

Autora:

Lic. Marina Pifano

Director: **Dr. Daniel F. Alonso**

Co-Directora: **Dra. Giselle V. Ripoll**

trabajo de tesis doctoral

**EFFECTO DE ANÁLOGOS SINTÉTICOS
DE VASOPRESINA SOBRE TUMORES
CON CARACTERÍSTICAS NEUROENDÓCRINAS**

2018

trabajo de tesis doctoral:

EFFECTO DE ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE VASOPRESINA SOBRE TUMORES CON CARACTERÍSTICAS NEUROENDÓCRINAS

Aspirante al Título de Doctora en Ciencia y Tecnología:

Lic. Marina Pifano

Director: Dr. Daniel F. Alonso

Co-Directora: Dra. Giselle V. Ripoll

Laboratorio de Oncología Molecular

Universidad Nacional de Quilmes

-2018-



La Tapa:

Ilustración: Resistencias, 2018

María Estela Benedetti (EBene)

Acrílico aguadas y microfibra

Diseño: Mariana Veschi Soliño

*Hay una fuerza extremadamente poderosa para la
que hasta ahora la ciencia no ha encontrado
una explicación formal.*

*Es una fuerza que incluye y gobierna a todas las otras,
y que incluso está detrás de cualquier fenómeno que opera
en el universo y aún no haya sido identificado por nosotros.*

Esta fuerza universal es el AMOR.

***A mi familia, por enseñarme que el amor, los principios y las convicciones
son los pilares fundamentales para todo lo que queramos construir***

Esta tesis fue realizada durante años donde la Ciencia y la Tecnología fueron revalorizadas en cuanto al presupuesto destinado al área como al desarrollo de la misma en pos del crecimiento económico y la justicia social. Lamentablemente, fue culminada y escrita en plena crisis debido al ajuste, por parte del actual proyecto neoliberal, a los trabajadores en su conjunto, y en particular, a la ciencia y la tecnología. Nuestro sector no sólo peligra a nivel presupuestario sino que también está en juego la Soberanía Nacional.

En los laboratorios, en las aulas y en las calles...

#NoAlAjusteEnCienciaTecnologíaYEducación

Los resultados presentados en esta tesis fueron publicados en los siguientes artículos en revistas internacionales con referatos:

2017. PEPTIDE AGONISTS OF VASOPRESSIN V2 RECEPTOR REDUCE EXPRESSION OF NEUROENDOCRINE MARKERS AND TUMOR GROWTH IN HUMAN LUNG AND PROSTATE TUMOR CELLS. PIFANO M, GARONA J, CAPOBIANCO CS, GONZALEZ N, ALONSO DF, RIPOLL GV. *Frontiers in Oncology*; 7:11. doi:10.3389/fonc.2017.00011.

2017. SEARCH OF VASOPRESSIN ANALOGS WITH ENHANCED ANTITUMOR ACTIVITY USING AN AGGRESSIVE LUNG CANCER MODEL: DRUG DESIGN BASED ON RATIONAL AND EVOLUTIONARY APPROACHES. PIFANO M, GARONA J, SOBOL N, ALBERTO M, ALONSO DF, RIPOLL GV. *Future Medicinal Chemistry*, en prensa, aceptado 25/01/2018.

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

2012. KEY AMINOACIDIC POSITIONS FOR DESMOPRESSIN (DDAVP) ANTIPROLIFERATIVE EFFECT ASSESSED BY ALA-SCANNING. PIFANO M, GARONA J, PASTRIAN B, IANNUCCI N, CASCONO O, GOMEZ D, ALONSO D, RIPOLL G. Biocell, Noviembre 2012, Vol. 36 (Sup.), pp. 69 (Resumen).

2013. ACCIÓN ANTITUMORAL DE ANÁLOGOS DE PEPTÍDICOS DE AASOPRESINA (AVP) SOBRE UNA LÍNEA DE CÁNCER PULMONAR HUMANO CON CARACTERÍSTICAS NEUROENDÓCRINAS. PIFANO M, GARONA J, PASTRIAN B, IANNUCCI N, GOMEZ D, ALONSO D, RIPOLL. Medicina Buenos Aires, Noviembre de 2013, Vol. 73, Supl. III, pp 119 (Resumen).

2014. EFECTO ANTITUMORAL DE DESMOPRESINA (DDAVP) Y SU ANÁLOGO [V⁴Q⁵]DDAVP MEDIADO POR EL RECEPTOR V2 (V2R) EN LÍNEAS TUMORALES HUMANAS CON CARACTERÍSTICAS NEUROENDÓCRINAS (NE). PIFANO M, GARONA J, PASTRIAN B, IANNUCCI N, GOMEZ D, ALONSO D, RIPOLL G. Medicina Buenos Aires, Noviembre de 2014, Vol. 74, Supl. III, pp 284 (Resumen).

