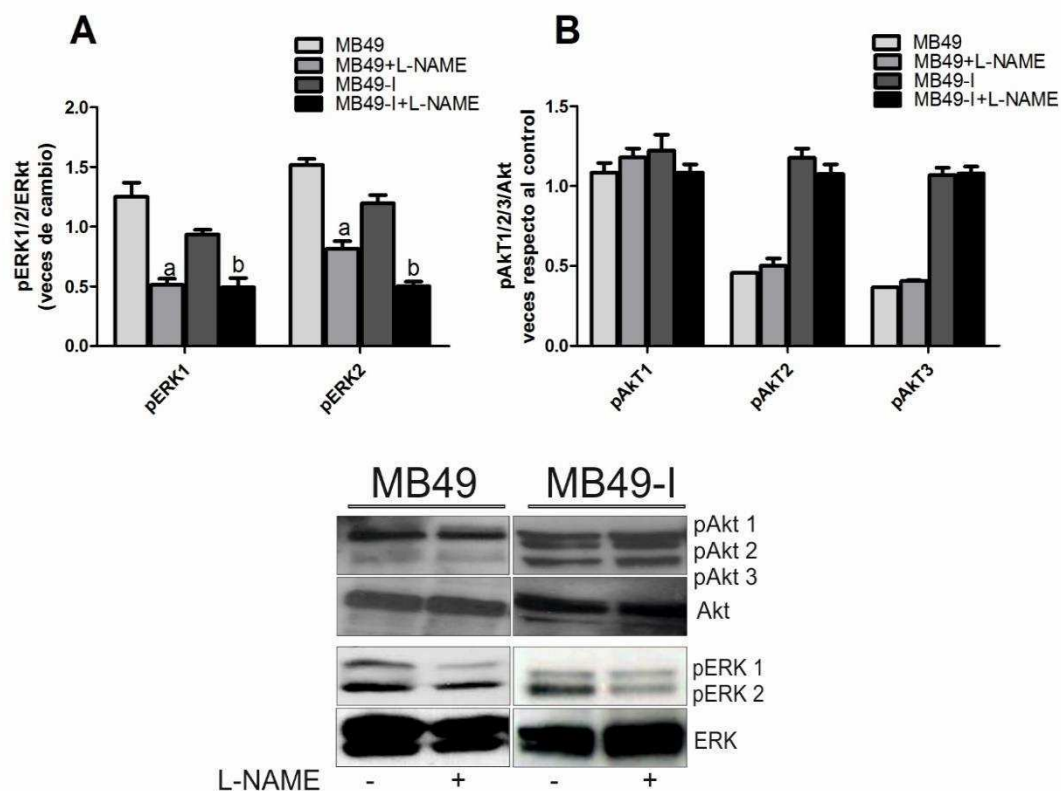


Figura 18: El tratamiento con L-NAME inhibe la vía MAPK: Western blot de lisados de células MB49 y MB49-I +/- L-NAME 2mM durante 24hs para A) pERK.y B) pAKt. La fosforilación relativa de las proteínas se normalizó respecto al valor de la proteína total. Los resultados se expresaron como veces de cambio respecto al control. a- $p < 0.05$ vs MB49; b- $p < 0.05$ vs MB49-I. ANOVA comparaciones de Bonferroni.

1.4 El tratamiento con L-NAME reduce la actividad de enzimas proteolíticas de MB49-I

Las enzimas proteolíticas están íntimamente relacionadas con los procesos de invasión que llevan a la progresión tumoral desarrollando metástasis en órganos distantes. Antecedentes de nuestro grupo muestran que la línea MB49-I es más invasora y produce mayores niveles de enzimas proteolíticas MMP-9 y uPA [156]. A continuación quisimos evaluar el rol del NO en las capacidades invasivas de las líneas, midiendo la actividad de enzimas proteolíticas. En concordancia con los antecedentes, observamos una mayor actividad de uPA en MB49-I en comparación con MB49, que es inhibida luego del tratamiento con L-NAME (**Figura 19A**).

Analizamos también la actividad de MMPs, y observamos una banda de degradación gelatinolítica de 105 kDa y 72 kDa correspondiente a MMP9 y MMP2 respectivamente. Ambas enzimas presentaron mayores niveles en la línea MB49-I, comparada con MB49. La actividad de MMP9 y MMP2 es inhibida significativamente en la línea invasora, pero no se modifica en la no invasora, MB49. (**Figura 19B**).

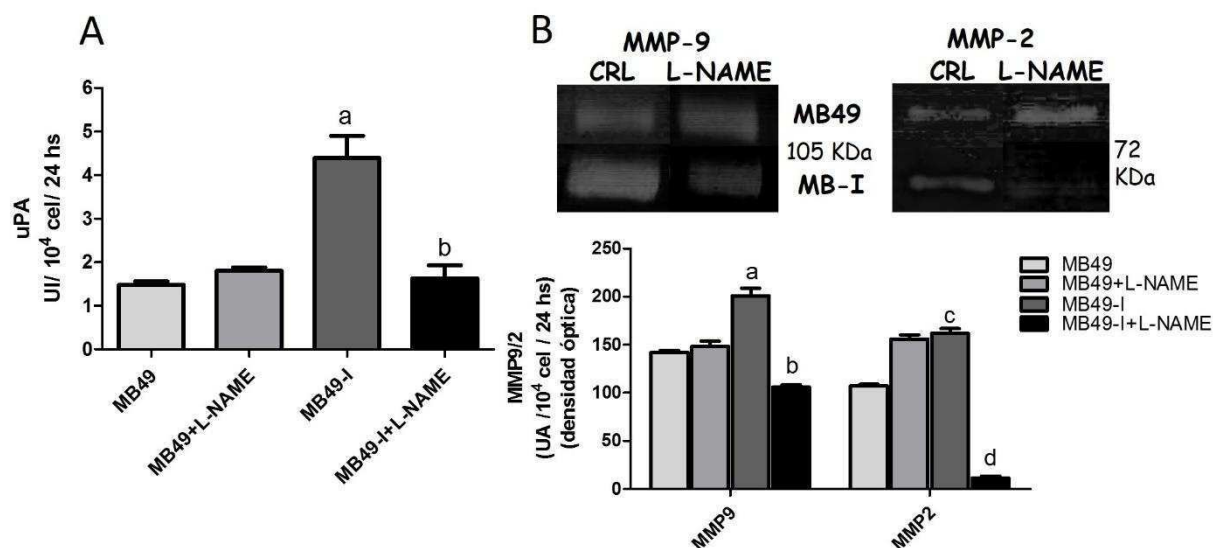


Figura 19: El tratamiento con L-NAME reduce la actividad de enzimas proteolíticas en MB49-I.A) Cuantificación de actividad de uPA por caseinólisis radial. La actividad de uPA secretada fue cuantificada por caseinólisis radial en el Medio Condicionado de cultivos celulares MB49 y MB49-I +/- L-NAME 2mM. ANOVA, contraste Bonferroni a-p<0.0001 vs MB49; b-p<0.0001 vs control B) Cuantificación de la actividad de MMP-9/2 por zimografía. Bandas de actividad proteolíticas fueron cuantificadas con un densitómetro digital, los datos están expresados como unidades arbitrarias. ANOVA, contraste Bonferroni a-p<0.001 vs MB49; b-p<0.0001 vs control; c-p<0.0001 vs MB49; d-p<0.0001 vs control.

1.5 El L-NAME reduce la capacidad migratoria de la línea MB49-I

Para generar metástasis las células tumorales deben adquirir capacidad migratoria que les permita desplazarse a través de las diferentes estructuras, penetrar en los vasos sanguíneos y luego salir de ellos en el órgano blanco de la metástasis. Para analizar la implicancia del NO en este proceso analizamos la capacidad migratoria de las células a través de un ensayo de migración en herida *in vitro*. Nuestros resultados muestran que la línea MB49-I tiene mayor capacidad migratoria que MB49. Observamos que el L-NAME disminuye dicha capacidad solamente en la línea invasora (**Figura 20**).

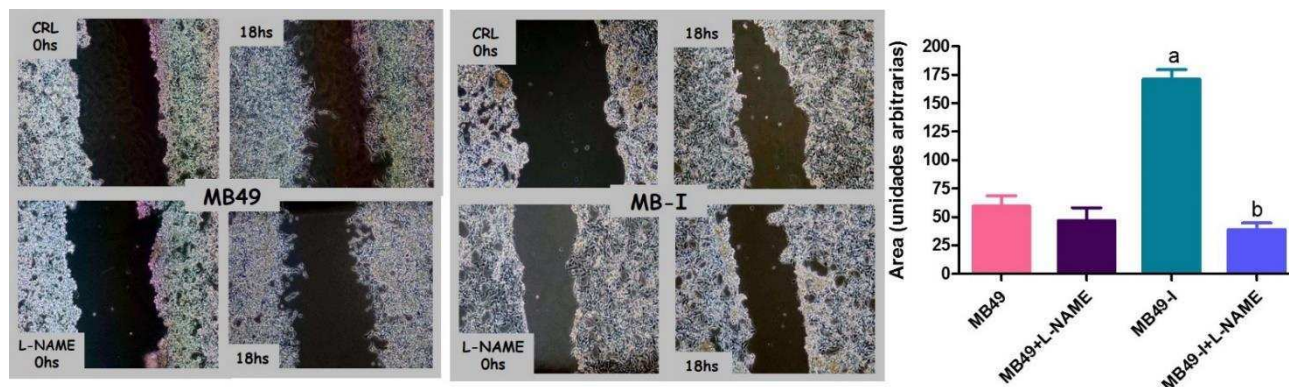


Figura 20: El L-NAME reduce la capacidad migratoria de la línea MB49-I A) Imágenes representativas (microscopía por contraste de fase) del ensayo de migración de cierre de herida. Las células MB49 y MB49-I tratadas o no con L-NAME 2mM fueron crecidas hasta confluencia. Se realizó una herida lineal sobre la placa de cultivo y se monitoreó cada hora durante 18h. El área no cubierta de la herida en los cultivos fue cuantificada a tiempo 0 y 18h utilizando el *ImageJ* 1.37v. El gráfico representa el área cubierta. ANOVA, contraste Bonferroni a- $p < 0.005$; b- $p < 0.005$

1.6 El tratamiento con L-NAME inhibe el desarrollo de metástasis experimentales en pulmón

Ya demostramos que el NO es factor necesario para la migración celular y activación de enzimas proteolíticas directamente asociadas con procesos de invasión tumoral y posterior diseminación. La diseminación metastásica provoca en el huésped un impacto sistémico severo, de profunda relevancia clínica ya que es 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. Con el objetivo de investigar el rol de NO en el crecimiento metastático elegimos un modelo de metástasis experimentales en el cual se inoculan las líneas de CaV MB49 y MB49-I ($2 \times 10^4 / 0.3 \text{ml}$) en la vena de la cola de ratones hembras C57BL/6j. Seguidamente, fueron tratados o no con L-NAME (0.5g/L) en el agua de la bebida. Después de 10 días de experimento, los ratones fueron sacrificados y los pulmones fijados. Observamos, que los pulmones presentaban macrometástasis visibles, lo que nos permitió hacer un análisis

del número de nódulos metastásicos, bajo lupa estereoscópica. Observamos que los nódulos metastásicos fueron significativamente mayores al inocular células MB49-I, respecto MB49, como ya había sido descrito [156], y el tratamiento con L-NAME redujo el número de dichos nódulos, en ambos tumores, pero de manera significativa en la línea invasora (**Figura 21**).

Estos resultados indican que ambas líneas tumorales tienen la capacidad de crecer en un órgano distante como el pulmón, y que la inhibición de la producción de NO reduce dicho capacidad.

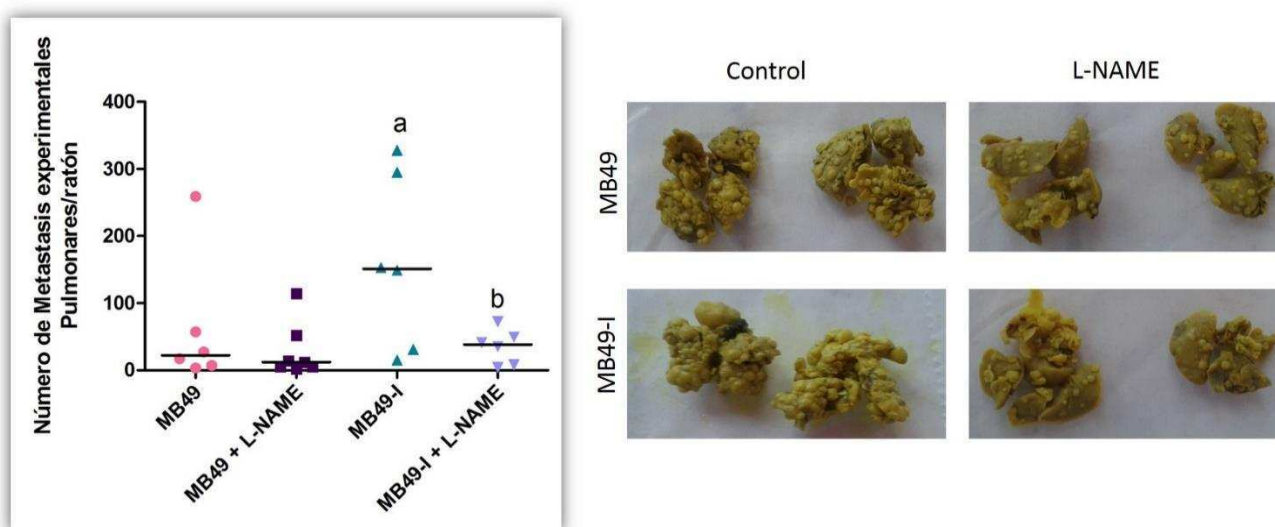


Figura 21 La inhibición de la producción de NO reduce el número de metástasis experimentales pulmonares en los tumores invasores: Ensayo de metástasis experimentales pulmonares. Se contó el número de nódulos metastásicos pulmonares después de la inoculación 2×10^4 células MB49 y MB49-I +/- L-NAME 0.5g/L en el agua de la bebida. Test Kruskal-Wallis, con comparaciones de Dunn a- $p < 0.001$ vs MB49; b- $p < 0.001$ vs MB49-I. En el panel de la derecha, imágenes representativas de los pulmones extraídos, y los claros nódulos tumorales en los pulmones control, en mayor medida en los MB49-I.

2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON L-NAME *IN VIVO*

2.1 El L-NAME reduce el crecimiento heterópico de tumores que expresan iNOS

Los modelos animales son de gran utilidad para el estudio de la progresión y/o diseño de nuevas modalidades diagnósticas y terapéuticas. La mayoría de los estudios se realizan utilizando la inoculación subcutánea ya que aunque no es el sitio ortotópico presenta la ventaja de ser fácil de inocular y de evaluar el crecimiento. En consecuencia para evaluar el efecto del NO *in vivo*, en una primera etapa, se generaron tumores subcutáneos utilizando las células MB49 y MB49-I en ratones singéneos C57BL/6J, y células MBT2 en ratones C3H. El L-NAME fue administrado en el agua de la bebida a partir de los 5 días de inoculación tumoral en una dosis de (0.5g/L), a lo largo de todo el experimento. La **Figura 22** muestra que L-NAME inhibió el crecimiento tumoral de MB49 y MB49-I, mientras que no afectó el crecimiento de los tumores MBT2. En concordancia con lo observado *in vitro*, podemos decir que el tratamiento con L-NAME está afectando el crecimiento de aquellos tumores que expresan iNOS, en este caso, alterando aún, en mayor medida a los tumores MB49-I, que presentan una alta expresión de la enzima. En forma similar a lo observado *in vitro*, el tratamiento con L-NAME disminuye la expresión de pERK, indicando que *in vivo*, el tratamiento también está afectando la proliferación de las células tumorales.

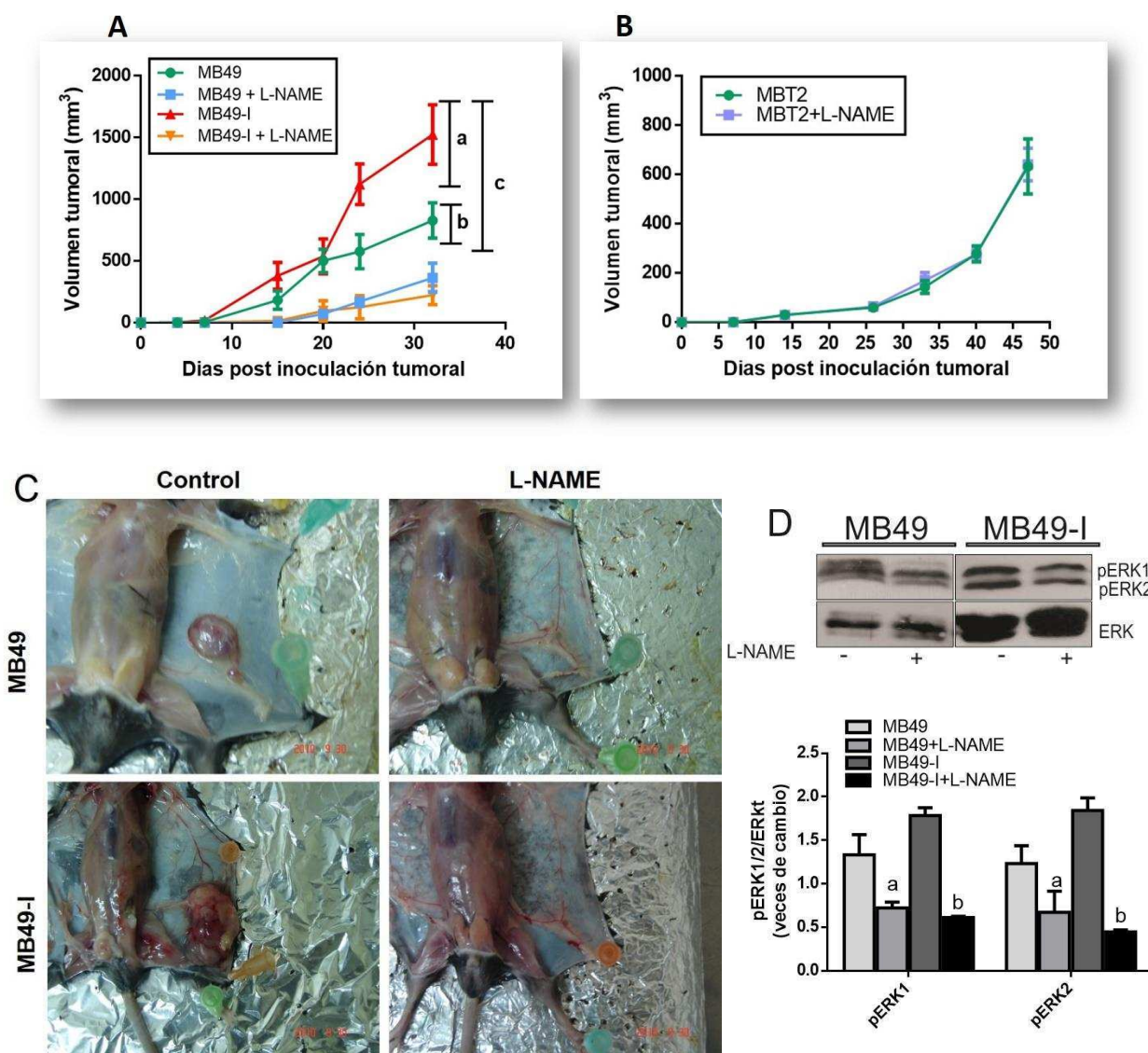


Figura 22: L-NAME inhibe el crecimiento tumoral de tumores que expresan iNOS: Se inocularon 2×10^5 células MB49/ MB49-I o MBT2 en A) ratones C57BL/6J B) C3H. El L-NAME fue suministrado 5 días posteriores a la inoculación tumoral y luego a lo largo del experimento por vía oral en el agua de la bebida (0.5g/L). Se grafica el volumen tumoral (mm^3) promedio \pm DS. El análisis estadístico se realizó sobre el volumen tumoral a día final del experimento. Test Kruskal Wallis con comparaciones múltiples de Dunn a- $p < 0.05$ vs MB49; b- $p < 0.001$ vs MB49; c- $p < 0.001$ vs MB49-I. C) Fotos representativas de tumores MB49 y MB49-I +/- L-NAME al día de sacrificio. D) Expresión de ERK en homogenatos de tumores subcutáneos tratados o no con L-NAME. La fosforilación relativa de ERK se normalizó respecto a ERK total. Los resultados se expresaron como veces de cambio respecto al control. a- $p < 0.05$ vs MB49; b- $p < 0.01$ vs MB49-I ANOVA contrastes de Bonferroni.