2015. VASOPRESSIN ANALOGS INHIBIT CELL GROWTH IN HUMAN PROSTATE CANCER CELLS WITH NEUROENDOCRINE FEATURES. PIFANO M, GARONA J, ALONSO D, RIPOLL G.. Biocell, Noviembre 2015, Vol. 39 (Sup. 2) pp. 86 (Resumen).

2016. ANTITUMOR ACTIVITY OF DESMOPRESSIN (DDAVP) AND THE NEW ANALOG [V⁴Q⁵]DDAVP IN HUMAN SMALL CELL LUNG CANCER. PIFANO M, GARONA J, ALONSO D, RIPOLL G. Neuroendocrinology, Marzo 2016, 103(suppl 1):1-128 pp. 49 (Abstract ENETS).

2017. SEARCH OF VASOPRESSIN ANALOGS WITH ENHANCED ANTITUMOR ACTIVITY USING AN AGGRESSIVE LUNG CANCER MODEL DRUG DESIGN BASED ON RATIONAL AND EVOLUTIONARY APPROACHES. PIFANO M, GARONA J, SOBOL NT, ALBERTÓ M, ALONSO DF, RIPOLL GV. Medicina Buenos Aires, Noviembre de 2017, Vol. 77 Supl I-2017. Pp 305.

El desarrollo de este doctorado como parte de un laboratorio con trabajo interdisciplinario contribuyó a otros artículos y presentaciones a congresos:

Artículos:

2013. REDUCTION OF TUMOR ANGIOGENESIS INDUCED BY DESMOPRESSIN IN A BREAST CANCER MODEL. RIPELL GV, GARONA J, PIFANO M, FARINA HG, GOMEZ DE, ALONSO DF. Breast Cancer Research and Treatment. Vol 141. N° 2, pp 9-18.

2014. STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP OF 1-DESAMINO-8-D-ARGININE VASOPRESSIN AS AN ANTIPROLIFERATIVE AGENT ON HUMAN V2 RECEPTOR-EXPRESSING CANCER CELLS. PASTRIAN MB, GUZMÁN F, GARONA J, PIFANO M, RIPELL GV, CASCONO O, CICCIA GN, ALBERICIO F, GÓMEZ DE, ALONSO DF, IANNUCCI NB. Molecular Medicine Reports. ISSN:1791-3004, pp 2568-2572.

2014. INSIGHT INTO THE EFFECT OF THE VASOPRESSIN ANALOG DESMOPRESSIN ON LUNG COLONIZATION BY MAMMARY CARCINOMA CELLS IN BALB/C MICE. GARONA J*, PIFANO M*, SCURSONI AM, GOMEZ DE, ALONSO DF, RIPELL GV. Anticancer Research. 34(9):4761-5. *los autores contribuyen por igual.

2015. THE NOVEL DESMOPRESSIN ANALOGUE [V⁴Q⁵]pDAVP INHIBITS ANGIOGENESIS, TUMOUR GROWTH AND METASTASES IN VASOPRESSIN TYPE 2 RECEPTOR-EXPRESSING BREAST CANCER MODELS. GARONA J, PIFANO M, ORLANDO U, PASTRIAN MB, IANNUCCI N, ORTEGA H, PODESTA EJ, GOMEZ DE, RIPELL GV AND ALONSO DF. International Journal of Oncology. doi: 10.3892/ijo.2015.2952.

2015. A PHASE II DOSE ESCALATION TRIAL OF PERIOPERATIVE DESMOPRESSIN (1-DESAMINO-8-D-ARGININE VASOPRESSIN) IN BREAST CÁNCER PATIENTS. WEINBERG RS, GRECCO MO, FERRO GS, SEIGELSHIFER DJ, PERRONI NV, TERRIER FJ, SÁNCHEZ-LUCEROS A, MARONNA E, SÁNCHEZ MARULL R, FRAHM I, GUTHMANN MD, DI LEO D, SPITZER E, CICCIA GN, GARONA J, PIFANO M, TORBIDONI AV, GOMEZ DE, RIPELL GV, GOMEZ RE, DEMARCO IA, ALONSO DF. SpringerPlus 4:428 DOI 10.1186/s40064-015-1217-y

2016. ADDITION OF VASOPRESSIN SYNTHETIC ANALOGUE [V⁴Q⁵]pDAVP TO STANDARD CHEMOTHERAPY ENHANCES TUMOUR GROWTH INHIBITION AND IMPAIRS METASTATIC SPREAD IN AGGRESSIVE BREAST TUMOUR MODELS. GARONA J, PIFANO M, PASTRIAN MB, GOMEZ DE,

RIPOLL GV, ALONSO DF. Clin Exp metástasis. 33(6):589-600. Doi 10.1007/S10585-016-9799-5

2016. PHARMACOLOGICAL INHIBITION OF RAC1-PAK1 AXIS RESTORES TAMOXIFEN SENSITIVITY IN HUMAN RESISTANT BREAST CANCER CELLS. GONZALEZ N; CARDAMA GA; COMIN MJ; SEGATORI VI; PIFANO M; ALONSO DF; GOMEZ DE; LORENZANO MENNA. P. Cellular Signalling, 30, 154-161.