2.2 El L-NAME reduce la angiogénesis tumoral

Con el fin de analizar la implicancia del NO en el proceso de angiogénesis tumoral, ratones C57BL/6j fueron inoculados de manera intradérmica con células MB49 o MB49-I, y tratados o no con L-NAME (0.5g/L, en el agua de la bebida) durante 5, desde el día de inoculación tumoral. En la **Figura 23** se observa que ambos tumores inducen una alta angiogénesis, a diferencia del control inoculado con vehículo. Sin embargo, la línea MB49-I fue capaz de inducir un mayor número de vasos en comparación que la MB49. Nuestros resultados muestran que la inhibición de NO afectó la neovascularización de ambos tumores, siendo aún más evidente en los tumores invasores. Asimismo, fue posible observar que el tratamiento no sólo afectó la formación de nuevos vasos para nutrir a los tumores, sino también el calibre de los mismos, y el tamaño de los incipientes tumores.

Está descrito que la inducción de iNOS en células tumorales puede promover la angiogénesis a través de la upregulación del factor VEGF. Es por esto, dado que observamos la reducción de dicho proceso, al tratar con L-NAME, decidimos evaluar la expresión del factor en tumores subcutáneos tratados o no con L-NAME: A diferencia de lo que esperábamos, observamos, que la expresión de VEGF no se encuentra afectado por el tratamiento (**Figura 24**).

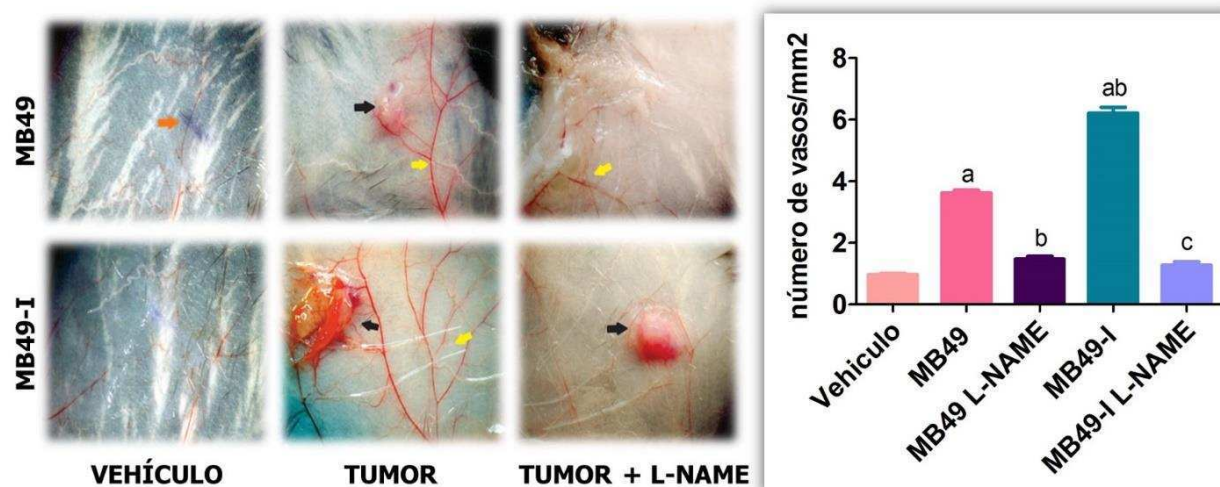


Figura 24: La inhibición de la producción de NO disminuye la angiogénesis generada por tumores de vejiga: Ratones C57BL/6j fueron inoculados intradérmicamente con células 2×10^4 MB49 y MB49-I junto con una gota de azul tripán para identificar la zona de inoculación. El L-NAME fue administrado el mismo día de la inoculación y a lo largo de los 5 días de experimento, vía oral, en el agua de la bebida (0.5g/L). Se cuantificaron los vasos sanguíneos a través del programa Image J, y la angiogénesis es reportada como el número de vasos/mm² de piel. Las fotografías fueron tomadas con lupa estereoscópica bajo 16x de aumento. Las flechas naranjas identifican la zona de inoculación, las amarillas los vasos, y las negras indican el tumor. Test Kruskal Wallis con comparaciones múltiples de Dunn a- $p < 0.01$ vs vehículo; b- $p < 0.01$ vs MB49; c- $p < 0.001$ vs MB49-I.

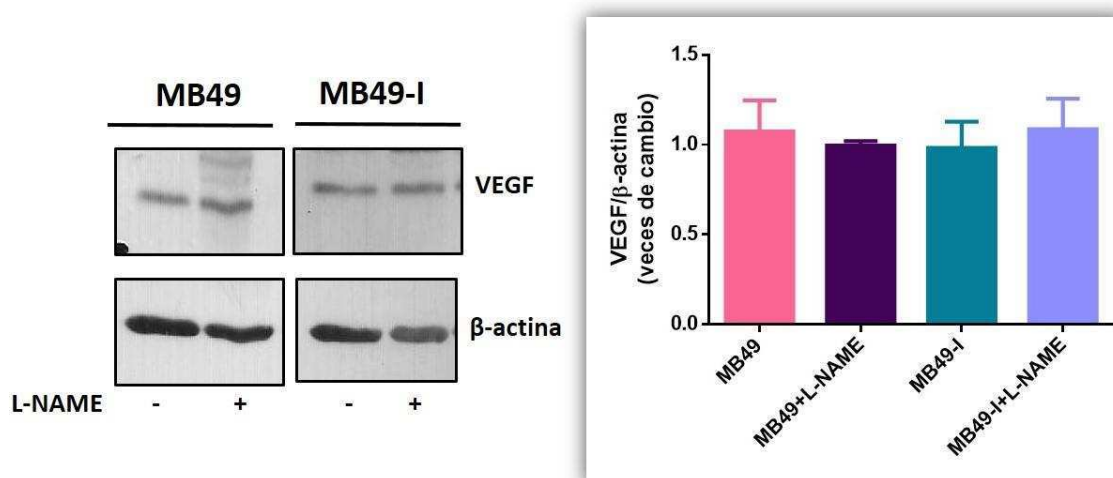


Figura 23: Expresión de VEGF en tumores subcutáneos. Ensayo de western blot para analizar la expresión de VEGF en homogenatos de tumores subcutáneos tratados o no con L-NAME (0.5g/L) La expresión de VEGF se relativizó a la de la β-actina y se expresó como veces de cambio respecto al control..

3. ROL DEL ESTROMA EN LA PROGRESIÓN TUMORAL. EFECTO ANTITUMORAL DE LA INHIBICION DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

3.1 El L-NAME induce regresión tumoral acompañada de deposición de fibras de colágeno

Se sabe que el NO se encuentra involucrado en procesos remodelación tisular en respuesta a diferentes estímulos. Un ejemplo de este proceso es la cicatrización, proceso fisiológico, en donde ha sido reportado que el NO es un regulador negativo de la remodelación tisular [157]. Un ejemplo claro de esta regulación se ve en el retraso de la cicatrización debido a un proceso infeccioso que genera NO [158]. Antecedentes de nuestro laboratorio, mostraron que la producción de NO por parte de las células tumorales en respuesta a BCG regulan negativamente la remodelación tisular necesaria en esta terapia.

Dado que se considera a un tumor como una herida que no cicatriza, pensamos que la inhibición de la producción de NO podría contribuir a dicha cicatrización, incidiendo sobre las células tumorales y sobre el estroma tumoral. Como bien se describió en la introducción una de las características principales de un estroma reactivo es la deposición de fibras de colágeno I. Es por esto, que para analizar directamente el efecto del tratamiento con L-NAME sobre el estroma en el modelo tumoral de CaV, decidimos estudiar el deposito de fibras de colageno en cortes histologicos de tumores de vejiga tratados o no. Observamos, que el L-NAME produce una significativa inhibición del crecimiento tumoral, como bien mostramos en la **Figura 22A** y que la misma se encuentra asociada a una acumulación de matriz extracelular rodeando a las células tumorales, que viene acompañada de la induccion de expresion de colageno intratumoral, el cual se dispone rodeando a las células tumorales, en ambos casos (**Figura 25**), medido a través de la coloración tricromica de Masson.

Estos resultados indican que el tratamiento con L-NAME indujo una alteración en la MEC, posiblemente activando a los fibroblastos a proliferar y a secretar colágeno I, de manera de contener a las células tumorales.

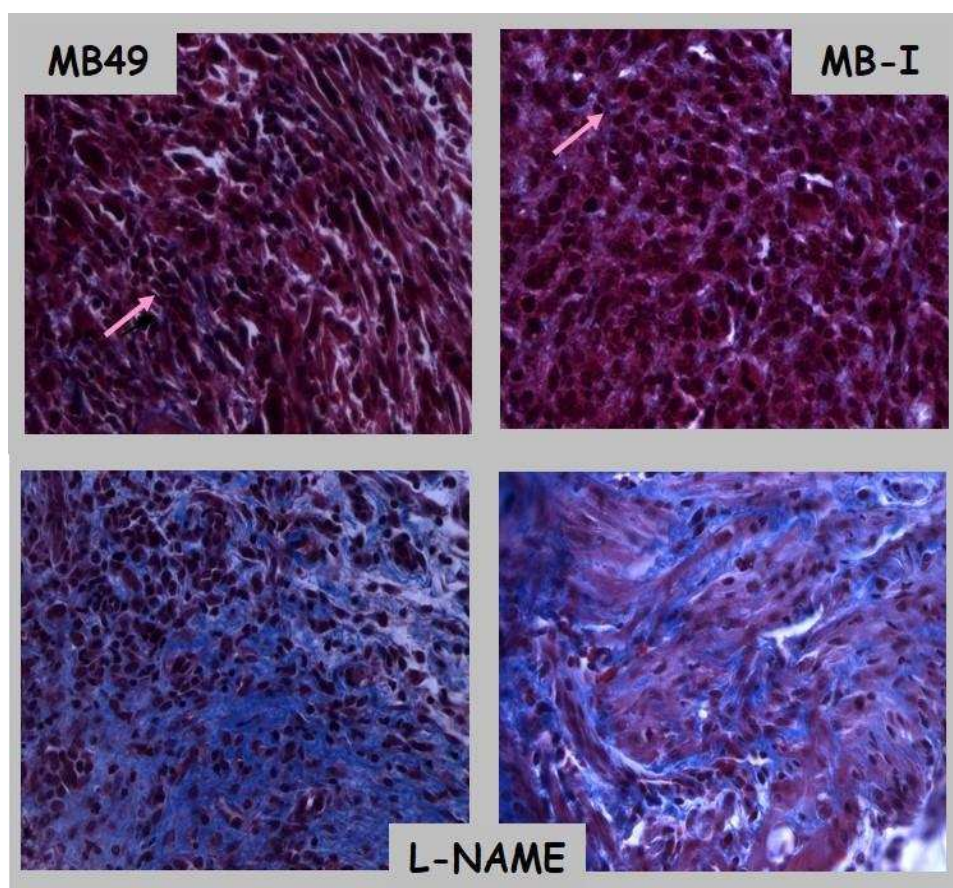


Figura 25: El tratamiento con L-NAME induce regresión tumoral acompañada de la deposición de fibras de colágeno. Coloración tricromica de Masson en cortes histológicos de tumores MB49 y MB49-I creciendo en el subcutáneo de ratones C57BL/6j, a los que se le fue suministrado L-NAME en el agua de la bebida (0.5g/L) a partir del quinto día de inoculación tumoral y a lo largo de todo el experimento. Se evidencian las fibras de colágeno en color celeste (flecha rosa), en algunos focos en los tumores control, y una gran matriz de colágeno en el caso de los tumores tratados Magnificación 400X

3.2 El L-NAME promueve la proliferación de fibroblastos in vitro

Los FB son uno de los principales componentes del estroma y ha sido descrito que los FB tumorales pueden activarse, transformándose en miofibroblastos con características protumorales.

A lo largo de esta tesis no nos fue posible aislar los FB asociados a los tumores, por este motivo, para los siguientes experimentos utilizamos una línea celular, denominada NIH-3T3 y cultivos de FB embrionarios que presentan muchas de las características de los tumorales activados.

De manera de analizar si el L-NAME además de inhibir el crecimiento tumoral, modifica el estroma tumoral, decidimos estudiar el efecto del tratamiento con L-NAME sobre la proliferación de los FB antes mencionados.

Observamos que el tratamiento in vitro, incrementa significativamente el crecimiento de ambas líneas de FB a partir de 0.5uM de L-NAME, sin mostrar dosis dependencia (**Figura 26**), por lo que podemos decir que NO estaría comportándose como un regulador negativo de proliferación en los fibroblastos.

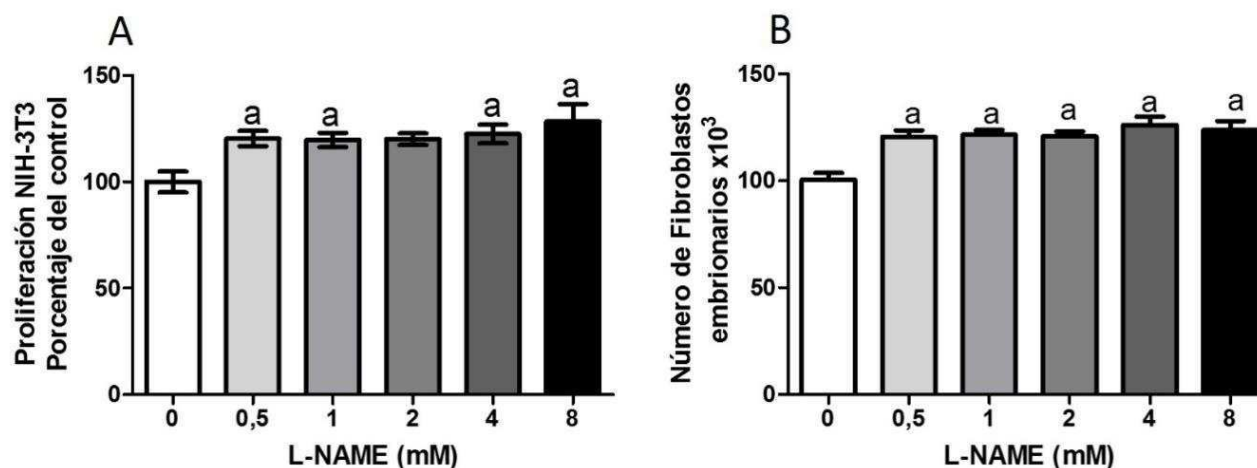


Figura 26: El tratamiento con L-NAME promueve la proliferación de fibroblastos: Proliferación de fibroblastos bajo distintas concentraciones de L-NAME durante 24hs en A) Fibroblastos NIH3T3. Se evaluó proliferación por ensayo de MTS y los resultados se expresan como porcentaje respecto al control a-p<0.001 vs control. B) Fibroblastos Embrionarios y la cantidad de células después del tratamiento se evaluó por conteo con Azul Tripán. Los resultados se expresan como número de fibroblastos embrionarios x10³ a-p<0.001 vs control. ANOVA, contrastes Bonferroni

Para entender si los FB participan de la inhibición del crecimiento tumoral mediado por L-NAME, estudiamos la acción de los medios condicionados (Mc) por FB sobre las líneas tumorales, *in vitro*. Se obtuvieron Mc de FB NIH3T3 o de los embrionarios tratados o no con L-NAME (2mM), y este mismo Mc fue utilizado para tratar células MB49 o MB49-I creciendo en monocapa. Observamos que el Mc tanto de los FB NIH-3T3 como el de los embrionarios tratados con L-NAME, reducen la proliferación de las células de CaV. El Mc de FB sin tratar promueve una leve proliferación en ambas líneas. Estos resultados indican que L-NAME induce en los FB la liberación de productos inhibitorios del crecimiento en las líneas de cáncer de vejiga (**Figura 27A**).

A continuación, decidimos realizar el experimento de manera inversa, para ver si factores solubles liberados por las células tumorales tratadas con L-NAME 2mM podían afectar a la proliferación de los fibroblastos. Observamos, que el Mc de las células

tumorales no modificó la proliferación de los FB, medido como actividad metabólica y recuento celular, en el caso de los FB embrionarios (**Figura 27**).

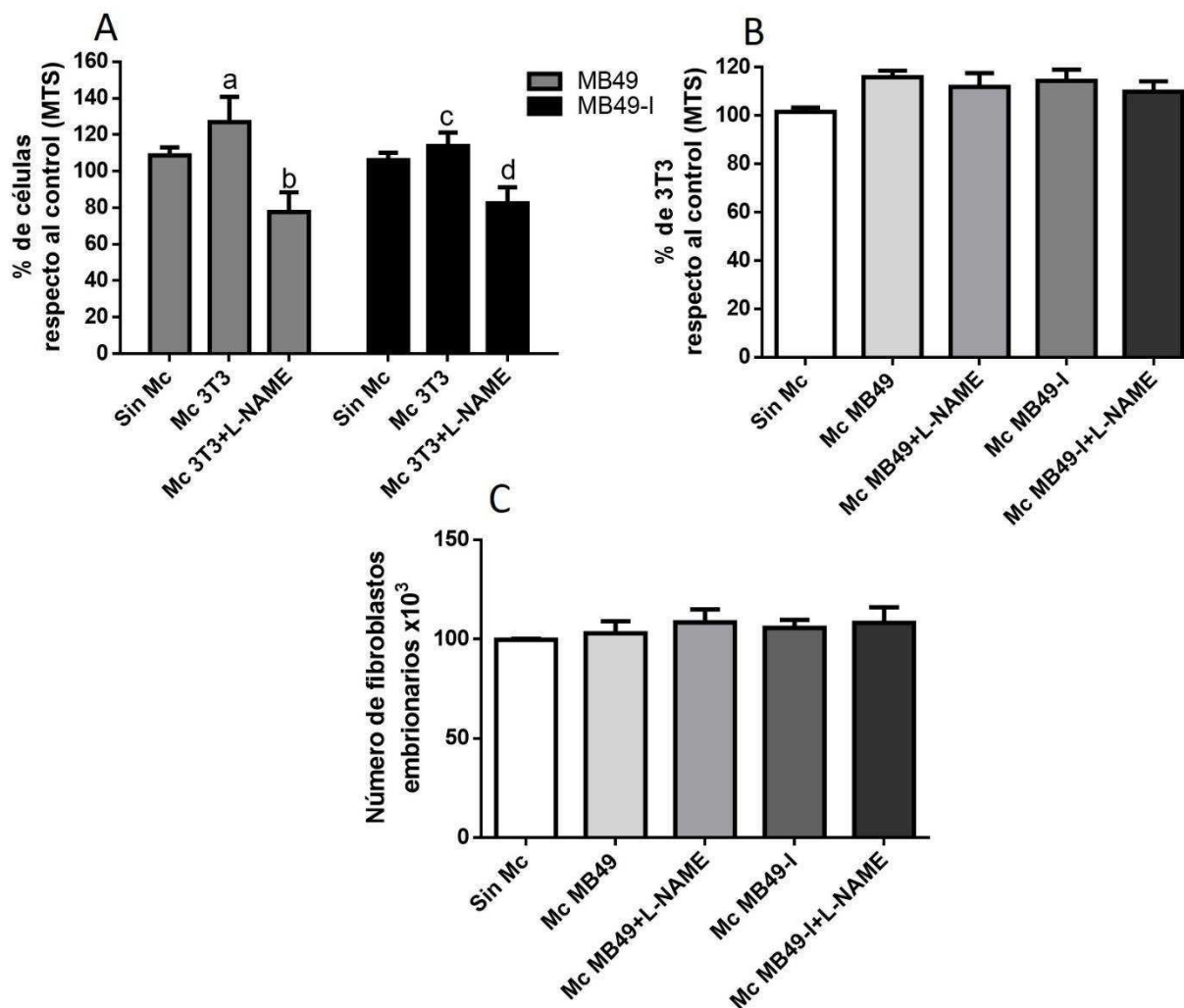


Figura 27 Proliferación de células de CaV y FB en respuesta a Mc: A) Proliferación de células MB49 y MB49-I tratados durante 48hs con Mc de FB NIH- tratados in vitro con L-NAME 2mM. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control. a- $p < 0.001$ vs control; b- $p < 0.001$ vs Mc NIH-3T3; c- $p < 0.05$ vs control; d- $p < 0.001$ vs Mc 3T3. ANOVA, contrastes Bonferroni. B y C) Proliferación de FB NIH-3T3 y embrionarios tratados durante 48hs con Mc de células MB49 y MB49-I tratadas con L-NAME 2mM. La viabilidad celular se evaluó por MTS en el caso de los NIH-3T3 y por recuento celular en el caso de los embrionarios.

3.3 Los fibroblastos tratados *in vitro* con L-NAME presentan actividad anti tumoral

Sabiendo, entonces que los FB via productos solubles pueden inhibir el crecimiento de las células de CaV realizamos un experimento *in vivo* para verificar esta actividad. Para ello, se utilizaron fibroblastos embrionarios de ratones C57BL/6J los cuales fueron tratados o no con L-NAME 2mM durante 48hs, para luego ser co-inoculados en ratones C57BL/6J junto con las células tumorales MB49 o MB49-I en una relación 1:4. A la semana se realizó un segundo inóculo intratumoral con, de manera que la relación final fue FB:celulas tumorales 2:4.

Observamos que los FB embrionarios normales, en ambos casos aumentan levemente el tamaño tumoral, en concordancia con lo observado *in vitro*, mientras que en el caso de los tumores MB49, los tratados con L-NAME presentan una actividad antitumoral significativa (**Figura 28A**).

En el caso de los tumores MB49-I, la inoculación de FB no modificó el crecimiento tumoral, sin embargo, produjo un incremento significativo en la supervivencia global de los ratones portadores de tumor MB49-I + FB L-NAME (**Figura 28B C**).

En base a estos resultados podemos decir que el inhibidor de la producción de NO, induce la inhibición tumoral por al menos dos vías independientes. Una, a través de la inhibición del crecimiento de las células tumorales, dependientes de NO, y la otra, a través de la inducción de fibroblastos con propiedades antitumorales.

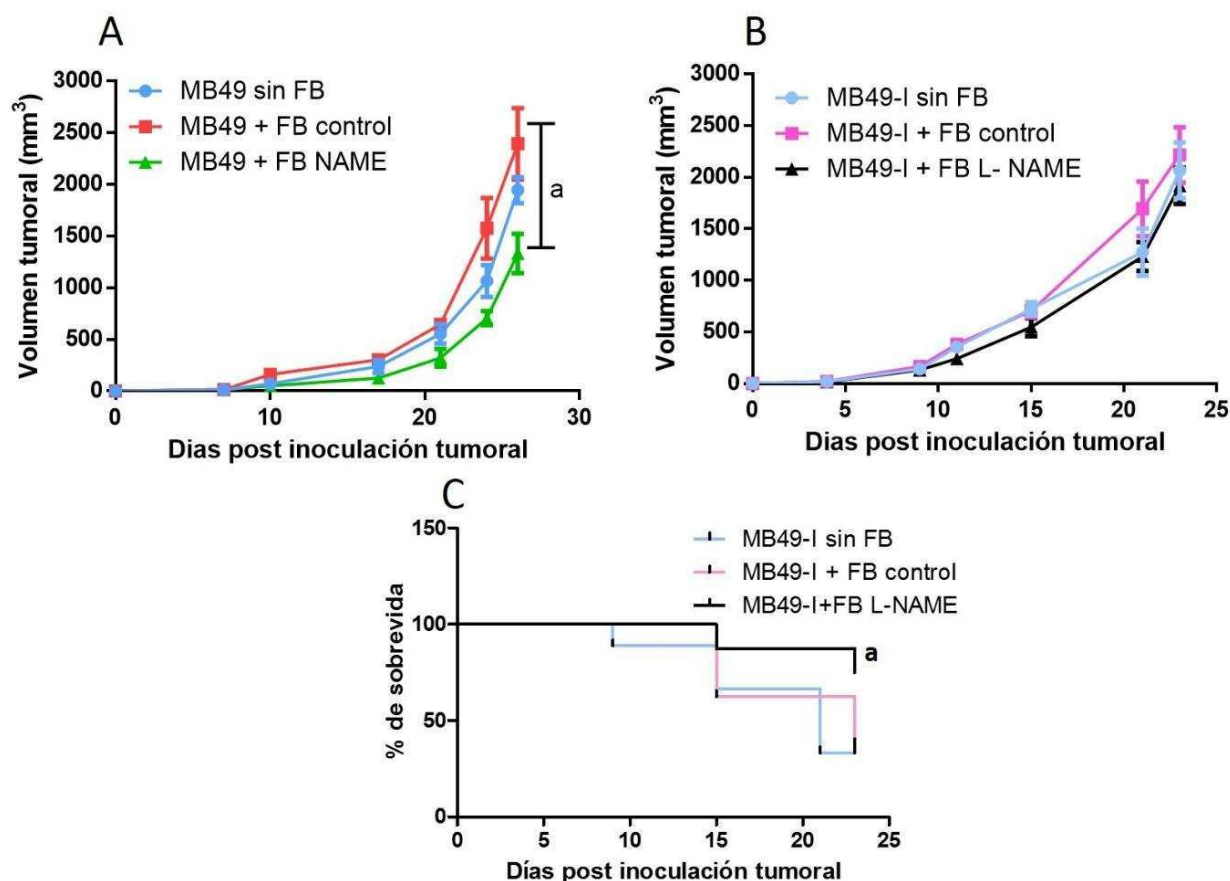


Figura 28: Los fibroblastos tratados in vitro con L-NAME presentan actividad antitumoral. Crecimiento subcutáneo de células Mb49 y MB49-I (2×10^5 /ratón) que fueron co-inoculadas con fibroblastos embrionarios (0.5×10^5 /ratón). A los 7 días se realizó un segundo inculo con fibroblastos (0.5×10^5 /ratón). Los fibroblastos fueron tratados in vitro previamente a la inoculación con 2mM L-NAME. A) Curvas de crecimiento tumoral MB49. a- $p < 0.05$ MB49 + FB L-NAME vs MB49 + FB control. Test Kruskal- Wallis, comparaciones de Dunn. B) Curva de crecimiento tumoral MB49-I. C) Porcentaje de sobrevivencia de ratones co-inoculados con MB49-I y fibroblastos embrionarios. Se utilizó el Test "Log-rank (Mantel-Cox)" con comparaciones de Gehan-Breslow-Wilcoxon a- $p < 0,05$ vs MB49-I sin FB y MB49 + FB control.

4. TRATAMIENTO CON L-NAME EN EL MODELO ORTOTÓPICO

4.1 El L-NAME inhibe el crecimiento de tumores de vejiga, la expresión de iNOS y los niveles de nitrito en orina

Como se dijo anteriormente, el sitio de inoculación tumoral es un punto importante a tener en cuenta. Si bien, la mayoría de los estudios se realizan utilizando la inoculación subcutánea, la inoculación ortotópica es la que permite evaluar más correctamente las interacciones huésped-tumor. A través de la implantación ortotópica pudimos obtener tumores con parámetros de relevancia clínica en un periodo de quince días, obteniendo tumores con una baja concentración de células, de alta incidencia y reproducibilidad. Las líneas MB49 y MB49-I fueron inoculadas en las vejigas de hembras C57BL/6J. El L-NAME, al igual que en el modelo subcutáneo fue suministrado en el agua de la bebida (0.5g/L) a partir del quinto día de inoculación tumoral, y a lo largo de todo el experimento. En concordancia con lo observado en el crecimiento subcutáneo, detectamos que la inhibición de la producción de NO reduce el crecimiento tumoral de ambos tumores, evaluados como peso final de la vejiga, y comparado con el peso de vejigas normales, provenientes de ratones sin tumor. El análisis histopatológicos de las vejigas confirmaron que sólo el 14% de los ratones portadores de tumor tratados con L-NAME presentaron rastros tumorales en el caso del tumor MB49, y sólo el 17% en el caso de los tumores MB49-I. Es posible observar, en la **Figura 29C** la diferencia en el tamaño de las vejigas. Las vejigas con tumores MB49-I fueron significativamente mayor que las vejigas normales y que las vejigas con tumores MB49. Se observa que el tratamiento con L-NAME reduce el tamaño de las mismas asemejándolas al de una vejiga normal, detectándose solamente algunos focos tumorales en las vejigas tratadas. Por otro lado, el análisis histopatológico demostró que mientras los tumores MB49-I son invasores del músculo, en los tumores tratados con L-NAME no sólo se ve una disminución del tamaño tumoral sino que no se detecta invasión del músculo detrusor (**Figura 30**).

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 [159]. A lo largo de los experimentos ortotópicos, una mayor proporción de ratones portadores de tumor ortotópico MB49-I presentaron hematuria, cuando se los compara con los generados por MB49. La presencia de hematuria, fue aún menor en los ratones tratados con L-NAME en ambos casos (dato no mostrado).

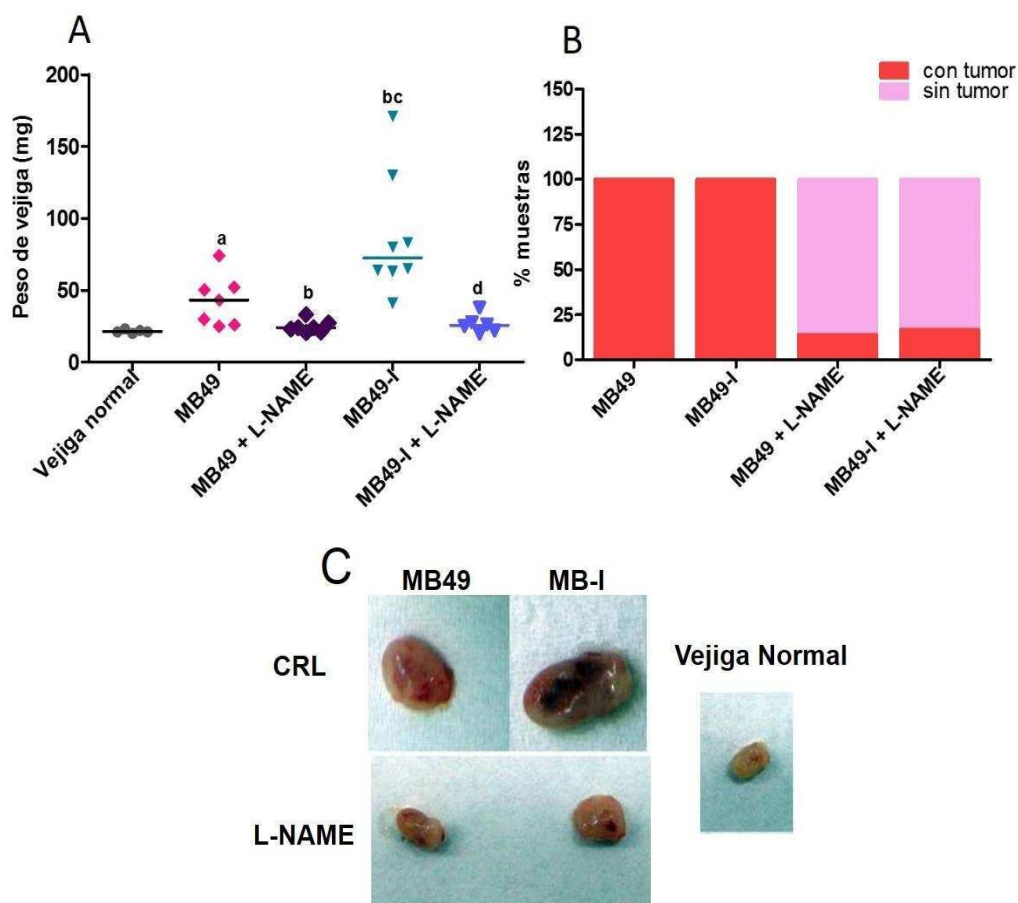


Figura 29 La inhibición de la producción de NO inhibe el crecimiento de tumores ortotópicos A) Hembras C57BL/6J fueron inoculadas ortotópicamente en la vejiga con 2×10^4 células MB49 o MB49-I. El L-NAME fue suministrado 5 días posteriores a la inoculación por vía oral en el agua de la bebida (0.5g/L). A) El tamaño tumoral fue determinado con el peso de la vejiga. Test de Kruskal Wallis con comparaciones de Mann-Whitney a- $p < 0.05$ vs vejiga normal; b- $p < 0.05$ vs MB49; c- $p < 0.01$ vs vejiga normal; d- $p < 0.001$ vs MB49-I. B) Porcentaje de ratones con/sin tumor. C) Fotos representativas de vejiga normal y con tumor MB49 y MB49-I +/- L-NAME

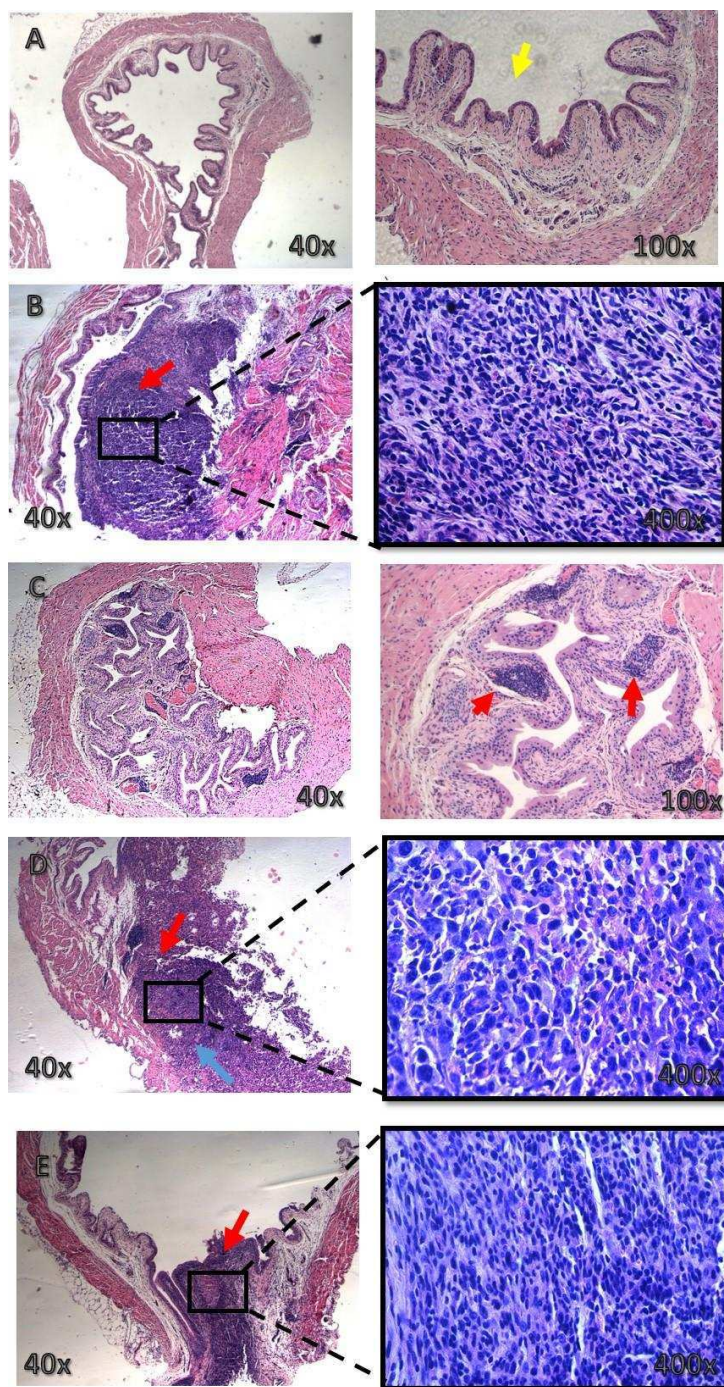


Figura 30 : El tratamiento con L-NAME reduce el crecimiento de tumores MB49 y MB49-I: Cortes histológicos de tumores ortotópicos MB49 y MB49-I tratados o no con L-NAME (0.5g/L) en el agua de la bebida. Tinciones para Hematoxilina y Eosina aumentos de 40x, 100x. Las microfotografías a la derecha muestran un detalle a mayor aumento (400X) del área recuadrada en las microfotografías a la izquierda. A) Vejiga Normal, B) Tumor MB49, C) Tumor MB49+L-NAME, D) Tumor MB49-I y E) Tumor MB49-I+L-NAME. La flecha amarilla indica el epitelio normal, la roja indica zona tumoral y la celeste la zona de invasión del músculo.

Sabiendo que los tumores MB49 y MB49-I poseen expresión de iNOS, y son productores de NO, y teniendo en cuenta que los tumores se encuentran en la vejiga, decidimos medir los niveles de NO, como nitrito, en la orina de ratones portadores de tumor, determinando el nitrito ya que es uno de los productos de la combinación del NO en solución acuosa. En concordancia con lo observado *in vitro*, encontramos niveles elevados de nitrito en la orina de ratones portadores de tumores de vejiga, mayores en el caso de los tumores MB49-I en comparación con los niveles encontrados en ratones sin tumor y portadores de tumor MB49. Observamos que el tratamiento con L-NAME disminuyó los niveles de NO en la orina de ratones con ambos tumores (**Figura 31A**). Interesantemente, encontramos una correlación positiva entre los niveles de NO y el tamaño tumoral, indicando que dichos niveles estarían en estrecha relación con el tamaño tumoral (**Figura 31B**). Este hallazgo resulta interesante, ya que la evaluación de presencia de NO en orina podría ser utilizado para monitorear el estado tumoral, siendo que el principal método de seguimiento de los tumores vesicales que se utiliza en la actualidad es la cistoscopia, técnica que resulta invasiva para el paciente.

En concordancia también con lo observado *in vitro* determinamos la expresión de iNOS en los tumores sustraídos y observamos que los tumores MB49-I presentan mayor expresión de la enzima, y que el tratamiento con L-NAME no sólo disminuyó la actividad de la enzima, sino también su expresión, en ambos tumores (**Figura 31C**).