2017. NUTRACEUTICAL EMULSION CONTAINING VALPROIC ACID (NE-VPA): A DRUG DELIVERY SYSTEM FOR REVERSION OF SEIZURES IN ZEBRAFISH LARVAE EPILEPSY MODEL. FEAS DA, IGARTÚA DE, CALIENNI MN, MARTINEZ CS, PIFANO M, CHIARAMONI NS, ALONSO S, PRIETO MJ. Journal of Pharmaceutical Investigation. 1:9. DOI: 10.1007/S40005-017-0316-X

Congresos:

2012.. IMPROVED ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF DESMOPRESSIN ANALOGS ASSESSED BY ALAScANNING". PASTRIAN MB, GUZMAN F, RIPOLL GR, GARONA J, PIFANO M, CASCONO O, CICCIA GN, ALBERICIO F, GOMEZ D, ALONSO DF, IANNUCCI N. 32nd European Peptide Symposium. Megaron Atenas, Grecia. 2 al 7 de septiembre.

2013. STRUCTURE-ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY RELATIONSHIP STUDY OF AN IMPROVED ANALOG DERIVED FROM DESMOPRESSIN ([V4Q5]DDAVP). IANNUCCI N, PASTRIAN MB, GUZMAN F, RIPOLL GR, GARONA J, PIFANO M, CASCONO O, CICCIA GN, ALBERICIO F, GOMEZ D, ALONSO DF. 23rd American Peptide Symposium. Hawaii, Estados Unidos. 22 al 27 de Junio.

2013. LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Bs As, Argentina. 20 al 23 de Noviembre. Trabajo: "EFECTOS SOBRE LA COLONIZACIÓN METASTÁSICA PULMONAR DE DISTINTOS ESQUEMAS DE ADMINISTRACIÓN DEL COMPUESTO HEMOSTÁTICO DESMOPRESINA (DDAVP) EN UN MODELO PRECLÍNICO DE CÁNCER MAMARIO". Garona J.; Pifano M.; Pastrian B.; Iannucci N.; Gomez D.; Alonso D.; Ripoll G.

2013. EFFECT OF [4-VALINE 5-GLUTAMINE] DESMOPRESSIN, A NOVEL VASOPRESSIN ANALOG, ON HUMAN BREAST CANCER CELL GROWTH IN TWO-DIMENSIONAL (2D) AND THREE-DIMENSIONAL (3D) CULTURES. GARONA J, PIFANO M, PASTRIAN B, IANNUCCI N, GOMEZ DE, ALONSO DF, RIPOLL GV. 36th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. San Antonio, Texas, EE. UU. 10 al 14 de Diciembre.

2014. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL ANÁLOGO SINTÉTICO DE DESMOPRESINA [V⁴Q⁵] DDAVP (1-DEAMINO-4-VALINA-5-GLUTAMINA-8-D-ARGININA VASOPRESINA) EN COMBINACIÓN CON PACLITAXEL SOBRE XENOTRASPLANTES DE CÁNCER MAMARIO HORMONO-INDEPENDIENTE EN RATONES ATÍMICOS. GARONA J.; PIFANO M.; PASTRIAN MB.; IANNUCCI N.; GOMEZ DE.; ALONSO DF; RIPOLL GV. LVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Bs As, Argentina. 19 al 22 de Noviembre.

2014. PERIOPERATIVE ADMINISTRATION OF DESMOPRESSIN (DDAVP) IN BREAST CANCER PATIENTS: A PHASE II DOSE-ESCALATION STUDY WEINBERG RS, GRECCO MO, FERRO GS, PERRONI NV, TERRIER FJ, SANCHEZ LUCEROS A, DOMENICHINI E, GUTHMANN MD, DI LEO D, SPITZER E, TORBIDONI A, GARONA J, PIFANO M, RIPOLL GV, CICCIA GN, GOMEZ RE, ALONSO DF. San Antonio Breast Cancer Symposium. San Antonio, Texas, Estados Unidos. 8 al 12 de Diciembre

2016. PHARMACOLOGICAL INHIBITION OF RAC-PAK1 AXIS RESTORES TAMOXIFEN SENSITIVITY IN HUMAN BREAST CANCER CELLS. GONZALEZ N, CARDAMA GA, COMIN MJ, SEGATORI VI, PIFANO M, ALONSO DF, GOMEZ DE, LORENZANO MENNA P. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Bs As, Argentina. 15 al 19 de Noviembre

2017. PRECLINICAL EVALUATION OF THE NOVEL VASOPRESSIN PEPTIDIC ANALOG [V⁴Q⁵]DDAVP WITH ANTITUMOR ACTIVITY IN COLORECTAL CANCER. SOBOL NT, PIFANO M, RIPOLL GV, ALONSO DF, GARONA J. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias 2017. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 13 al 17 de Noviembre.