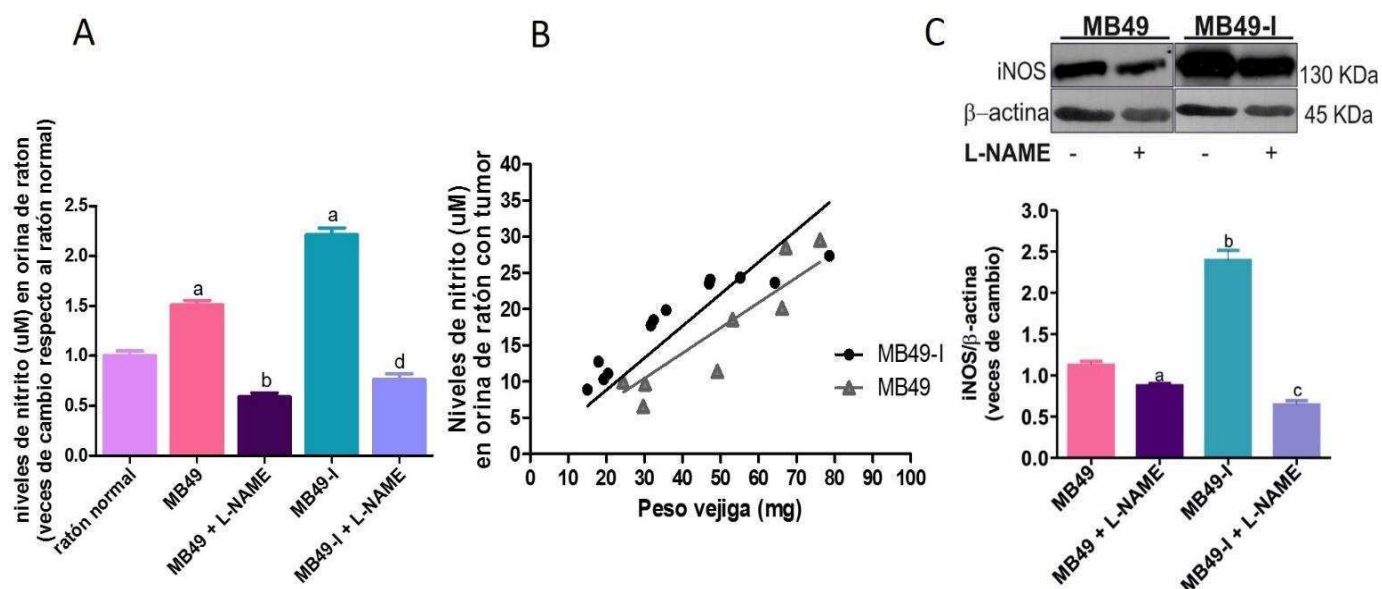


Figura 31: El L-NAME inhibe los niveles de nitrito en orina de ratones portadores de tumor: 2×10^4 células MB49 y MB49-I fueron inoculadas en la vejiga de hembras C57BL/6J. El L-NAME fue suministrado por vía oral en el agua de la bebida a partir de los 5 días de inoculación tumoral (5g/L). A) La producción de NO, medido como nitrito con el reactivo de Griess, al día del sacrificio. Test Kruskal Wallis, con contrastes de Mann-Whitney a- $p < 0.05$ vs ratón normal; b- $p < 0.01$ vs MB49; c- $p < 0.001$ vs MB49-I. B) Correlación entre los niveles de nitrito en orina a día final del experimento y el peso de las vejigas. R_2 : 0.82 (MB49-I); 0.78 (MB49). C) Se extrajeron las vejigas a día final del experimento y por western blot se analizó la expresión de iNOS. Unidades densitométricas de iNOS fueron determinadas utilizando el software GelPro Analyzer, relativizado por β -actina, y referidas como veces de cambio respecto al control. ANOVA, contraste Bonferroni, a- $p < 0.05$ vs MB49; b- $p < 0.001$ vs MB49; c- $p < 0.001$ vs MB49-I.

Además de analizar la expresión total de iNOS por western blot, evaluamos el patrón de expresión de la enzima en el urotelio normal y en el tumor. Observamos, al igual que sucede en pacientes, que la enzima no se expresa en el urotelio de la vejiga normal de los ratones, pero si lo hace, y de manera intensa en el urotelio de ratones portadores de tumor MB49-I, y en menor medida en los portadores de MB49. La expresión se observa principalmente en citoplasma y en menor medida nuclear. Nuestros resultados indican, que el tratamiento con L-NAME reduce la expresión de la enzima tanto en el urotelio como en la zona tumoral, en ambos casos (**Figura 32**).

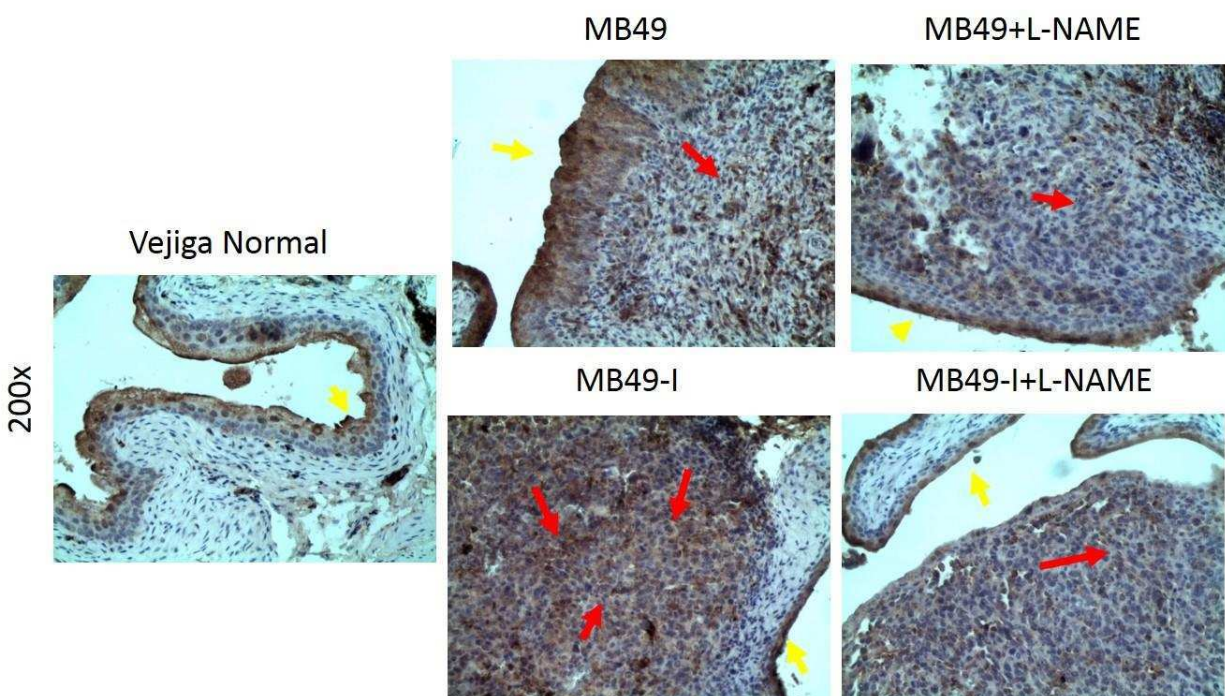


Figura 32: El tratamiento con L-NAME disminuye la expresión de iNOS: Expresión de iNOS en vejiga normal y en los tumores ortotópicos MB49 y MB49-I tratados o no con L-NAME 2mM, suministrado por vía oral en el agua de la bebida, a partir del quinto día de inoculación tumoral y a lo largo de todo el experimento. La expresión de iNOS se evaluó por inmunohistoquímica. Las flechas amarillas indican el urotelio, las rojas el tumor. Aumento 200X.

5. INHIBIDORES ESPECIFICOS DE iNOS

Los resultados presentados hasta aquí fueron realizados con L-NAME, inhibidor de las NOS. Esto significa que inhibe con igual afinidad a todas las isoformas de la enzima, tanto la eNO, nNOS e iNOS. Ya que nuestros resultados muestran que la inhibición de la producción de NO inhibe el crecimiento y la progresión de los tumores de vejiga que expresan iNOS, haremos foco ahora en la inhibición específica de iNOS. Para ello, utilizaremos dos estrategias; el uso de inhibidores farmacológicos específicos de iNOS, como 1400w y S-Methylisothiurea (SMT) y el silenciamiento estable de iNOS.

5.1 Inhibidores específicos de iNOS también inhiben la proliferación de células de CaV, los niveles de NO y la expresión de NO

Utilizando los inhibidores específicos, observamos una inhibición en la proliferación de las células MB49 y MB49-I en forma dosis dependiente. El 1400w, en comparación con el SMT, presentó mayor inhibición de proliferación, presentando una dosis inhibitoria 50 (DI₅₀) de 3 μ M y 2 μ M, mientras que la DI₅₀ del SMT resultó 5 μ M y 10 μ M para MB49 y MB49-I respectivamente, Asimismo, el 1400w presentó mayor eficiencia en inhibir la actividad de iNOS en ambas líneas celulares. (**Figura 33**).

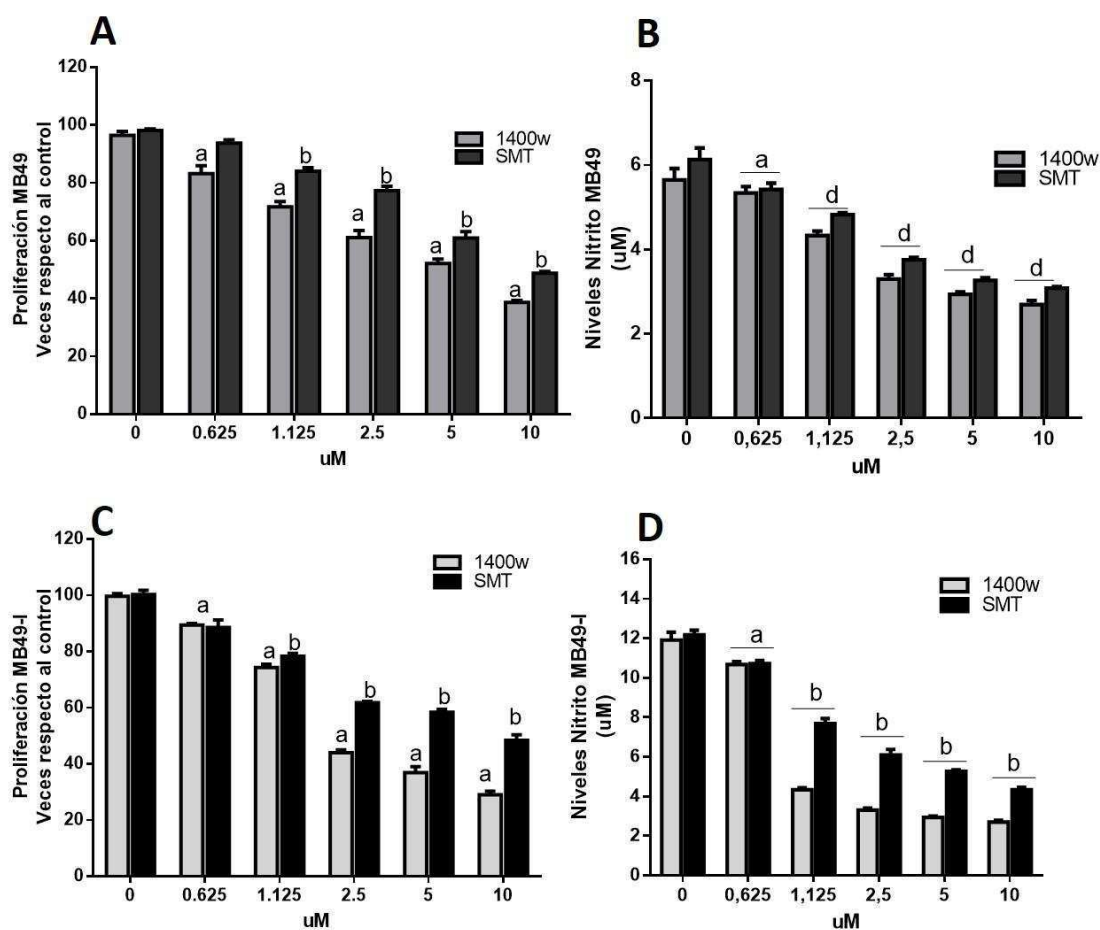


Figura 33: El tratamiento con 1400w y SMT inhibe la proliferación de células MB49 y MB49-I, de manera dosis dependiente: A y C) Proliferación de células MB49 y MB49-I tratadas in vitro durante 48 hs con distintas dosis de 1400w y SMT (0.625; 1.125; 2.5; 5; 10 μM). La proliferación se evaluó por MTS y los resultados se expresan como porcentaje respecto al control. a- $p < 0.001$ vs control; b- $p < 0.05$, ANOVA, contrastes de Bonferroni. B y D) Producción de nitrito: Células fueron tratados durante 48 hs y se midió el nitrito por reactivo de Griess en el medio condicionado. a- $p < 0.001$ vs control; b- $p < 0.0001$ vs control, ANOVA, contrastes Bonferroni.

Dado que observamos que el 1400w presentó un mejor efecto inhibiendo la actividad de la enzima, en los sucesivos experimentos se decidió utilizar dicho inhibidor. Ya que luego del tratamiento con L-NAME observamos además de la modulación de la actividad enzimática de iNOS una modulación en su expresión, decidimos determinar en este caso si la expresión de iNOS se veía modulada luego del tratamiento con 1400w.

Observamos por inmunofluorescencia, al igual que sucede con L-NAME, la expresión de iNOS se reduce (**Figura 34**).

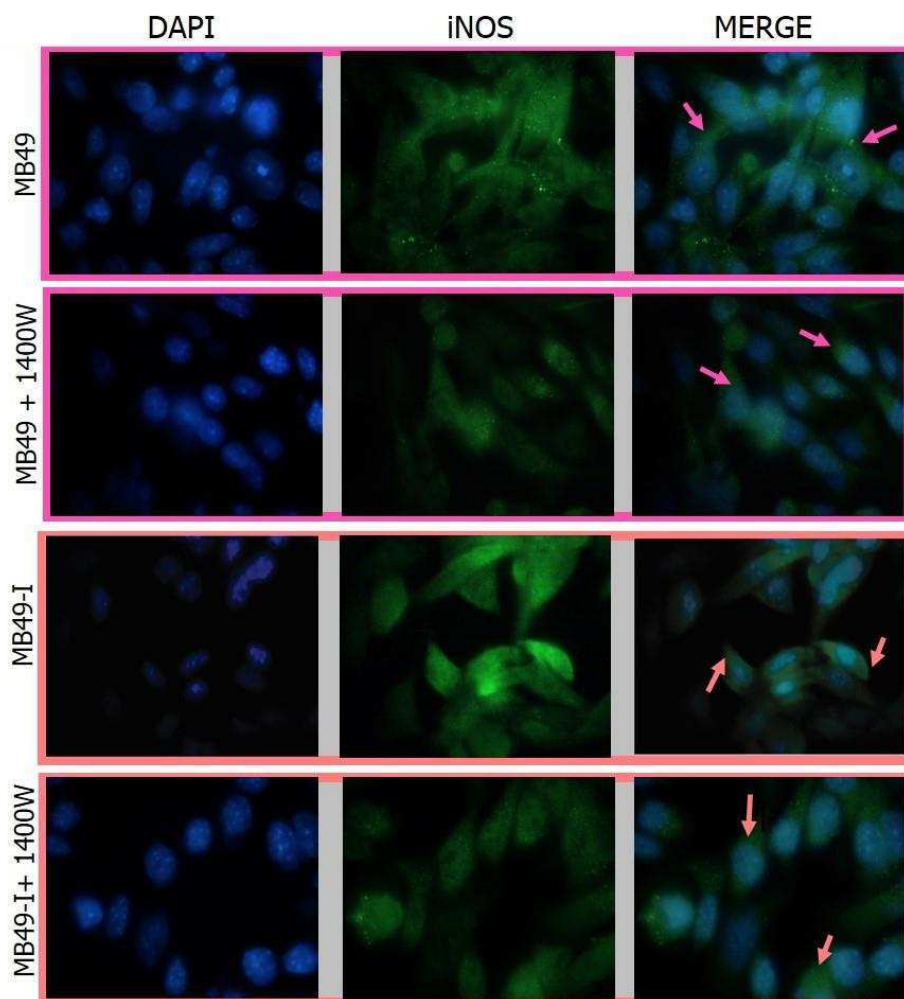


Figura 34: Inmunofluorescencia para iNOS. Se observa la disminución de la marcación citoplasmática en ambas líneas tumorales (flechas naranjas), aunque en mayor medida en la MB49-I, luego del tratamiento durante 24 hs con 1400w. Los núcleos fueron marcados con DAPI. Magnificación 1000x

5.1 1400w inhibe el crecimiento tumoral in vivo

A continuación analizamos el efecto del 1400w, siendo que presentó una actividad inhibitoria mayor que el SMT, sobre el crecimiento ortotópico de las líneas de CaV, Es así, que las líneas MB49 y MB49-I fueron inoculadas en las vejigas de hembras C57BL/6J, y el 1400w fue administrado directamente de manera endovesical en una concentración de $8\mu\text{M}$, dos veces por semana, a partir del segundo día de inoculación tumoral. En concordancia con lo observado en el tratamiento con L-NAME, detectamos que el inhibidor específico de iNOS, administrado directamente en la vejiga reduce el crecimiento tumoral de ambos tumores, evaluado como peso final de la vejiga, y comparado con el peso de vejigas normales, sin tumor (**Figura 35A**).

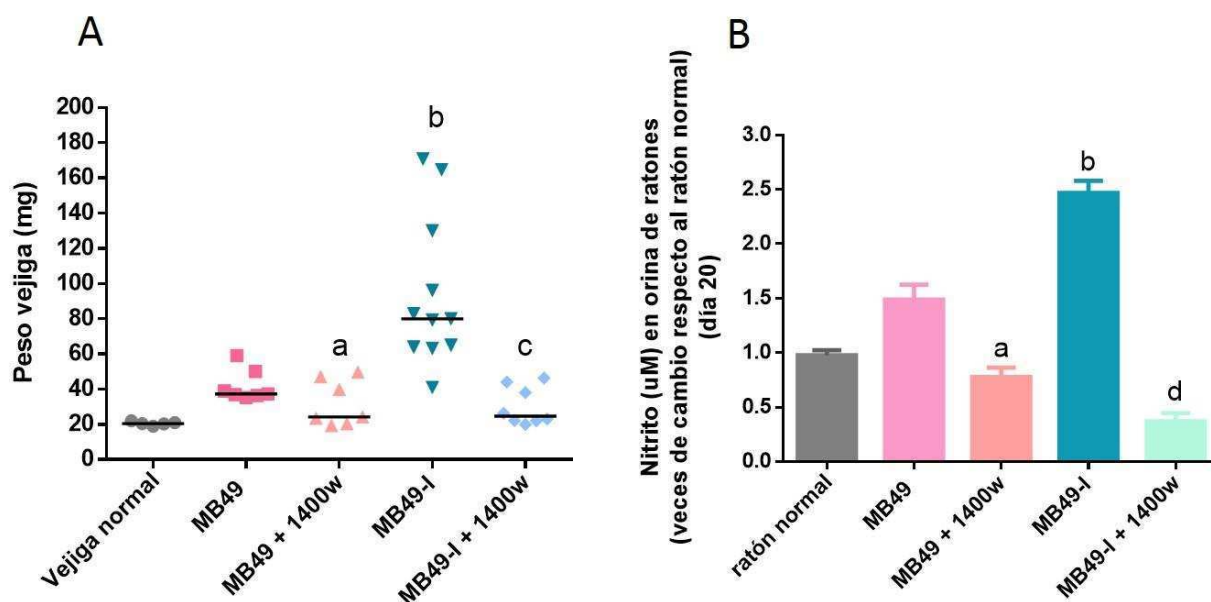


Figura 35: A) Hembras C57BL/6J fueron inoculadas ortotópicamente en la vejiga con 2×10^4 células MB49 o MB49-I. El 1400w fue suministrado 2 días posteriores a la inoculación tumoral, dos veces por semana vía endovesical ($8\mu\text{M}$). El tamaño tumoral fue determinado con el peso de la vejiga. Test de Kruskal Wallis con comparaciones de Mann-Whitney a- $p < 0.05$ vs MB49; b- $p < 0.001$ vs. vejiga normal; c- $p < 0.001$ vs MB49-I. B) La producción de NO medido con el reactivo de Griess, al día 20, día del sacrificio. Test Kruskal Wallis, con contrastes de Mann-Whitney a- $p < 0.05$ vs MB49; b- $p < 0.001$ vs MB49; c- $p < 0.0001$ vs MB49-I.

El análisis histopatológico de las vejigas confirmó que el tratamiento inhibió el crecimiento tumoral en el 71% y 57% de los ratones portadores de tumores MB49-I y MB49, respectivamente (**Figura 36**)

Previo al sacrificio de los animales, se recolectó orina para determinar los niveles de nitrito en muestras individuales de cada ratón, observándose una significativa reducción en los ratones portadores de ambos tumores, tratados con 1400w (**Figura 35B**). Observamos, asimismo que el tratamiento endovesical, además de reducir la actividad enzimática de iNOS, redujo su expresión, determinado en corte de tumores ortotópicos, por inmunohistoquímica observándose una marcada reducción en el caso de los tumores invasores. (**Figura 37**).

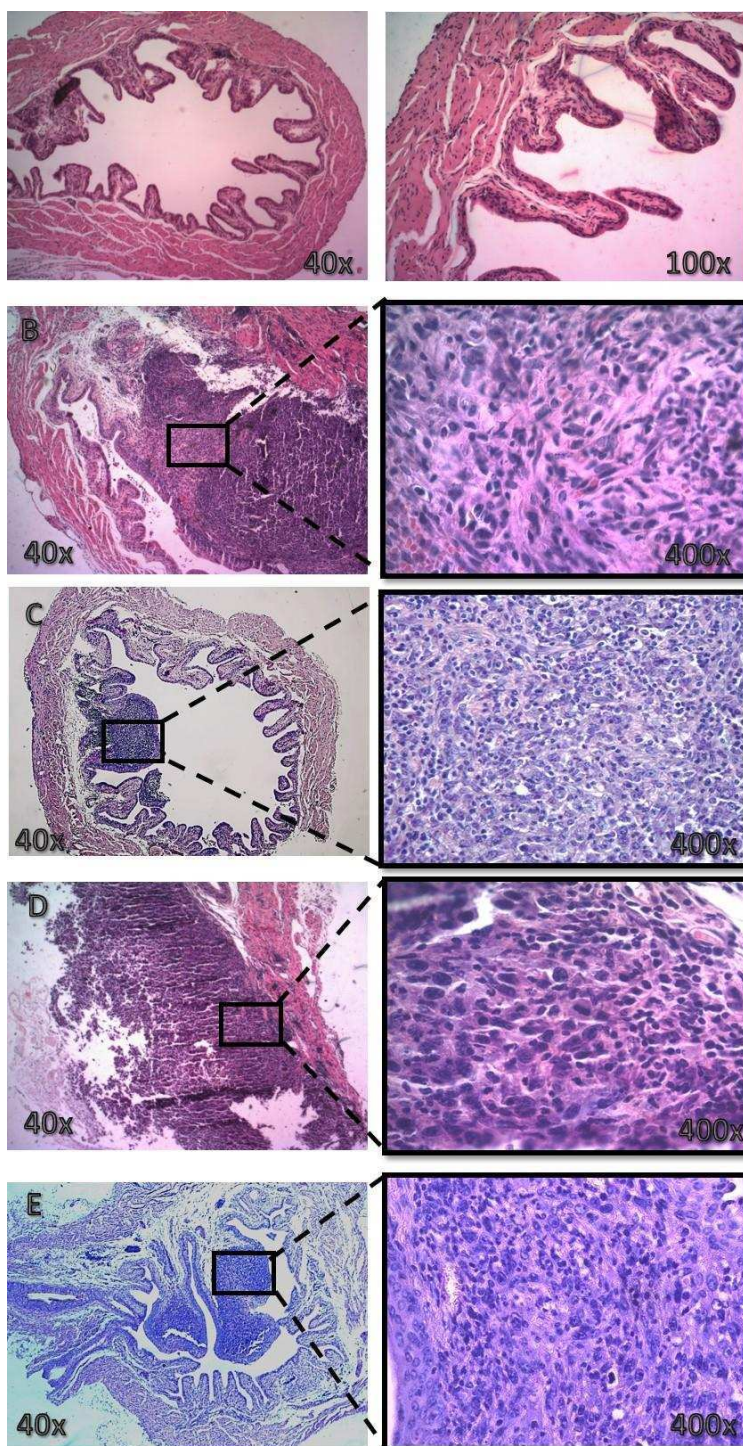


Figura 36: El tratamiento con 1400w reduce el crecimiento de tumores MB49 y MB49-I: Cortes histológicos de tumores ortotópicos MB49 y MB49-I tratados o no con 1400w ($8\mu\text{M}$) de manera endovesical dos veces por semana. Tinciones con Hematoxilina y Eosina con aumentos de 40x, 100x. Las microfotografías a la derecha muestran un detalle mayor aumento (400X) del área recuadrada en las fotografías a la izquierda. A) Vejiga Normal, B) Tumor MB49, C) Tumor MB49+1400w, D) Tumor MB49-I y E) Tumor MB49-I+1400w

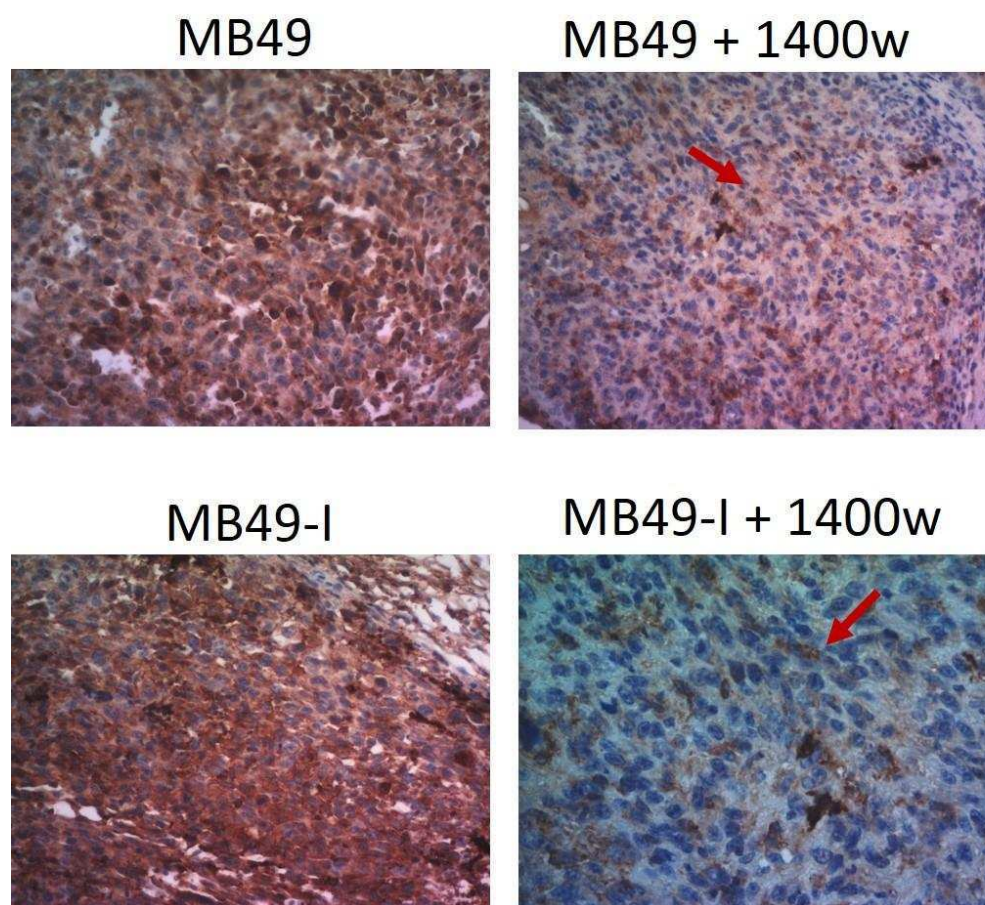


Figura 37: El tratamiento con 1400w disminuye la expresión de iNOS: Expresión de iNOS en vejiga normal y en los tumores ortotópicos MB49 y MB49-I tratados o no con 1400w ($8\mu\text{M}$), suministrado por vía endovesical, a partir del quinto día de inoculación tumoral, dos veces por semana. La expresión de iNOS se evaluó por inmunohistoquímica. Las flechas rojas indican expresión a nivel de las células tumorales. Aumento 200X y 400X

Hasta aquí, todos los experimentos con L-NAME fueron realizados de manera sistémica, mientras que el 1400w fue administrado localmente.

A continuación, se realizó un experimento para comparar la actividad de ambos inhibidores administrados endovesicalmente sobre el crecimiento de tumores

ortotópicos. La **Figura 38** muestra que mientras el 1400w promueve la inhibición de los tumores invasores, el L-NAME no fue igual de eficaz que de manera sistémica.

Estos resultados indican que efectivamente iNOS se encuentra determinando la ventaja de crecimiento tumoral, ya que 1400w, resultó más efectivo que L-NAME, dado que inhibe específicamente a iNOS. Posiblemente, la administración sistémica de L-NAME, además de inhibir iNOS, encuentre afectando la expresión de eNOS, reduciendo así la angiogénesis tumoral y en consecuencia el crecimiento tumoral.

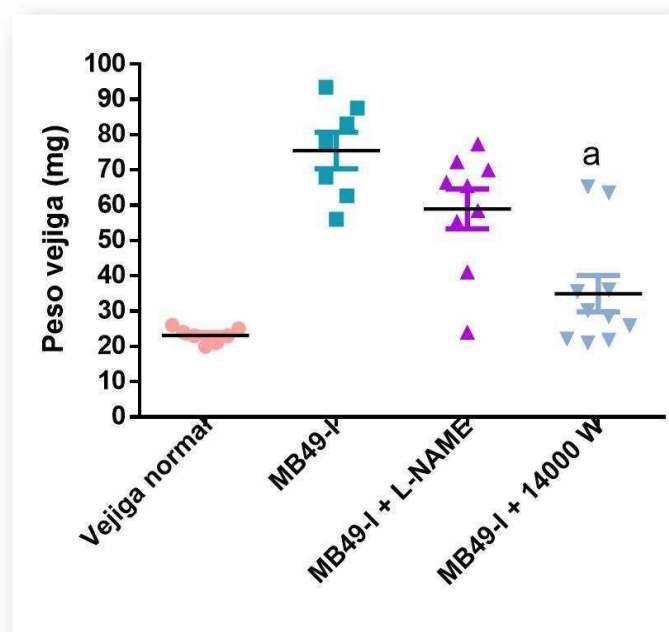


Figura 38: Tratamiento con inhibidores de manera endovesical: Hembras C57BL/6J fueron inoculadas ortotópicamente en la vejiga con 2×10^4 células MB49 o MB49-I. Tanto el L-NAME (2mM) como el 1400w ($8 \mu\text{M}$) fueron administrados a los 5 días posteriores de la inoculación tumoral, dos veces por semana de manera endovesical. El tamaño tumoral fue determinado con el peso de la vejiga. Test de Kruskal Wallis con comparaciones de Mann-Whitney $\alpha\text{-}p < 0.05$ vs MB49-I;

5.3 El tratamiento con 1400w reduce la angiogénesis tumoral in vivo

Ya describimos que la capacidad angiogénica es fundamental para el desarrollo tumoral, y que en este caso depende directamente de la producción de NO, ya que al ser inhibido de manera sistémica, la neovascularización hacia el tumor se ve reducida (**Figura 26**). A continuación evaluamos la actividad angiogénica con un ensayo similar al descrito previamente con L-NAME, con la diferencia de que en este caso, el 1400w (8 μ M) fue administrado junto con las células tumorales, y no de manera sistémica. Similar a lo observado con el tratamiento con L-NAME, los ratones que recibieron el 1400w, presentaron una significativa reducción en el número de vasos, comparado con los ratones sin tratamiento. Este resultado sugiere que es el NO generado por iNOS el responsable de la angiogénesis. Teniendo en cuenta esto, un inhibidor específico como 1400w podría ser un tratamiento adecuado para inhibir este proceso y controlar así el crecimiento y diseminación metastásica.

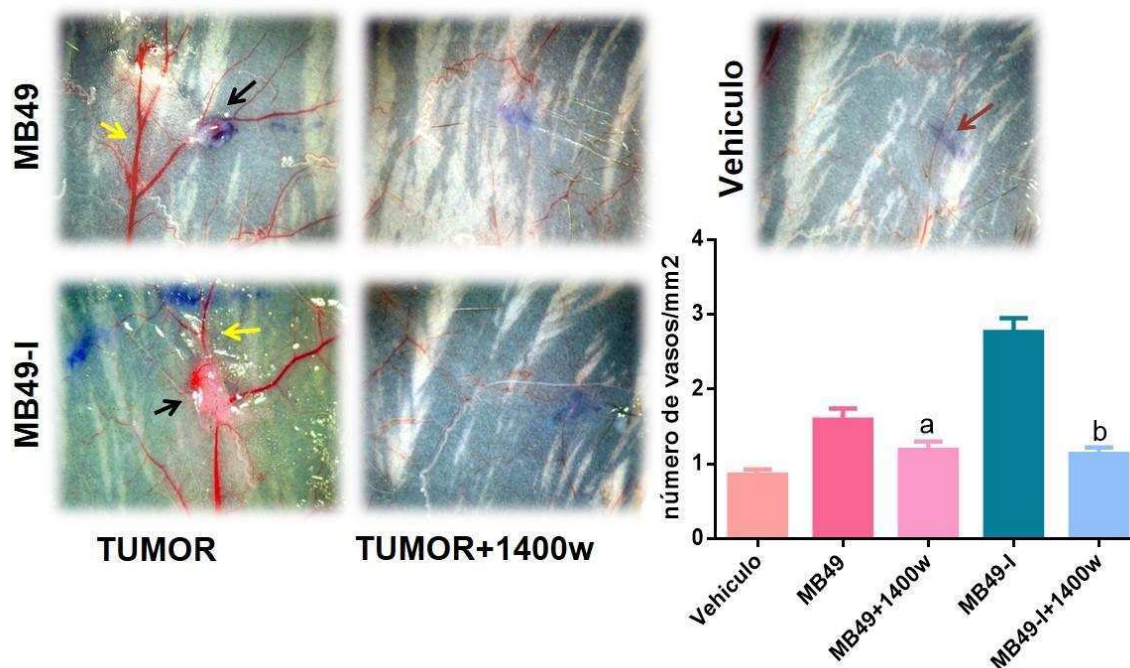


Figura 39: La utilización de inhibidor específico de iNOS disminuye la angiogénesis generada por tumores de vejiga: Ratones C57BL/6j fueron inoculados intradérmicamente con células 2×10^4 MB49 y MB49-I junto con una gota de azul tripán para identificar la zona de inoculación. El 1400w fue administrado conjuntamente con las células tumores, en los grupos tratados el mismo día de la inoculación. La angiogénesis se observó cinco días posteriores a la inoculación tumoral. Se cuantificaron los vasos sanguíneos a través del programa Image J, y la angiogénesis es reportada como el número de vasos/mm² de piel. Las fotografías fueron tomadas con lupa estereoscópica bajo 16x de aumento. La flecha roja identifica la zona de inoculación, las amarillas los vasos, y las negras indican el tumor. Teste de Kruskal Wallis, con comparaciones múltiples de Dunn. a- $p < 0.01$ vs MB49; b- $p < 0.001$ vs MB49-I.

5.5 Ablación genética de iNOS

Para confirmar la relevancia de la iNOS en el crecimiento de las células de CaV, además de inhibirla farmacológicamente, silenciamos su expresión utilizando un shRNA, mediante infección con lentivirus. Para este análisis, se silenció el gen que codifica para iNOS únicamente en la línea MB49-I, la que presenta mayor expresión de iNOS y produce mayores cantidades de NO. Observamos, en la **Figura 40A** a través de ensayos

de western blot, que la línea MB49-I pudo ser satisfactoriamente silenciada, y que su expresión se redujo más del 50%. Se trató a las células durante 24hs con TNF α (10ng/ml), conocido inductor de la expresión de iNOS, y mientras se observó una importante inducción de iNOS en el caso del MB49-I-scrambled (150%), en las células silenciadas se observa una leve inducción, mostrando un silenciamiento exitoso. Además de analizar el nivel de expresión de iNOS, analizamos su actividad midiendo los niveles de nitrito, y en concordancia con lo observado en la expresión, los niveles de nitrito disminuyen significativamente en la línea silenciada.

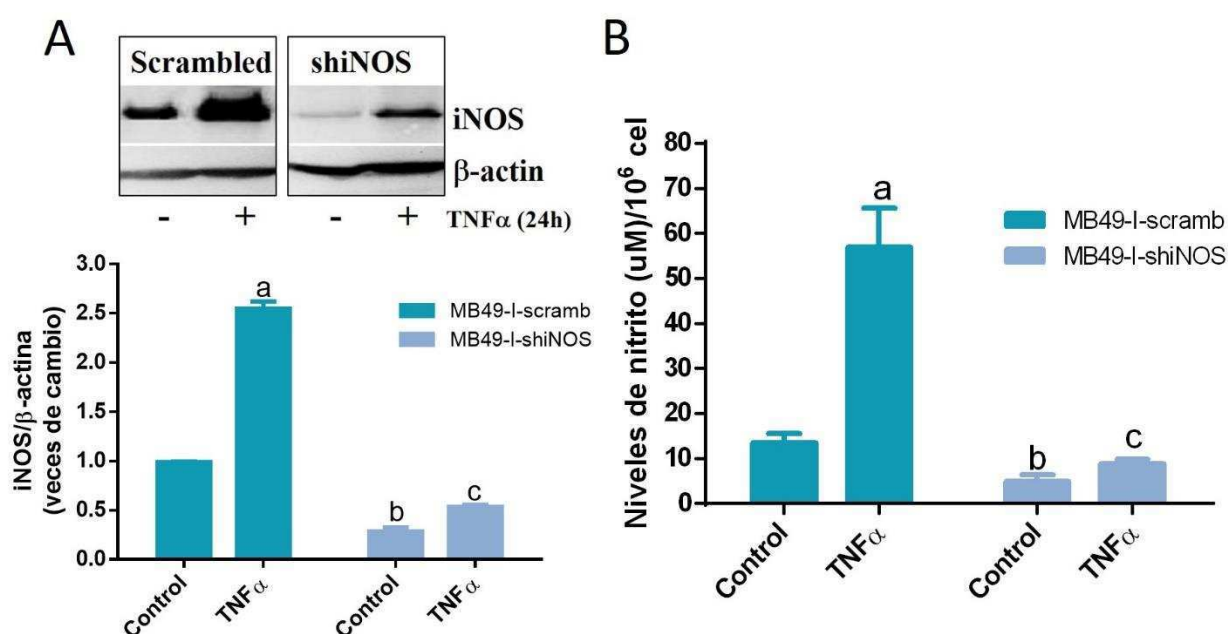


Figura 40: Ablación genética de la expresión de iNOS en células MB49-I: A) Lisados de células MB49-I-shiNOS y su respectivo control MB49-I-scrambled tratado o no con TNF α 10ng/ml fueron analizados por western blot para evaluar expresión de iNOS luego del silenciamiento por medio de infección lentiviral. ANOVA, contrastes Bonferroni a- $p < 0.0001$ vs MB49-I scrambled control, b- $p < 0.001$ vs MB49-I-scrambled control; c- $p < 0.0001$ vs MB49-I-scrambled TNF α . B) Producción de NO: células MB49-I-scr y Mb49-I-shiNOS fueron tratadas durante 24hs con TNF α 10ng/ml, y se midió niveles de nitrito por reactivo de Griess en medio condicionado. ANOVA, contrastes Bonferroni a- $p < 0.001$ vs control; b- $p < 0.0$ vs MB49-I-scr control; c- $p < 0.05$ vs MB49-I-shiNOS control.

5.6 La ablación genética de iNOS disminuye el crecimiento tumoral in vivo

Las células silenciadas y las scrambled fueron también transducidas con un vector de expresión de la enzima luciferasa, obteniéndose las siguientes líneas estables: MB49-I-scrambled-Luc y MB49-I-shiNOS-Luc. Con estas células se realizaron experimentos para evaluar el crecimiento tumoral en tiempo real, analizando tanto el crecimiento heterópico como el ortotópico.

Los animales fueron evaluados diariamente en un equipo de bioluminiscencia (Sistema Xenogen IVIS, Spectrum, Universidad de Quebec en Trois Rivieres, Quebec, Canadá), previa administración intraperitoneal de D-Luciferina, sustrato de la enzima luciferasa. Definimos como tiempo de toma tumoral al primer día en el cual se detecta bioluminiscencia en el ratón.

Nuestros resultados muestran que la línea silenciada posee una velocidad de crecimiento significativamente menor que la línea control MB49-I-scr-luc, creciendo en el subcutáneo, observado tanto a través de la medición con calibre, como por bioluminiscencia (Figura 41).

La gran ventaja de obtener líneas celulares con bioluminiscencia es que nos proporciona una herramienta muy útil debido a la alta sensibilidad en la detección tumoral. Dado que definimos la toma tumoral, como el día en que empieza a detectarse el tumor, podemos ver que cuando utilizamos la medición tumoral por calibre, los tumores se hacen evidentes y medibles recién a partir del día 15, mientras que por bioluminiscencia a partir del 5 día ya son detectables.