2017. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL ANÁLOGO SINTÉTICO DE VASOPRESINA [V⁴Q⁵]DDAVP EN CÁNCER COLORRECTAL: ESTUDIOS PRECLÍNICOS SOBRE CRECIMIENTO CELULAR, DISEMINACIÓN METASTÁSICA, ANGIOGÉNESIS Y COMBINACIÓN A TERAPIA ESTÁNDAR. SOBOL NT, PIFANO M, RIPOLL GV, ALONSO DF, GARONA J. XXXII Jornadas Multidisciplinarias de Oncología. Instituto de Oncología Angel H. Roffo. 26 y 27 de Octubre. Bs As, Argentina.

Índice

| | |
|--|----|
| Abreviaturas | 5 |
| Resumen | 7 |
| Introducción General | 13 |
| Tumores Neuroendocrinos (TNE): | 15 |
| Clasificación de los TNE | 17 |
| Diagnóstico de TNE | 20 |
| Alternativas terapéuticas para TNE | 23 |
| Cáncer de pulmón y próstata con características NE | 28 |
| El neuropéptido vasopresina y el cáncer | 29 |
| Desmopresina: un análogo selectivo de AVP agonista de V2r | 31 |
| Hipótesis | 35 |
| Objetivo general | 37 |
| Metodología General | 39 |
| Líneas celulares y condiciones de cultivo. | 41 |
| Análogos peptídicos | 41 |
| ENSAYOS <i>IN VITRO</i> | 42 |
| Inmunofluorescencia (IF) | 42 |
| Ensayo de proliferación celular. | 42 |
| Cultivo clonogénico | 43 |
| Migración de células tumorales | 43 |
| Tiempo de duplicación | 44 |
| qRT-PCR y RT-PCR | 44 |
| Silenciamiento de V2r | 44 |
| Bloqueo de V2r a través de antagonista no peptídico | 45 |
| ENSAYOS <i>IN VIVO</i> | 45 |
| Animales | 45 |
| Concentraciones | 45 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 45 |
| Capítulo I: Búsqueda de nuevos análogos de AVP con capacidad antitumoral: diseño de drogas basado en aproximaciones evolutiva y racional. | 47 |
| Introducción Capítulo I | 49 |
| Aproximación evolutiva como herramienta para el diseño de drogas | 51 |

| | |
|---|-----------|
| Aproximación racional como herramienta para el diseño de drogas | 52 |
| Aproximaciones evolutiva y racional basadas en el neuropéptido AVP y su análogo dDAVP..... | 52 |
| Objetivos específicos Capítulo I | 55 |
| Metodología Capítulo I..... | 57 |
| Resultados Capítulo I..... | 63 |
| Identificación del blanco molecular V2r, en las líneas NCI-H82, PC-3 y NCI-H125. | 65 |
| Evaluación de la expresión de los marcadores de diferenciación NE, NSE y CgA. | 66 |
| Evaluación del efecto sobre la proliferación celular del neuropéptido no selectivo AVP y el análogo selectivo para el V2r dDAVP sobre células NCI-H82..... | 66 |
| Diseño de drogas basado en una perspectiva evolutiva..... | 68 |
| Diseño de drogas basado en una aproximación racional mediante la técnica de <i>ala-scanning</i> | 72 |
| Evaluación del efecto antiproliferativo mediante la estimulación de V2r de los nuevos análogos, dDINT y [V ⁴ Q ⁵] dDAVP, sobre células NCI-H82. | 76 |
| Resumen Resultados Capítulo I..... | 77 |
| Discusión Capítulo I | 79 |
| Capítulo II: Estudio preclínico <i>in vitro</i> de dDAVP y el nuevo análogo [V⁴Q⁵]dDAVP sobre líneas tumorales humanas con características NE de pulmón y próstata. | 85 |
| Introducción Capítulo II..... | 87 |
| Progresión tumoral: transición epitelio mesenquimal (TEM) y diseminación metastásica | 89 |
| Apoptosis | 93 |
| TEM y diferenciación NE..... | 93 |
| Capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales | 94 |
| Objetivos específicos Capítulo II | 96 |
| Metodología Capítulo II..... | 97 |
| Resultados Capítulo II..... | 103 |
| Efecto antiproliferativo de los análogos de AVP, dDAVP y [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre células de cáncer de pulmón y próstata humanas. | 105 |
| Efecto antitumoral <i>in vitro</i> de los análogos dDAVP y [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre el crecimiento a baja densidad de células de cáncer de próstata humana PC-3..... | 107 |
| Evaluación del tiempo de duplicación de NCI-H82 y PC-3 con y sin tratamiento de | 108 |
| dDAVP y el análogo [V ⁴ Q ⁵]dDAVP. | 108 |
| Efecto de dDAVP y [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre la apoptosis en líneas tumorales de SCLC y próstata. | 109 |