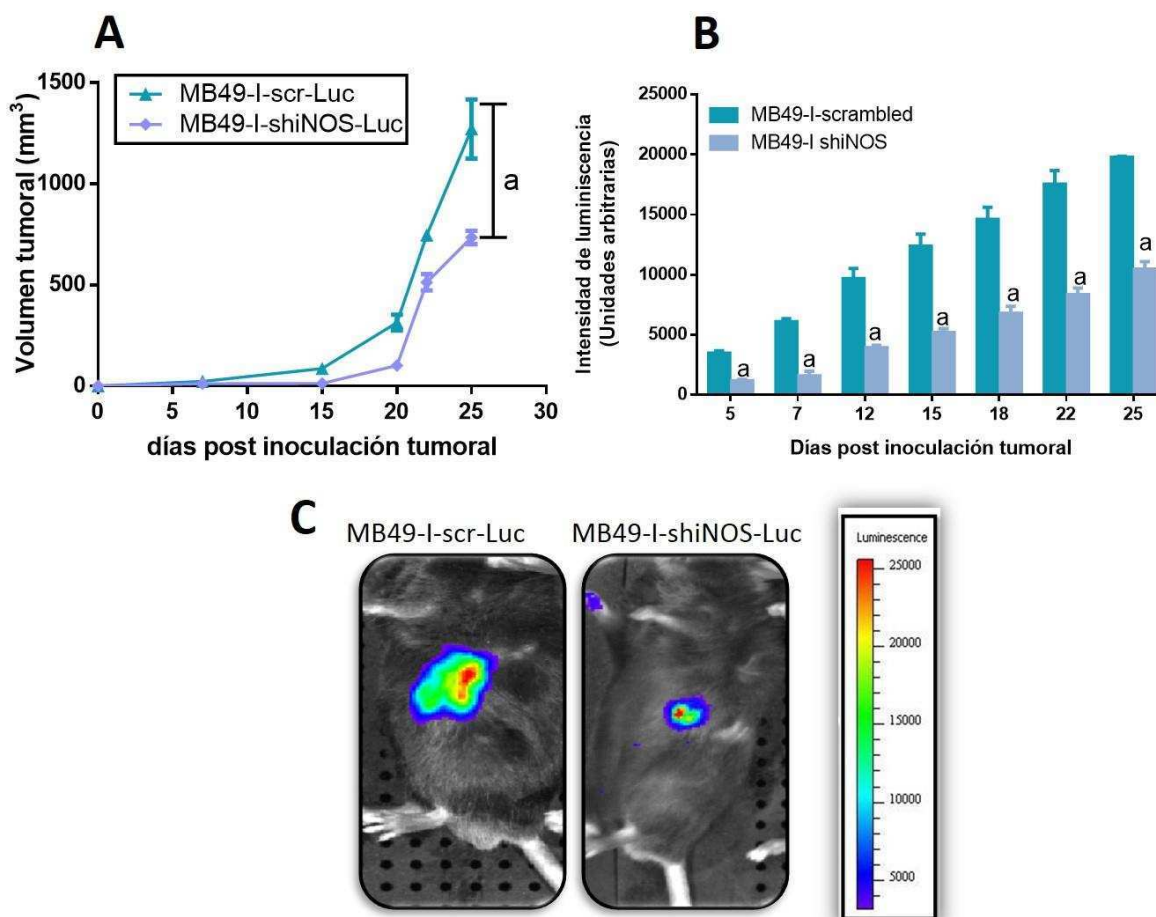


Figura 41: El silenciamiento de iNOS reduce el crecimiento subcutáneo de tumores MB49-I. A) Se inocularon 2×10^5 células MB49-I-scr-Luc y MB49-I-shiNOS-Luc en el subcutáneo de ratones C57BL/6J. Se evaluó el crecimiento tumoral a lo largo del experimento, 2 veces por semana, midiendo con calibre y se tomaron imágenes. Los ratones recibieron de manera intraperitoneal D-Luciferina (15mg/ml; 0.15ml/ratón), antes de ser colocados en el Xenogen-IVIS. Las imágenes fueron registradas con el software Living Image. Se grafica el crecimiento tumoral promedio \pm DS. Test de Kruskal Wallis, con contrastes Mann Whitney a - $p < 0.001$ vs MB49-I scr B) Intensidad de luminiscencia de las células MB49-I-scr-Luc y MB49-I-shiNOS-Luc durante los 25 días de duración del experimento. a - $p < 0.001$ vs MB49-I-scr-Luc, Test Kruskal Wallis. C) Fotos representativas de tumores MB49-I-scr y MB49-shiNOS creciendo en el subcutáneo, al día 15 de experimento.

Luego de evaluar el crecimiento heterotópico decidimos evaluar el crecimiento en el modelo ortotópico. Confirmando lo que describimos anteriormente mediante la

inhibición farmacológica, observamos que el silenciamiento de iNOS en las células MB49-I inhibe también el crecimiento tumoral.

En el caso del grupo MB49-I-scr-Luc, la toma tumoral se registró a los 7 días post inoculación, similar al observado para la línea parental, MB49-I (dato no mostrado), indicando que la infección lentiviral y el hecho de que estas líneas expresen no afecta su crecimiento. Mientras que el grupo MB49-I-shiNOS, presentó un tiempo de toma tumoral significativamente mayor, 12 días post inoculo (**Figura 42A**). Al igual que lo observado en el crecimiento heterotópico, la intensidad de luminiscencia registrada, resultó significativamente menor en el grupo MB49-I-shiNOS, a lo largo de todo el experimento (**Figura 42B**).

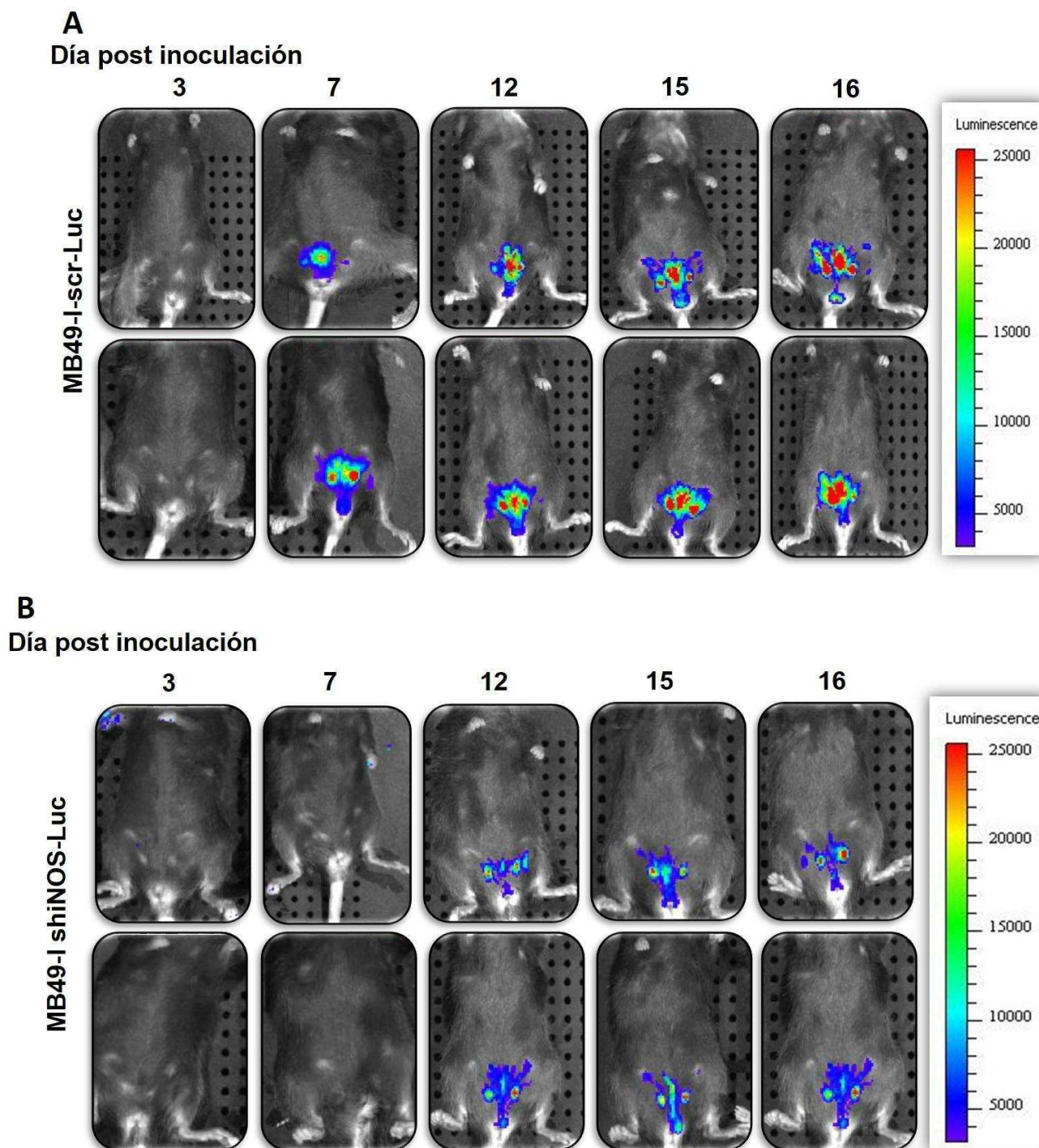


Figura 42: A y B) El silenciamiento de iNOS redujo el crecimiento de tumores ortotópicos MB49-I: Imágenes obtenidas a través del sistema Xenogen IVIS In vivo Imaging. Se inocularon 2×10^4 células MB49-I-scr-Luc y MB49-I-shiNOS-Luc en la vejiga de hembras C57BL/6J. Se les suministró D-luciferina (150mg/ml, 0.15ml/ratón) intraperitonealmente antes de colocarlos dentro del In vivo Imaging. Las imágenes fueron registradas con el software Living Image, 5 minutos después de inocular la D-Luciferina. Se registraron imágenes en los días 3, 7, 12, 15, y 16 días posteriores a la inoculación tumoral. Se muestran imágenes representativas de dos ratones por grupo.

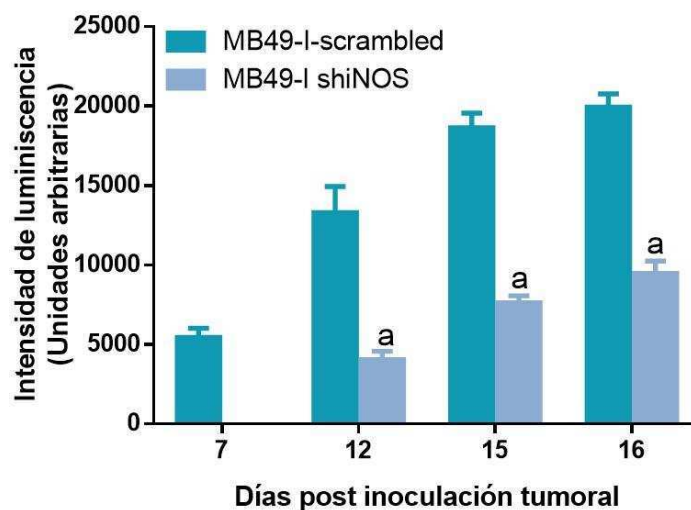


Figura 43; Cuantificación de intensidad de luminiscencia de las células MB49-I-scr-Luc y MB49-I-shiNOS-Luc durante los 16 días de duración del experimento ortotópico. a-. a-p<0.001 vs MB49-I-scr-Luc, Test Kruskal Wallis.

Podemos decir, por último que la utilización de bioluminiscencia in vivo resultó ser una gran herramienta de trabajo ya que en nuestro modelo de CaV ortotópico no es posible analizar la evolución tumoral sino hasta el momento del punto final del experimento.

DISCUSIÓN

Desde la década del 90 hasta la actualidad, se ha acumulado evidencia de que el NO se encuentra involucrado en una gran cantidad de vías de señalización inter e intra celulares que difieren en su importancia dependiendo los tipos celulares e intervienen en muchos procesos fisiopatológicos. El NO cumple, además un papel importante en la regulación de la tumorigénesis, la angiogénesis, la progresión tumoral y la metástasis. La bibliografía al respecto es numerosa, y en su mayoría, controvertida, describiendo al NO con un rol dual en la biología tumoral [147, 160-164]. En algunos estudios, se describe al NO como promotor de la progresión y angiogénesis tumoral [125, 165], mientras que en otros la actividad aumentada de algunas isoformas de NOS se encuentra correlacionada con una disminución en la capacidad metastásica [166, 167].

La expresión aberrante de la isoforma inducible iNOS ha sido documentada en varios tumores humanos, incluyendo cabeza y cuello, mama, colon, estómago y cáncer de pulmón, entre otros [124-127]. Numerosos autores reportaron la expresión de iNOS asociada a una menor supervivencia en pacientes con tumores de mama, pulmón, cabeza y cuello y colorectales [128-130]. Sin embargo, otros autores afirmaron que altos niveles de NO y la alta expresión de iNOS pueden revertir propiedades invasoras y la generación de metástasis en tumores de próstata y melanoma entre otros [131], proponiendo que la inducción de iNOS y la producción de altos niveles de NO sería útil para controlar el crecimiento de tumores. Desde nuestro punto de vista la actividad pro o antitumoral de iNOS/NO, dependerá no solamente de características propias del tumor sino también, del medioambiente y del tejido de origen del tumor.

En CaV de vejiga, las publicaciones son más escasas, en trabajos previos de nuestro laboratorio identificamos que iNOS no se expresa en la vejiga normal, pero si lo hace en el 50% de pacientes con CaV, detectándose tanto en el tumor como en tejido vesical adyacente no tumoral, y que su expresión se relaciona con recurrencias más tempranas y con un mayor grado de invasión [134] [135]. Posteriormente a nuestros hallazgos, Mitropoulos y colaboradores demostraron que aquellos pacientes que presentaban niveles altos de iNOS previos al tratamiento con BCG, eran refractarios al

tratamiento [136]. Teniendo en cuenta que se había descrito que el NO generado durante el tratamiento con BCG era el responsable de la muerte de células tumorales [168], estos resultados aportan información útil indicando un rol adverso del NO en la inmunoterapia a BCG en aquellos pacientes con tumores que expresan iNOS. Estos resultados, en conjunto, nos llevaron a postular que la expresión de la enzima iNOS es un factor de mal pronóstico para pacientes con CaV.

Hoy en día BCG ha demostrado ser la terapia más eficiente para evitar la recurrencia con o sin progresión del CaV NMI de alto grado histológico y del carcinoma in situ. Sin embargo, no todos los pacientes responden adecuadamente a la inmunoterapia, pudiendo progresar en su enfermedad o presentar efectos secundarios que limitan su utilización [159, 169, 170]. En el caso de tumores MI, la cistectomía radical es el tratamiento más aceptado debido a la mayor sobrevida de pacientes, pero la mayor desventaja del tratamiento reside en su impacto negativo sobre la calidad de vida de los pacientes. Aquí nace la clara necesidad de identificar nuevas moléculas implicadas en la progresión tumoral que permitan sub-estadificar pacientes que no responderán a los tratamientos convencionales, con alto riesgo de progresar a un estadio invasor y/o metastásico, ya que permitirá así la realización de terapias más racionales en los inicios de la enfermedad.

En el presente trabajo mostramos datos que aportan información sobre el rol del NO y la enzima iNOS en la biología del CaV y su potencial utilidad como marcadores de seguimiento y de mal pronóstico, respectivamente. También presentamos información, que propone la necesidad de estudios clínicos para evaluar si la modulación de la producción de NO podría ser una buena terapia para el tratamiento de pacientes cuyos tumores expresen iNOS.

En la presente tesis, utilizamos un modelo de CaV murino que mimetiza la patología humana [156] para estudiar el rol ejercido por el NO producido por las células tumorales, en la progresión tumoral. Para ello, nos enfocamos no solo en la célula tumoral, sino también en fibroblastos, como células que conforman el estroma tumoral.

Estudiamos la inhibición de iNOS utilizando inhibidores farmacológicos, inespecíficos L-NAME y específicos 1400w y SMT y la ablación genética con la técnica shRNA. Los inhibidores farmacológicos L-NAME y 1400w, están reportados en la literatura presentando resultados promisorios en ensayos preclínicos. Gallo y colaboradores, en la década del 90 fueron pioneros en utilizar dichos inhibidores y demostrar que producían una inhibición del crecimiento de células de cáncer de colon y mama, que expresaban iNOS. Sin embargo, dichos inhibidores, fallaban en inhibir el crecimiento de otras células tumorales que no expresaban la enzima [165]. Trabajos más actuales han reforzado esta idea, que coincide con lo observado en nuestro modelo murino de CaV. Hemos demostrado que la línea NMI –MB49- produce niveles menores de NO, que la línea invasora –MB49-I-, de acuerdo a sus niveles de expresión de iNOS. El tratamiento con ambos inhibidores afectó la proliferación de ambas líneas tumorales, disminuyendo de manera concomitante la expresión de iNOS, aunque en mayor medida en la línea invasora, productora de mayores niveles de NO. Sin embargo, la línea NMI-MBT2-, que no expresa iNOS no se vio afectada por el tratamiento, sugiriendo que el NO es un factor de sobrevivencia para aquellas células que lo producen. Cuando analizamos las vías de señalización involucradas en la viabilidad y proliferación celular, observamos que el NO producido por la célula tumoral, incrementa la fosforilación de ERK, proteína efectora de la vía de las MAPK. Existen reportes que muestran que el NO upregula la vía de las MAPK, tanto en modelos tumorales como no tumorales [117]. Por ejemplo se ha descrito que el NO exógeno puede incrementar la proliferación de células endoteliales [171] y que la hipoxia que genera expresión de iNOS/NO estimula vías de MAPK [172].

Los niveles de NO producidos por iNOS son mayormente regulados a nivel transcripcional. Los mecanismos de transcripción del gen de iNOS han sido muy estudiados y difieren según el tipo celular y el estímulo que lo genere. Estímulos inflamatorios como lipopolisacáridos (LPS) y TNF α inducen la expresión de iNOS en distintos tipos celulares a través de la activación del factor de transcripción NF κ B, uniéndose a la región promotora del gen [173]. Por otro lado, se ha demostrado que algunos agentes, incluyendo, aminoguanidina, inhibidor de las iNOS, tienen la capacidad de reducir su transcripción [174, 175]. Teniendo en cuenta estos antecedentes y nuestra

observación de que los inhibidores L-NAME y 1400w no solo disminuyen la actividad de iNOS sino que también reduce su expresión, es que intentamos analizar a través de que mecanismo ocurría esta disminución de expresión. Nuestros resultados muestran que L-NAME no modificó los niveles de mRNA para iNOS, en concordancia tampoco se vio disminución en la activación del factor de transcripción NF- κ B, medido por la técnica de gen reportero. Dado que está descrito en macrófagos, que PPAR γ downregula la expresión de iNOS, actuando como transrepressor de NF κ B [176, 177], también evaluamos su activación como alternativa, sin embargo tampoco pudimos ver regulación a este nivel. No podemos descartar que mecanismos de degradación vía el proteosoma estén involucrados en el proceso, tal como ha sido demostrado en células epiteliales de riñón humanas HEK293 [178].

Las enzimas proteolíticas han ganado un lugar importante en el estudio de los procesos de progresión tumoral. En pacientes con CaV, se encuentra incrementando tanto la expresión como la actividad de metaloproteasas, estando estos parámetros asociados a un peor pronóstico, como mayor invasión y mayor grado histológico [84]. Asimismo, se describió que los niveles plasmáticos de uPA son significativamente mayores, comparados con controles sanos, y que dichos niveles elevados eran un factor independiente de predicción de peor pronóstico después de la cistectomía radical [179]. En modelos no tumorales, como regulación del flujo arterial, condrocitos articulares y células mesangiales de rata, se ha observado que el NO induce la actividad de MMPs [180-182]. También, en modelos tumorales de melanoma se ha demostrado que el NO regula positivamente la activación de ciertas MMPs y down regula sus inhibidores [183]. Resultados previos de nuestro laboratorio, demostraron que la línea invasora, MB49-I, de acuerdo a su cariotipo, ganó un cromosoma 14 adicional, a diferencia de la línea parental, MB49, conteniendo en él genes que codifican para algunas enzimas proteolíticas, lo cual explica la mayor actividad de MMPs, uPA y catepsina en la línea invasora [184]. Aquí demostramos que los niveles de NO están involucrados, al menos en parte, en mantener la actividad de las enzimas proteolítica MMP-2 MMP-9 y uPA, ya que el uso de inhibidores como L-NAME reducen su actividad. Esta inhibición se manifiesta en mayor proporción en la línea invasora MB49-I. Fortaleciendo estos

resultados, Li-Bo reportó que al tratar células de cáncer de colon con L-NAME, la actividad de MMP2 y 9 se vio disminuida, y en consecuencia la generación de metástasis y angiogénesis, reforzando la idea de que el NO cumple un rol importante en la invasión [185].

Para analizar la implicancia *in vivo* del NO en el proceso metastásico, realizamos una inoculación intravenosa de las células tumorales. Aunque esta técnica no involucra la etapa de intravasación, evalúa la capacidad de sobrevivir en el torrente circulatorio, de extravasarse en el órgano diana, migrar y crecer en él. Es en esta extravasación donde se pone en juego la migración celular, permeabilidad de los vasos y la actividad de enzimas proteolíticas. En concordancia con que la línea invasora MB49-I produce mayores niveles de NO, posee mayor actividad de enzimas proteolíticas y tiene mayor capacidad migratoria observamos que genera mayor número de metástasis pulmonares que la línea no invasora MB49. Dicha capacidad metastásica se ve disminuida cuando la producción de NO es inhibida, indicando que la inhibición de NO podría funcionar como un tratamiento antimetastático. Resultados similares se obtuvieron recientemente utilizando líneas celulares de cáncer de mama metastásicas, tratadas con L-NAME [186], ampliando los presentados en esta tesis. Este aporte resultó interesante, ya que el tratamiento de las metástasis es un problema importante en la clínica oncológica.

La capacidad de producir angiogénesis es fundamental para el desarrollo tumoral, dado que un modo de proveer nutrientes y oxígeno al interior de los tumores. El NO también parece cumplir un rol importante en este proceso, mediando en parte, la modulación de factores angiogénicos tales como el VEGF y el bFGF [187] [188]. El efecto del NO sobre la angiogénesis ha sido estudiado hace varios años utilizando inhibidores farmacológicos de NOS o dadores de NO. Algunos autores reportaron que el tratamiento de ratones portadores de tumores de mama o carcinoma de células escamosas con 1400w, redujo el crecimiento tumoral y la formación de nuevos vasos sanguíneos [161, 162, 164]. Ampliando los resultados en este sentido, en la presente tesis demostramos que, en el caso de tumores de vejiga, el NO, producto de la iNOS, en las células tumorales induce la neovascularización. Esta neovascularización es mayor en la línea

invasora, que produce mayores niveles de NO y es revertida por el uso de los inhibidores L-NAME y 1400w en ambas líneas. Respecto a la expresión de VEGF, los resultados obtenidos no fueron los esperados ya que suponíamos que al inhibir el NO, los niveles de VEGF iban a reducirse también. Sin embargo, como se mencionó previamente, el NO puede modular la expresión de otros factores angiogénicos, tales como el bFGF, o prostaglandinas, a través de la activación de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) [189], los cuales no podemos descartar que se hayan visto afectados luego del tratamiento con los inhibidores.

En un proceso fisiológico, como es la cicatrización, existen evidencias de que el NO es un regulador negativo de la remodelación tisular. Antecedentes de nuestro laboratorio indicaron que la producción de NO por parte de las células tumorales en respuesta a BCG regulan negativamente la remodelación tisular, necesaria en esta terapia [190]. En base a esto, nos planteamos que la inhibición del NO podría favorecer la activación del estroma y la inhibición tumoral. Pudimos demostrar que la inhibición de la producción de NO promueve proliferación en los FB, y que medios condicionados de dichos FB tratados, inhiben la proliferación de células de CaV, indicando un cross-talk entre células tumorales y FB, en relación al NO. Demostramos, in vivo, que el tratamiento con L-NAME promueve la activación de FB, y su consecuente deposición de fibras de colágeno rodeando a las células tumorales. Posiblemente esto origine la inhibición del crecimiento de las células tumorales porque disminuye las comunicaciones intercelulares. Resultados similares fueron publicados por Shukla y colaboradores, quienes demuestran que el NO es un regulador negativo de la proliferación de FB y de la biosíntesis de colágeno [191].

La importancia de los fibroblastos que han sido tratados con inhibidores de la producción de NO, se pone de manifiesto en el ensayo realizado in vivo. La co-inoculación de células tumorales con FB previamente activados in vitro con L-NAME, inhibió el crecimiento de los tumores MB49. Si bien no pudimos observar esto en los tumores invasores, fue alentador observar un mayor porcentaje de sobrevida en aquellos

ratones co-inoculados con FB tratados. Por lo tanto pensamos, que teniendo en cuenta que las células MB49-I presentan una velocidad de crecimiento mayor que las MB49, será necesario generar nuevos experimentos inoculando mayor número de FB o utilizando esquemas de inoculación de mayor frecuencia para poner en evidencia el fenómeno.

Si bien no nos hemos detenido en esta tesis a estudiar los productos solubles liberados por los FB, sabemos que los mismos pueden secretar factores de crecimiento como EGF y FGF, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), IL-6, TGF β , MMPs entre otros, que dependiendo del microambiente pueden afectar a las células tumorales [192]. Recientemente, Martinez-outschoorn reportó que el tratamiento de fibroblastos asociados a tumores de mama con L-NAME disminuye varios de los productos antes mencionados [193]. En CaV no hay publicaciones al respecto, pero hemos publicado previamente que la coadministración de L-NAME con BCG en tumores de vejiga, reduce aún más el crecimiento tumoral, e induce la proliferación de FB, vía FGF-2 [190].

Como describimos en la introducción, el seguimiento de pacientes con CaV se realiza mediante cistoscopias que permiten la visualización del interior de la vejiga y citología de células que descaman en la orina. La primera es una práctica muy específica y con buena sensibilidad pero es invasiva. La segunda no es invasiva ya que se analiza la orina pero es poco sensible debido a que no todos los tumores liberan células. Por este motivo es importante la búsqueda de nuevos marcadores con buena sensibilidad y especificidad, como así también, lo menos invasivos posible, para el seguimiento de estos pacientes. Las investigaciones sobre estos tipos de marcadores son continuas y se han identificado algunos tales como FISH [102, 194], NMP22 [103], catepsina B [106], p53 y ki67 [107] y E-cadherina [108] entre otros. Sin embargo, en la actualidad ninguno de ellos se utiliza en la práctica clínica cotidiana debido a que no han mostrado resultados costo/beneficio relevantes.

Anteriormente, hemos demostrado que los pacientes con tumores de vejiga producían niveles de NO aumentados en orina, en comparación a individuos sanos y con pacientes tratados con éxito, sin recidiva [134]. En este trabajo, a través de la inoculación

ortotópica de células de CaV con diferente grado de invasión pudimos evaluar los niveles de NO en orina y correlacionarlo con el tamaño tumoral. Observamos que tumores invasores presentan mayores niveles de NO que tumores que no invaden, y que dichos niveles disminuyen en respuesta al tratamiento con L-NAME, mostrando una correlación con el tamaño tumoral. Estos resultados son muy interesantes ya que nos indicaron que los niveles de NO se encuentran estrechamente relacionados con el tamaño tumoral y que su determinación podría ser utilizado como marcador de seguimiento en pacientes cuyos tumores expresen iNOS lo cual amerita la realización de un estudio clínico controlado.

Algunos inhibidores de la producción de NO, como el L^G-Monomethyl-L-arginina (L-NMMA) han sido extensamente estudiados en ensayos clínicos de pacientes con shocks circulatorios [195], donde pocos eventos adversos y una transitoria hipertensión reversible fueron observados [196]. Recientemente un grupo de investigadores realizó un estudio en cáncer de mama utilizando la línea humana triple negativa MDA en un modelo xenogéneo. Ellos demostraron que la administración de L-NMMA reduce el crecimiento de tumores ortotópicos, y varios procesos que culminan en la inhibición de la diseminación metastática. Teniendo en cuenta su eficacia antitumoral y que es actualmente utilizado en el tratamiento de shocks circulatorios es un compuesto interesante para estudios clínicos de nuevos usos terapéuticos [186]. En nuestro modelo de CaV de vejiga no observamos efectos adversos al tratamiento con los inhibidores de iNOS, ni toxicidad asociada, siendo que las dosis utilizadas resultan significativamente menores a las que se utilizan en la clínica para pacientes con shocks circulatorios. Estos resultados son alentadores y nos impulsan a sugerir la importancia de realizar un estudio clínico controlado para evaluar la posibilidad de uso de L-NAME o 1400w en el tratamiento de pacientes con tumores de vejiga que expresen iNOS.

CONCLUSIÓN

A lo largo de este trabajo hemos demostrado que el NO es un factor de supervivencia para células de CaV que expresan iNOS, y que su inhibición reduce la activación de vías de proliferación y parámetros de progresión tumoral como la producción de enzimas proteolíticas, la migración, angiogénesis y el crecimiento metastásico en pulmón.

Evaluamos las consecuencias de la inhibición de iNOS en el crecimiento tumoral empleando tres estrategias distintas: Inhibiendo las NOS de manera sistémica con L-NAME, inhibiendo iNOS de manera local y a través de la ablación genética, concluyendo a través de estas tres estrategias que la inhibición de la producción de NO reduce significativamente el crecimiento tumoral de células que expresan iNOS y parámetros relacionados con la invasión y la metástasis.

Asimismo, demostramos que la determinación de nitrito en orina puede ser propuesto como marcador de seguimiento y respuesta a tratamiento y la expresión de iNOS como marcador pronóstico en pacientes con CaV.

En base a los resultados expuestos, planteamos que la inhibición de la actividad de iNOS sería una terapia promisorio para pacientes con CaV, cuyos tumores expresen la enzima.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MacLennan, G.T., Z. Kirkali, and L. Cheng, *Histologic grading of noninvasive papillary urothelial neoplasms*. Eur Urol, 2007. **51**(4): p. 889-97; discussion 897-8.
2. Fukumura, D., S. Kashiwagi, and R.K. Jain, *The role of nitric oxide in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(7): p. 521-34.
3. Haggard, H.W. and G.M. Smith, *Johannes Muller and the Modern Conception of Cancer*. Yale J Biol Med, 1938. **10**(5): p. 419 b1-436.
4. Nowel, M.S. and G.B. Chapman, *The ultrastructure of implanted trophoblast cells of the yellow agouti mouse*, in *J Anat*. 1976. p. 177-88.
5. Liotta, L.A. and W.G. Stetler-Stevenson, *Tumor invasion and metástasis: an imbalance of positive and negative regulation*. Cancer Res, 1991. **51**(18 Suppl): p. 5054s-5059s.
6. Liotta, L.A., W.G. Stetler-Stevenson, and P.S. Steeg, *Cancer invasion and metástasis: positive and negative regulatory elements*. Cancer Invest, 1991. **9**(5): p. 543-51.
7. Yamaguchi, Y. and S. Hayashi, *Estrogen-related cancer microenvironment of breast carcinoma*. Endocr J, 2009. **56**(1): p. 1-7.
8. Porta, C., et al., *Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer*. Immunobiology, 2009. **214**(9-10): p. 761-77.
9. de Visser, K.E., A. Eichten, and L.M. Coussens, *Paradoxical roles of the immune system during cancer development*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(1): p. 24-37.
10. Egeblad, M., E.S. Nakasone, and Z. Werb, *Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism*. Dev Cell, 2010. **18**(6): p. 884-901.
11. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
12. Lazebnik, Y., *What are the hallmarks of cancer?* Nat Rev Cancer, 2010. **10**(4): p. 232-3.
13. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
14. Netzel-Arnett, S., et al., *Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer*. Cancer Metástasis Rev, 2003. **22**(2-3): p. 237-58.
15. Schirmacher, V., *Cancer metástasis: experimental approaches, theoretical concepts, and impacts for treatment strategies*. Adv Cancer Res, 1985. **43**: p. 1-73.
16. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogénesis*. Recent Prog Horm Res, 2000. **55**: p. 15-35; discussion 35-6.
17. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metástasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-8.
18. Joyce, J.A. and J.W. Pollard, *Microenvironmental regulation of metástasis*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 239-52.
19. Skrzydlewska, E., et al., *Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(9): p. 1251-66.
20. Van Damme, J., S. Struyf, and G. Opdenakker, *Chemokine-protease interactions in cancer*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(3): p. 201-8.

21. Di Carlo, A., et al., *Urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) in human bladder tumors*. *Oncol Rep*, 2006. **15**(5): p. 1321-6.
22. Bhuvaramurthy, V., et al., *In situ gene expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in transitional cell carcinoma of the human bladder*. *Oncol Rep*, 2004. **12**(4): p. 909-13.
23. Di Nezza, L.A., et al., *Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion*. *Cancer*, 2002. **94**(5): p. 1466-75.
24. Martens, J.W., et al., *Aging of stromal-derived human breast fibroblasts might contribute to breast cancer progression*. *Thromb Haemost*, 2003. **89**(2): p. 393-404.
25. Folkman, J., D.M. Long, Jr., and F.F. Becker, *Growth and metástasis of tumor in organ culture*. *Cancer*, 1963. **16**: p. 453-67.
26. Carmeliet, P., *Angiogénesis in health and disease*. *Nat Med*, 2003. **9**(6): p. 653-60.
27. Malonne, H., et al., *Mechanisms of tumor angiogénesis and therapeutic implications: angiogénesis inhibitors*. *Clin Exp Metástasis*, 1999. **17**(1): p. 1-14.
28. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogénesis in cancer and other diseases*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
29. Cao, Y., *Tumor angiogénesis and therapy*. *Biomed Pharmacother*, 2005. **59 Suppl 2**: p. S340-3.
30. Kulinsky, V.I., *Biochemical aspects of inflammation*. *Biochemistry (Mosc)*, 2007. **72**(6): p. 595-607.
31. Reuter, S., et al., *Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?* *Free Radic Biol Med*, 2010. **49**(11): p. 1603-16.
32. Asquith, M. and F. Powrie, *An innately dangerous balancing act: intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer*. *J Exp Med*, 2010. **207**(8): p. 1573-7.
33. Kyewski, B. and P. Romero, *Chronic inflammation is regarded as a strong promoter of tumorigenesis*. *Int J Cancer*, 2010. **127**(4): p. 747.
34. Schottenfeld, D. and J. Beebe-Dimmer, *Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia*. *CA Cancer J Clin*, 2006. **56**(2): p. 69-83.
35. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* *Lancet*, 2001. **357**(9255): p. 539-45.
36. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
37. Hussain, S.P. and C.C. Harris, *Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials*. *Int J Cancer*, 2007. **121**(11): p. 2373-80.
38. De Marzo, A.M., et al., *Inflammation in prostate carcinogenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(4): p. 256-69.
39. Eaden, J., et al., *Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2000. **14**(2): p. 145-53.
40. Rajput, S. and A. Wilber, *Roles of inflammation in cancer initiation, progression, and metástasis*. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2010. **2**: p. 176-83.

41. Hofseth, L.J., et al., *Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 143-8.
42. Philip, M., D.A. Rowley, and H. Schreiber, *Inflammation as a tumor promoter in cancer induction*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(6): p. 433-9.
43. Suganuma, M., et al., *Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice*. Cancer Res, 1999. **59**(18): p. 4516-8.
44. Apte, R.N., et al., *The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions*. Cancer Metástasis Rev, 2006. **25**(3): p. 387-408.
45. Keibel, A., V. Singh, and M.C. Sharma, *Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(17): p. 1949-55.
46. Ancrile, B.B., K.M. O'Hayer, and C.M. Counter, *Oncogenic ras-induced expression of cytokines: a new target of anti-cancer therapeutics*. Mol Interv, 2008. **8**(1): p. 22-7.
47. Kantor, A.F., et al., *Urinary tract infection and risk of bladder cancer*. American journal of epidemiology, 1984. **119**(4): p. 510-5.
48. La Vecchia, C., et al., *Genital and urinary tract diseases and bladder cancer*. Cancer Res, 1991. **51**(2): p. 629-31.
49. Lamm, D.L. and R.F. Gittes, *Inflammatory carcinoma of the bladder and interstitial cystitis*. J Urol, 1977. **117**(1): p. 49-51.
50. Aggarwal, B.B., R.V. Vijayalekshmi, and B. Sung, *Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(2): p. 425-30.
51. Thompson, D.B., et al., *Immunological basis in the pathogenesis and treatment of bladder cancer*. Expert Rev Clin Immunol, 2015. **11**(2): p. 265-79.
52. Zhu, Z., Z. Shen, and C. Xu, *Inflammatory pathways as promising targets to increase chemotherapy response in bladder cancer*. Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 528690.
53. Michaud, D.S., *Chronic inflammation and bladder cancer*. Urol Oncol, 2007. **25**(3): p. 260-8.
54. Cai, T., et al., *Interleukin-6/10 ratio as a prognostic marker of recurrence in patients with intermediate risk urothelial bladder carcinoma*. J Urol, 2007. **178**(5): p. 1906-11;discussion 1911-2.
55. Brandau, S., *Tumor associated macrophages: predicting bacillus Calmette-Guerin immunotherapy outcomes*. J Urol, 2009. **181**(4): p. 1532-3.
56. Hanada, T., et al., *Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer*. Int J Urol, 2000. **7**(7): p. 263-9.
57. Ayari, C., et al., *Bladder tumor infiltrating mature dendritic cells and macrophages as predictors of response to bacillus Calmette-Guerin immunotherapy*. Eur Urol, 2009. **55**(6): p. 1386-95.
58. Takayama, H., et al., *Increased infiltration of tumor associated macrophages is associated with poor prognosis of bladder carcinoma in situ after intravesical bacillus Calmette-Guerin instillation*. J Urol, 2009. **181**(4): p. 1894-900.
59. Burke, A.J., et al., *The yin and yang of nitric oxide in cancer progression*. Carcinogenesis, 2013. **34**(3): p. 503-12.

60. Vasudevan, D. and D.D. Thomas, *Insights into the diverse effects of nitric oxide on tumor biology*. Vitam Horm, 2014. **96**: p. 265-98.
61. Bhowmick, N.A., E.G. Neilson, and H.L. Moses, *Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 332-7.
62. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(5): p. 349-63.
63. Rodemann, H.P. and G.A. Muller, *Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis*. Am J Kidney Dis, 1991. **17**(6): p. 684-6.
64. Simian, M., et al., *The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells*. Development, 2001. **128**(16): p. 3117-31.
65. Wiseman, B.S. and Z. Werb, *Stromal effects on mammary gland development and breast cancer*. Science, 2002. **296**(5570): p. 1046-9.
66. Muller, G.A. and H.P. Rodemann, *Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: I. Immunophenotyping of cultured tubular epithelial cells and fibroblasts derived from kidneys with histologically proven interstitial fibrosis*. Am J Kidney Dis, 1991. **17**(6): p. 680-3.
67. Mueller, M.M. and N.E. Fusenig, *Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 839-49.
68. Ronnov-Jessen, L., O.W. Petersen, and M.J. Bissell, *Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction*. Physiol Rev, 1996. **76**(1): p. 69-125.
69. Dolberg, D.S., et al., *Wounding and its role in RSV-mediated tumor formation*. Science, 1985. **230**(4726): p. 676-8.
70. Sieweke, M.H., et al., *Mediation of wound-related Rous sarcoma virus tumorigenesis by TGF-beta*. Science, 1990. **248**(4963): p. 1656-60.
71. Kalluri, R. and M. Zeisberg, *Fibroblasts in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(5): p. 392-401.
72. Cheng, N., et al., *Loss of TGF-beta type II receptor in fibroblasts promotes mammary carcinoma growth and invasion through upregulation of TGF-alpha-, MSP- and HGF-mediated signaling networks*. Oncogene, 2005. **24**(32): p. 5053-68.
73. Silzle, T., et al., *The fibroblast: sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue*. Int J Cancer, 2004. **108**(2): p. 173-80.
74. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin, 2013. **63**(1): p. 11-30.
75. Elena Mattos DIL, N.Z., *Atlas de Mortalidad por cáncer en Argentina 1997-2001*. 2003
76. Malats, N. and F.X. Real, *Epidemiology of Bladder Cancer*. Hematol Oncol Clin North Am, 2015. **29**(2): p. 177-189.
77. de Braud, F., et al., *Bladder cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. **41**(1): p. 89-106.