| | |
|--|------------|
| Efecto antimigratorio <i>in vitro</i> de los análogos selectivos de AVP, dDAVP y [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre células de cáncer de pulmón y próstata NE..... | 112 |
| Especificidad del análogo [V ⁴ Q ⁵]dDAVP por el V2r evaluada sobre la línea NCI-H82. | 113 |
| Efecto de dDAVP sobre la modulación <i>in vitro</i> de los marcadores de diferenciación NE, NSE y CgA en las líneas tumorales estudiadas. | 115 |
| Resumen Resultados Capítulo II | 117 |
| Discusión Capítulo II | 119 |
| Capítulo III: Estudio preclínico <i>in vivo</i> de dDAVP y el nuevo análogo [V⁴Q⁵]dDAVP sobre líneas tumorales humanas con características NE de pulmón y próstata. | 127 |
| Introducción Capítulo III..... | 129 |
| Crecimiento tumoral | 131 |
| Angiogénesis | 132 |
| Angiogénesis inducida por tumor..... | 132 |
| Terapias antiangiogénicas | 135 |
| Objetivos Específicos Capítulo III | 137 |
| Metodología Capítulo III..... | 139 |
| Resultados Capítulo III..... | 145 |
| Efecto de los análogos, dDAVP y [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre el crecimiento tumoral en modelos de xenotransplante de las líneas celulares humanas, NCI-H82 y PC-3, en ratones atímicos..... | 147 |
| Efecto de los análogos, dDAVP y [V ⁴ Q ⁵]dDAVP sobre la angiogénesis tumoral en un modelo de xenotransplante de la línea celular humana NCI-H82 en ratones atímicos. | 149 |
| Resumen Resultados Capítulo III | 151 |
| Discusión Capítulo III | 153 |
| Conclusiones y perspectivas | 159 |
| Bibliografía | 165 |
| Agradecimientos | 183 |

Abreviaturas

| | |
|----------|---|
| 5-HIAA | 5-hidroxiindolacético |
| 5-HT | serotonina |
| ALA-SCAN | Ala-scanning |
| AC | Adenilato ciclasa |
| ACTH | Hormona adrenocorticotrópica |
| AMPc | Adenosín monofosfato cíclico |
| ARNm | Acido ribonucleico mensajero |
| ARNsi | Ácido ribonucleico de interferencia para silenciamiento génico |
| AVP | Arginina vasopresina |
| CA | Carcinoide atípico |
| CaP | Cáncer de próstata |
| CgA | Cromogranina A |
| CNCG | Carcinoma neuroendócrino de células grandes |
| CNE | Carcinoide Neuroendócrino |
| CT | Carcinoide típico |
| CV | Cubre objetos |
| DCM | Diclorometano |
| dDAVP | Desmopresina o 1-deamino-8-D-arginina vasopresina |
| dDINT | 1-deamino-8-D-Inotocina |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| DTT | Ditiotreitol |
| EAS | Síndrome de ACTH ectópico |
| EDTA | Factor de crecimiento epidérmico |
| EGFR | Ácido etildiaminotetraacético |
| EMB | Extracto de membrana basal |
| ESI-MS | Espectrometría de masas de ionización por electrospray |
| FGF | Factor de crecimiento de fibroblastos |
| FWW | Factor de von Willebrand |
| GPCR | Receptores acoplados a proteínas G |
| i.d. | Intradérmico |
| INT | Inotocina |
| IT | Isotocina |
| i.v. | Intravenoso |
| MEC | Matriz extracelular |
| MMPs | Metaloproteasas de matriz |
| MT | Mesotocina |
| MTS | [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, Bromuro de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio |
| MTT | Neuroendocrino |
| NE | |

| | |
|---------------------------------------|--|
| NSCLC | Cancer de pulmón de células no pequeñas |
| NSE | Enolasa neuronal específica |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OT | Oxitocina |
| PBS | Buffer fosfato salino |
| PDE | Fosfodiesterasas |
| PGNO | Plasminógeno |
| PKA | Proteína quinasa A |
| PKC | Proteína quinasa C |
| Pro | Prolina |
| RGETNE | Registro de tumores neuroendócrinos |
| RP-HPLC | Cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa |
| SAR | Relaciones de estructura actividad |
| s.c. | Subcutáneo |
| SCLC | Cancer de pulmón de células pequeñas |
| SEER | Programa de Vigilancia, epidemiología y resultados finales |
| SFB | Suero Fetal Bovino |
| SSA | Análogos de somatostatina |
| SST | Somatostatina |
| Syp | Synaptofisina |
| TC | Tumores carcinoides |
| TEM | Transición epitelio-mesenquimal |
| TIS | Disolución de triisopropilsilano |
| TNE | Tumores neuroendócrinos |
| TNE GEP | Tumor neuroendócrino gastroenteropancreático |
| TNE-P | Tumor neuroendócrino pulmonar |
| tPA | Activador del plasminógeno tisular |
| uPA | Activador del plasminógeno tipo-uroquinasa |
| [V ⁴ Q ⁵]dDAVP | 1-desamino-4-valina-5-glutamina-8-D-arginina vasopresina |
| V1ar | Receptor de vasopresina de tipo 1a |
| V1br | Receptor de vasopresina de tipo 1b |
| V2r | Receptor de vasopresina de tipo 2 |
| VEGF | Factor de crecimiento del endotelio vascular |
| VEGFR | Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular |
| VT | Vasotocina ancestral |
| WM | Peso molecular |