78. Badawi, A.F., *Molecular and genetic events in schistosomiasis-associated human bladder cancer: role of oncogenes and tumor suppressor genes*. *Cancer Lett*, 1996. **105**(2): p. 123-38.
79. Tamir, S. and S.R. Tannenbaum, *The role of nitric oxide (NO.) in the carcinogenic process*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1288**(2): p. F31-6.
80. Sandes, E.O., et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase in tumoral and non-tumoral epithelia from bladder cancer patients*. *Nitric Oxide*, 2005. **12**(1): p. 39-45.
81. Jung I, M.E., *Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression*. *Cancer Control*, 2000. **7**: **325-334**.
82. Silverman, D.T., et al., *Epidemiology of bladder cancer*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1992. **6**(1): p. 1-30.
83. Lucas, S.B., *Squamous cell carcinoma of the bladder and schistosomiasis*. *East Afr Med J*, 1982. **59**(5): p. 345-51.
84. Jung, I. and E. Messing, *Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression*. *Cancer Control*, 2000. **7**(4): p. 325-34.
85. Stonehill, W.H., et al., *Risk factors for bladder tumors in spinal cord injury patients*. *J Urol*, 1996. **155**(4): p. 1248-50.
86. TNM, U.I.C.I.C.U.i., C.o.M.T.t.e. 262–265, and (UICC, 2009).
87. Sauter G AE, A.M., Busch C Cheville J, Passer T et al *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)
88. Knowles, M.A. and C.D. Hurst, *Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity*. *Nat Rev Cancer*, 2015. **15**(1): p. 25-41.
89. *National Comprehensive Cancer, N., NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Bladder Cancer*. . 2015.
90. Carradori, S., et al., *Current and emerging strategies in bladder cancer*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012. **12**(6): p. 589-603.
91. Simon, M.A., V.B. Lokeshwar, and M.S. Soloway, *Current bladder cancer tests: unnecessary or beneficial?* *Crit Rev Oncol Hematol*, 2003. **47**(2): p. 91-107.
92. Stein, J.P., et al., *Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(3): p. 666-75.
93. Manoharan, M., R. Ayyathurai, and M.S. Soloway, *Radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder: an analysis of perioperative and survival outcome*. *BJU Int*, 2009. **104**(9): p. 1227-32.
94. Grossman, H.B., et al., *Surveillance for recurrent bladder cancer using a point-of-care proteomic assay*. *JAMA*, 2006. **295**(3): p. 299-305.
95. Lokeshwar, V.B., et al., *Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers*. *Urology*, 2005. **66**(6 Suppl 1): p. 35-63.
96. Yutkin, V., B. Nisman, and D. Pode, *Can urinary biomarkers replace cystoscopic examination in bladder cancer surveillance?* *Expert Rev Anticancer Ther*, 2010. **10**(6): p. 787-90.

97. Friedrich, M.G., et al., *Comparison of multitarget fluorescence in situ hybridization in urine with other noninvasive tests for detecting bladder cancer*. BJU Int, 2003. **92**(9): p. 911-4.
98. Halling, K.C., *Vysis UroVysion for the detection of urothelial carcinoma*. Expert Rev Mol Diagn, 2003. **3**(4): p. 507-19.
99. Halling, K.C., et al., *A comparison of BTA stat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis UroVysion assays for the detection of urothelial carcinoma in urine*. J Urol, 2002. **167**(5): p. 2001-6.
100. Hajdinjak, T., *UroVysion FISH test for detecting urothelial cancers: meta-analysis of diagnostic accuracy and comparison with urinary cytology testing*. Urol Oncol, 2008. **26**(6): p. 646-51.
101. Descotes, F., et al., *Microarray gene expression profiling and analysis of bladder cancer supports the sub-classification of T1 tumours into T1a and T1b stages*. BJU Int, 2014. **113**(2): p. 333-42.
102. Kamat, A.M., et al., *Use of fluorescence in situ hybridization to predict response to bacillus Calmette-Guerin therapy for bladder cancer: results of a prospective trial*. J Urol, 2012. **187**(3): p. 862-7.
103. Terrell, J.D., et al., *Patients with a negative cystoscopy and negative Nmp22(R) Bladderchek(R) test are at low risk of missed transitional cell carcinoma of the bladder: a prospective evaluation*. Int Braz J Urol, 2011. **37**(6): p. 706-11.
104. Shariat, S.F., et al., *Assessing the clinical benefit of nuclear matrix protein 22 in the surveillance of patients with nonmuscle-invasive bladder cancer and negative cytology: a decision-curve analysis*. Cancer, 2011. **117**(13): p. 2892-7.
105. Miremami, J. and N. Kyprianou, *The promise of novel molecular markers in bladder cancer*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(12): p. 23897-908.
106. Eijan, A.M., et al., *High expression of cathepsin B in transitional bladder carcinoma correlates with tumor invasion*. Cancer, 2003. **98**(2): p. 262-8.
107. Oderda, M., et al., *Prognostic Factors Including Ki-67 and p53 in Bacillus Calmette-Guerin-Treated Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Prospective Study*. Urol Int, 2013. **90**(2): p. 184-90.
108. Omran, O.M., *CD10 and E-cad expression in urinary bladder urothelial and squamous cell carcinoma*. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2012. **31**(3): p. 203-12.
109. Knowles, R.G. and S. Moncada, *Nitric oxide synthases in mammals*. Biochem J, 1994. **298** (Pt 2): p. 249-58.
110. Duhe, R.J., et al., *Nitric oxide and thiol redox regulation of Janus kinase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(1): p. 126-31.
111. Tejedo, J.R., et al., *nitric oxide triggers the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt survival pathway in insulin-producing RINm5F cells by arousing Src to activate insulin receptor substrate-1*. Endocrinology, 2004. **145**(5): p. 2319-27.
112. Lander, H.M., et al., *Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species*. J Biol Chem, 1996. **271**(33): p. 19705-9.
113. Ying, L. and L.J. Hofseth, *An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(4): p. 1407-10.
114. Fukumura, D. and R.K. Jain, *Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors*. Cancer Metástasis Rev, 1998. **17**(1): p. 77-89.

115. Orucevic, A., et al., *Nitric-oxide production by murine mammary adenocarcinoma cells promotes tumor-cell invasiveness*. *Int J Cancer*, 1999. **81**(6): p. 889-96.
116. Siegert, A., et al., *Nitric oxide of human colorectal adenocarcinoma cell lines promotes tumour cell invasion*. *Br J Cancer*, 2002. **86**(8): p. 1310-5.
117. Jadeski, L.C., C. Chakraborty, and P.K. Lala, *Nitric oxide-mediated promotion of mammary tumour cell migration requires sequential activation of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and mitogen-activated protein kinase*. *Int J Cancer*, 2003. **106**(4): p. 496-504.
118. Lala, P.K. and C. Chakraborty, *Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression*. *Lancet Oncol*, 2001. **2**(3): p. 149-56.
119. Ekmekcioglu, S., C.H. Tang, and E.A. Grimm, *NO news is not necessarily good news in cancer*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2005. **5**(2): p. 103-15.
120. Xie, K. and S. Huang, *Contribution of nitric oxide-mediated apoptosis to cancer metastasis inefficiency*. *Free Radic Biol Med*, 2003. **34**(8): p. 969-86.
121. Mocellin, S., V. Bronte, and D. Nitti, *Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities*. *Med Res Rev*, 2007. **27**(3): p. 317-52.
122. Nathan, C. and Q.W. Xie, *Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls*. *Cell*, 1994. **78**(6): p. 915-8.
123. Michel, T. and O. Feron, *Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?* *J Clin Invest*, 1997. **100**(9): p. 2146-52.
124. Brennan, P.A., et al., *Inducible nitric oxide synthase: correlation with extracapsular spread and enhancement of tumor cell invasion in head and neck squamous cell carcinoma*. *Head Neck*, 2008. **30**(2): p. 208-14.
125. Thomsen, L.L., et al., *Nitric oxide synthase activity in human breast cancer*. *Br J Cancer*, 1995. **72**(1): p. 41-4.
126. Ambs, S., et al., *Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression*. *Cancer Res*, 1998. **58**(2): p. 334-41.
127. Chen, C.N., et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in angiogenesis and clinical outcome of human gastric cancer*. *J Surg Oncol*, 2006. **94**(3): p. 226-33.
128. Switzer, C.H., et al., *Ets-1 is a transcriptional mediator of oncogenic nitric oxide signaling in estrogen receptor-negative breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2012. **14**(5): p. R125.
129. Rasheed, M.H., et al., *Alleviation of oxidative and nitrosative stress following curative resection in patient with oral cavity cancer*. *J Surg Oncol*, 2007. **96**(3): p. 194-9.
130. Patel, J.B., et al., *Role of nitric oxide and antioxidant enzymes in the pathogenesis of oral cancer*. *J Cancer Res Ther*, 2009. **5**(4): p. 247-53.
131. Baritaki, S., et al., *Mechanisms of nitric oxide-mediated inhibition of EMT in cancer: inhibition of the metastasis-inducer Snail and induction of the metastasis-suppressor RKIP*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(24): p. 4931-40.
132. Eijan, A.M., et al., *Differential nitric oxide release and sensitivity to injury in different murine mammary tumor cell lines*. *Int J Mol Med*, 1998. **2**(5): p. 625-30.

133. Morcos, E., et al., *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, 2001. **165**(2): p. 678-82.
134. Eijan, A.M., et al., *Nitric oxide in patients with transitional bladder cancer*. J Surg Oncol, 2002. **81**(4): p. 203-8.
135. Sandes, E.O., et al., *Inducible nitric oxide synthase and PPARgamma are involved in bladder cancer progression*. J Urol, 2012. **188**(3): p. 967-73.
136. Mitropoulos, D., et al., *The effect of intravesical Bacillus Calmette-Guerin instillations on the expression of inducible nitric oxide synthase in humans*. Nitric Oxide, 2005. **13**(1): p. 36-41.
137. Dong, Z., et al., *Activation of inducible nitric oxide synthase gene in murine macrophages requires protein phosphatases 1 and 2A activities*. J Leukoc Biol, 1995. **58**(6): p. 725-32.
138. Muerkoster, S., et al., *Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta*. Cancer Res, 2004. **64**(4): p. 1331-7.
139. Karadayi, N., et al., *Inducible nitric oxide synthase expression in gastric adenocarcinoma: impact on lymphangiogenesis and lymphatic metastasis*. Diagn Pathol, 2013. **8**: p. 151.
140. Wei, D., et al., *Direct demonstration of negative regulation of tumor growth and metastasis by host-inducible nitric oxide synthase*. Cancer Res, 2003. **63**(14): p. 3855-9.
141. Papapetropoulos, A., et al., *Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 3131-9.
142. Kennovin GD, H.D., Stratford MRL, Flitney FW, *Inducible nitric oxide synthase is expressed in tumour-associated vasculature: inhibition retards tumor growth in vivo*. Biology of Nitric Oxide, Part 4: Enzymology, Biochemistry and Immunology. Portland Press, 1994: p. 473-479.
143. Orucevic, A. and P.K. Lala, *NG-nitro-L-arginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis, ameliorates interleukin 2-induced capillary leakage and reduces tumour growth in adenocarcinoma-bearing mice*. Br J Cancer, 1996. **73**(2): p. 189-96.
144. Orucevic, A. and P.K. Lala, *Effects of N(G)-Nitro-L-arginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on IL-2-induced LAK cell generation in vivo and in vitro in healthy and tumor-bearing mice*. Cell Immunol, 1996. **169**(1): p. 125-32.
145. Kennovin GD, H.D., Stratford MRL, Flitney FW, *Inducible nitric oxide synthase is expressed in tumour-associated vasculature: inhibition retards tumor growth in vivo*. Biology of Nitric Oxide, Part 4: Enzymology, Biochemistry and Immunology. Portland Press, London,, 1994: p. 473-479.
146. Orucevic, A. and P.K. Lala, *Effects of N(g)-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on interleukin-2-induced capillary leakage and antitumor responses in healthy and tumor-bearing mice*. Cancer Immunol Immunother, 1996. **42**(1): p. 38-46.
147. Jenkins, D.C., et al., *Roles of nitric oxide in tumor growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(10): p. 4392-6.

148. Sandau, K.B., et al., *Regulation of the hypoxia-inducible factor 1alpha by the inflammatory mediators nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in contrast to desferroxamine and phenylarsine oxide*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 39805-11.
149. Kimura, H., et al., *Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide*. Blood, 2000. **95**(1): p. 189-97.
150. Black, P.C. and C.P. Dinney, *Bladder cancer angiogenesis and metastasis--translation from murine model to clinical trial*. Cancer Metástasis Rev, 2007. **26**(3-4): p. 623-34.
151. Summerhayes, I.C., *Effects of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder epithelium in vitro*. J Natl Cancer Inst., 1979.
152. Kleinert, H., et al., *Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B*. Mol Pharmacol, 1996. **49**(1): p. 15-21.
153. Pascual, G. and C.K. Glass, *Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression*. Trends Endocrinol Metab, 2006. **17**(8): p. 321-7.
154. Mukaida, N., et al., *Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression*. J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13289-95.
155. Li, M., G. Pascual, and C.K. Glass, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4699-707.
156. Lodillinsky, C., et al., *Novel invasive orthotopic bladder cancer model with high cathepsin B activity resembling human bladder cancer*. J Urol, 2009. **182**(2): p. 749-55.
157. Chen, M., et al., *Effect of UVA irradiation on proliferation and NO/iNOS system of human skin fibroblast*. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2009. **34**(8): p. 705-11.
158. Campbell, L., et al., *Local arginase 1 activity is required for cutaneous wound healing*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(10): p. 2461-70.
159. Lamm, D.L. and F.M. Torti, *Bladder cancer, 1996*. CA Cancer J Clin, 1996. **46**(2): p. 93-112.
160. Thomsen, L.L., *Investigations into the role of nitric oxide and the large intracranial arteries in migraine headache*. Cephalalgia, 1997. **17**(8): p. 873-95.
161. Thomsen, L.L., et al., *Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth in vivo: studies with 1400W, a novel inhibitor*. Cancer Res, 1997. **57**(15): p. 3300-4.
162. Jadeski, L.C. and P.K. Lala, *Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors*. Am J Pathol, 1999. **155**(4): p. 1381-90.
163. Cullis, E.R., et al., *Tumour overexpression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) increases angiogenesis and may modulate the anti-tumour effects of the vascular disrupting agent ZD6126*. Microvasc Res, 2006. **71**(2): p. 76-84.
164. Sikora, A.G., et al., *Targeted inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits growth of human melanoma in vivo and synergizes with chemotherapy*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(6): p. 1834-44.

165. Gallo, O., et al., *Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(8): p. 587-96.
166. Radomski, M.W., et al., *Human colorectal adenocarcinoma cells: differential nitric oxide synthesis determines their ability to aggregate platelets*. Cancer Res, 1991. **51**(22): p. 6073-8.
167. Dong, Z., et al., *Inverse correlation between expression of inducible nitric oxide synthase activity and production of metastasis in K-1735 murine melanoma cells*. Cancer Res, 1994. **54**(3): p. 789-93.
168. Jansson, O.T., et al., *The role of nitric oxide in bacillus Calmette-Guerin mediated anti-tumour effects in human bladder cancer*. Br J Cancer, 1998. **78**(5): p. 588-92.
169. Lamm, D.L., et al., *Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of superficial bladder cancer*. J Urol, 1980. **124**(1): p. 38-40.
170. Bohle, A., *Bladder cancer: meta-analysis of BCG versus mitomycin C--a deeper insight?* Nat Rev Urol, 2010. **7**(1): p. 8-10.
171. Zheng, J., et al., *Exogenous nitric oxide stimulates cell proliferation via activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in ovine fetoplacental artery endothelial cells*. Biol Reprod, 2006. **74**(2): p. 375-82.
172. Thomas, D.D., et al., *Hypoxic inducible factor 1alpha, extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(24): p. 8894-9.
173. Kleemann, R., et al., *Transcription and translation of inducible nitric oxide synthase in the pancreas of prediabetic BB rats*. FEBS Lett, 1993. **328**(1-2): p. 9-12.
174. Udayabanu, M., et al., *Nitric oxide associated with iNOS expression inhibits acetylcholinesterase activity and induces memory impairment during acute hypobaric hypoxia*. Brain Res, 2008. **1230**: p. 138-49.
175. Corbett, J.A. and M.L. McDaniel, *The Use of Aminoguanidine, a Selective iNOS Inhibitor, to Evaluate the Role of Nitric Oxide in the Development of Autoimmune Diabetes*. Methods, 1996. **10**(1): p. 21-30.
176. Ricote, M., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 79-82.
177. Ricote, M. and C.K. Glass, *PPARs and molecular mechanisms of transrepression*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(8): p. 926-35.
178. Musial, A. and N.T. Eissa, *Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 24268-73.
179. Shariat, S.F., et al., *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, 2003. **61**(5): p. 1053-8.
180. Tronc, F., et al., *Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with NO*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(12): p. E120-6.
181. Sasaki, K., et al., *Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes*. J Biochem, 1998. **123**(3): p. 431-9.
182. Eberhardt, W., et al., *Nitric oxide modulates expression of matrix metalloproteinase-9 in rat mesangial cells*. Kidney Int, 2000. **57**(1): p. 59-69.

183. Ishii, Y., et al., *Induction of matrix metalloproteinase gene transcription by nitric oxide and mechanisms of MMP-1 gene induction in human melanoma cell lines*. Int J Cancer, 2003. **103**(2): p. 161-8.
184. Fabris, V.T., et al., *Cytogenetic characterization of the murine bladder cancer model MB49 and the derived invasive line MB49-I*. Cancer Genet, 2012. **205**(4): p. 168-76.
185. Yu, L.B., et al., *Effect of a nitric oxide synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine methyl ester on invasion of human colorectal cancer cell line SL-174T*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(40): p. 6385-8.
186. Granados-Principal, S., et al., *Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer*. Breast Cancer Res, 2015. **17**: p. 25.
187. Chin, K., et al., *Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells*. Oncogene, 1997. **15**(4): p. 437-42.
188. Yang, H.T., et al., *VEGF(121)- and bFGF-induced increase in collateral blood flow requires normal nitric oxide production*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(3): p. H1097-104.
189. Cahlin, C., et al., *Effect of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibitors on tumor growth in mouse tumor models with and without cancer cachexia related to prostanoids*. Cancer Res, 2000. **60**(6): p. 1742-9.
190. Lodillinsky, C., et al., *Bacillus Calmette Guerin induces fibroblast activation both directly and through macrophages in a mouse bladder cancer model*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13571.
191. Arti Shukla, A.M.R., Ravi Shankar, *Nitric oxide inhibits wound collagen synthesis*. Molecular and Cellular Biochemistry, 1999. **200**(1): p. 27-33.
192. Cunha, G.R., S.W. Hayward, and Y.Z. Wang, *Role of stroma in carcinogenesis of the prostate*. Differentiation, 2002. **70**(9-10): p. 473-85.
193. Martinez-Outschoorn, U.E., et al., *Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co-evolution: A new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells*. Cell Cycle, 2010. **9**(16): p. 3256-76.
194. Junker, K., et al., *Analysis of genetic alterations in normal bladder urothelium*. Urology, 2003. **62**(6): p. 1134-8.
195. Kilbourn, R.G., C. Szabo, and D.L. Traber, *Beneficial versus detrimental effects of nitric oxide synthase inhibitors in circulatory shock: lessons learned from experimental and clinical studies*. Shock, 1997. **7**(4): p. 235-46.
196. Kilbourn, R.G., et al., *Strategies to reduce side effects of interleukin-2: evaluation of the antihypotensive agent NG-monomethyl-L-arginine*. Cancer J Sci Am, 2000. **6 Suppl 1**: p. S21-30.