Resumen

Los tumores neuroendocrinos (TNE) comprenden un grupo heterogéneo de neoplasias malignas que presentan una amplia gama de características morfológicas, funcionales y comportamentales. El concepto de diferenciación neuroendocrina (NE) puede definirse como la secreción de sustancias bioactivas por las células neoplásicas. El crecimiento de TNE está regulado principalmente por señalización autócrina y parácrina a través de neuropéptidos, hormonas peptídicas y bioaminas con acciones fisiológicas definidas, estas vías de señalización dependen de la expresión de receptores específicos en las células tumorales. Las principales proteínas expresadas por estos tumores son la sinaptofisina, la cromogranina A (CgA) y la enolasa neuronal específica (NSE), entre otras. La CgA es el biomarcador más utilizado para detectar la diferenciación NE en el cáncer de próstata ya sea a nivel tisular o en la circulación general. La NSE es actualmente el marcador tumoral más confiable en el diagnóstico, el pronóstico y el seguimiento del cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC). La diferenciación NE de los tumores ha sido relacionada con la transición de las células cancerosas con características epiteliales hacia células con fenotipos invasivos y metastásicos (transición epitelio mesenquimal, TEM). En algunos tipos de cáncer, como el cáncer de próstata, también se ha vinculado la diferenciación NE con la transición de un tumor hormono dependiente hacia un tumor hormono-independiente contribuyendo esta transdiferenciación con la progresión tumoral, la resistencia hormonal y con un pronóstico desfavorable. Además, en cáncer de pulmón, la transformación de NSCLC a SCLC se asocia con mala respuesta al tratamiento y aumento de NSE en suero. Una reducción de la expresión de los marcadores NE podría indicar desdiferenciación NE.

La vasopresina (AVP) es un neuropéptido con efecto endócrino, parácrino y autócrino en tejidos normales y patológicos. Los receptores AVP están presentes en diferentes tipos de cáncer, como cáncer de pulmón, de mama, pancreático, colorrectal y gastrointestinal, con efectos contrastantes sobre el crecimiento tumoral dependiendo del subtipo del receptor. Mientras que los receptores de AVP de tipo 1 (V1a y V1b) están asociados con la estimulación de la proliferación celular, el receptor de AVP de tipo 2 (V2r) está relacionado con efectos antiproliferativos. La desmopresina (dDAVP) es un análogo sintético de AVP que actúa como un agonista selectivo para el V2r, que ha mostrado propiedades antitumorales en modelos de cáncer de mama y colorrectal.

El desarrollo de medicamentos cada vez más seguros, adecuados y eficaces para el tratamiento de enfermedades es una tarea que requiere la interacción de diferentes disciplinas. La identificación de secuencias de péptidos y el análisis de fuentes naturales es un enfoque ampliamente utilizado basado en una perspectiva evolutiva para la búsqueda de nuevos compuestos con aplicaciones terapéuticas. Por otra parte, el diseño racional de los

fármacos basados en estudios de relaciones de estructura-actividad (SAR), constituye una herramienta indispensable en el desarrollo de nuevos medicamentos.

El objetivo de la presente tesis doctoral fue desarrollar análogos de AVP diseñados mediante una aproximación racional y una evolutiva, y evaluar las propiedades antitumorales *in vitro* e *in vivo* de los análogos de AVP diseñados sobre líneas celulares con y sin características NE, incluyendo las siguientes líneas celulares: NCI-H82, agresiva de SCLC, NCI-H125, NSCLC (carcinoma escamoso de pulmón) y PC-3, cáncer de próstata.

El primer método de diseño de fármacos utilizado consistió en aplicar un enfoque evolutivo explorando péptidos bioactivos de fuentes naturales, prestando especial atención a su actividad fisiológica específica. Esta estrategia basada en la evolución nos llevó a diseñar un nuevo análogo derivatizado a partir del péptido INT presente en escarabajos, denominado dDINT. El segundo enfoque explorado se basó en la realización de un estudio SAR utilizando la técnica de Ala-scanning sobre dDAVP como compuesto de primera generación para identificar las posiciones aminoacídicas claves implicadas en su actividad antiproliferativa sobre las células NCI-H82. Previamente a ésta exploración se identificó el blanco molecular V2r y la expresión de los marcadores NE, CgA y NSE, en las líneas estudiadas mostrando que las líneas NCI-H82 y PC-3 presentan V2r y expresan los marcadores NE, la línea NCI-H82 mostró un mayor expresión tanto del receptor como de los marcadores NE por lo que fue elegida para el ala scanning.

Después de evaluar todos los derivados de dDAVP sustituidos con Ala, se demostró una estrecha relación entre la secuencia aminoacídica que pertenece al bucle conformacional de dDAVP y su actividad antiproliferativa. Como resultado, sintetizamos el nuevo análogo selectivo, [V⁴Q⁵] dDAVP, introduciendo valina y glutamina en las posiciones aminoacídicas 4 y 5, respectivamente. [V⁴Q⁵] dDAVP mostró interesantes efectos biológicos, mostrando un aumento de los efectos citostáticos en las células tumorales de SCLC en comparación con el compuesto parental dDAVP, así como también comparado con el análogo dDINT.

Los análogos de AVP, dDAVP y [V⁴Q⁵] dDAVP, fueron evaluados preclínicamente *in vitro*, donde redujeron significativamente la proliferación, el tiempo de duplicación y la migración en ambos cultivos de células tumorales, NCI-H82 y PC-3 positivas para V2r. No tuvieron efecto sobre la línea celular que no presenta características NE y no expresa V2r NCI-H125. Ambos análogos tuvieron, además, un efecto que conduciría a una regulación pro-apoptótica de las células tumorales al regular la expresión de BAX y su par anti-apoptótico: Bcl-2 o Bcl-xL en las líneas de próstata y pulmón respectivamente.

El análogo de segunda generación [V⁴Q⁵] dDAVP mostró un mayor efecto citostático que dDAVP sobre la proliferación celular en la línea celular NCI-H82. El silenciamiento de V2r usando ARN de interferencia atenuó significativamente los efectos inhibitorios de [V⁴Q⁵]

dDAVP sobre la proliferación de células NCI-H82 así como también el bloqueo del receptor mediante un antagonista competitivo no peptídico mostró el mismo efecto, confirmando así que el nuevo análogo actúa principalmente vía V2r. Curiosamente, después del tratamiento con dDAVP, la expresión de ambos marcadores NE estudiados, CgA y NSE, se redujo en las líneas celulares de cáncer de pulmón y de próstata. En los pacientes con cáncer, los niveles elevados de CgA y NSE se correlacionan con carga tumoral, número de sitios de diseminación y falta de respuesta clínica, mientras que una disminución de estos biomarcadores podría indicar un mejor pronóstico. La capacidad de dDAVP para modular los marcadores NE en diferentes tipos de tumores constituye una contribución interesante e importante para estudios posteriores.

Exploramos el efecto *in vivo* de dDAVP y [V⁴Q⁵] dDAVP en xenoinjertos de SCLC NCI-H82 y de carcinoma prostático agresivo PC-3. Los tumores tratados (0.3 µg/kg/día, tres veces por semana) crecieron más lentamente en comparación con los animales tratados con el vehículo en ambos modelos. También se observó una disminución de la angiogénesis *in vivo* en los tumores de SCLC tratados con dosis de 1 µg/kg/día de ambos análogos, mostrando de este modo el efecto antiangiogénico del compuesto. Tanto NCI-H82 como PC-3, representan modelos tumorales NE de resistencia a las terapias y enfermedad recurrente muy valiosos.

Resumiendo, en esta tesis, hemos demostrado que el diseño racional basado en SAR es una buena herramienta para el diseño de agonistas específicos de V2r. Si bien el abordaje evolutivo en este trabajo no arrojó un análogo con propiedades antitumorales mejoradas, los abordajes evolutivos en combinación con estudios de SAR y estudios computacionales podrían proporcionar la base para futuros estudios de neuropéptidos para el desarrollo de nuevos y mejores análogos con potencial aplicación terapéutica, así como también, la reinterpretación fisiológica en humanos a partir del estudio evolutivo y la actividad fisiológica en otros animales podría contribuir al entendimiento de la enfermedad.

Dada la agresividad de la enfermedad y la urgente necesidad de nuevos enfoques terapéuticos, los estudios realizados y los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, en el modelo de SCLC humano: NCI-H82, y en el modelo de cáncer de próstata con rasgos NE: PC-3, constituyen el puntapié inicial para el desarrollo preclínico de éstos análogos de AVP, agonistas de V2r en éstos tipos de cáncer, representando hallazgos que no sólo contribuyen a la búsqueda de posibles terapias para TNE, sino que también, arrojan valiosos modelos de enfermedad de alta recurrencia y resistencia a fármacos.

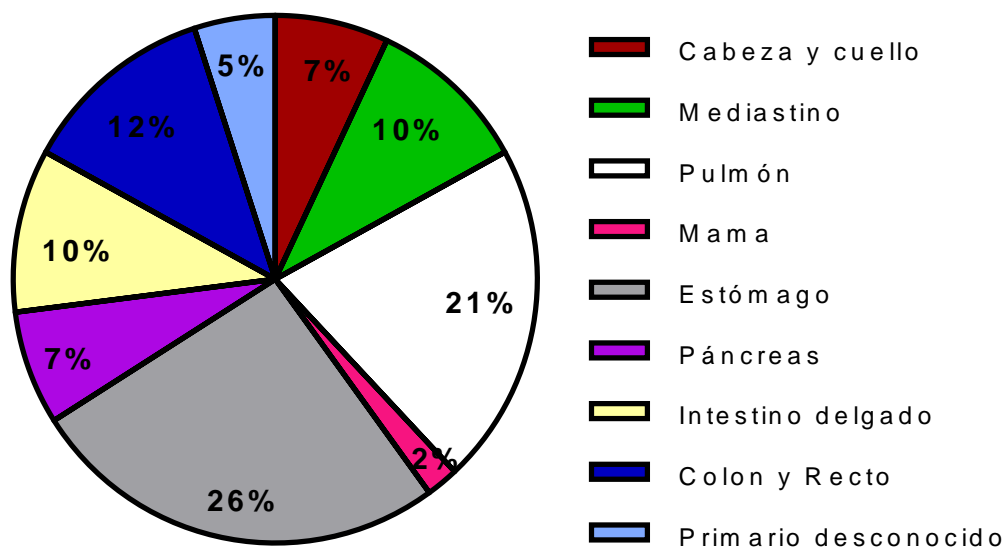
Introducción General

Tumores Neuroendocrinos (TNE):

Las células neuroendócrinas (NE) derivan de las crestas neurales y del endodermo y presentan un inmunofenotipo común con las células neuronales compartiendo algunas características como la producción de neuropéptidos, neuromoduladores y neurotransmisores, así como también la presencia de gránulos de secreción. Se diferencian principalmente de las células neuronales por carecer de axones y sinapsis. Las células NE se organizan formando glándulas (hipófisis, paratiroides, médula adrenal y paraganglios) o de forma difusa en órganos como el páncreas, el tracto intestinal y respiratorio, la vía biliar, el tracto urogenital, el timo, las células C de la tiroides y la piel. A pesar de que el porcentaje de células NE del tracto gastrointestinal representa el 1% del epitelio, en conjunto constituyen el mayor órgano endócrino del organismo, conteniendo al menos 16 tipos de células endócrinas que producen más de 50 péptidos o aminos. Aunque durante mucho tiempo se asumió que éstas células derivaban únicamente de la cresta neural y migraban al epitelio de distintos órganos, hoy se sabe que las células NE derivan también del endodermo, a partir de la diferenciación de células madre en diferentes líneas celulares y que en este proceso intervienen diversos factores de transcripción que estimulan la diferenciación NE o la inhiben: Math-1, Neurogenina 3, NeuroD, Nocht-1, entre otros [1].

Como es de esperar, los tumores derivados de éstas células (tumores neuroendócrinos; TNE) comprenden un grupo heterogéneo de neoplasias malignas que presentan un amplio rango de características morfológicas, funcionales y comportamentales [2]. En la figura IG-1 podemos ver la distribución por sitio del cuerpo de dichos tumores [3].

Figura IG-1



Modificado de Grajeda et al. 2015 [3].

Figura IG-1. Distribución porcentual de los sitios de desarrollo de TNE.

Los TNE, al igual que las células NE, expresan y producen neuropéptidos y proteínas específicas como la sinaptofisina (Syp, del inglés *synaptophysin*), la cromogranina A (CgA) y la enolasa neuronal específica (NSE, del inglés *neuron specific enolase*), entre otras [4]. Además de éstas proteínas los TNE pueden expresar hormonas del sistema endócrino [5,6]. Algunas de éstas proteínas, expresadas en los TNE, han sido escogidas, estudiadas y validadas como marcadores utilizados en la clínica, fundamentalmente para su determinación [4,5], los marcadores más utilizados son:

- marcadores citosólicos: como la NSE
- marcadores asociados a vesículas pequeñas como la Syp, la proteína de vesícula sináptica 2 (SV2), la sinaptobrevina (VAMP1 y VAMP2), proteína asociada al sinaptosoma (SNAP25), la syntaxina, la proteína transportadora vesicular de monoaminas (VMAT 1 y 2)
- marcadores asociados a gránulos secretorios grandes como la CgA y la cromogranina B (CgB), la secretogranina, las proconvertasas
- marcadores de membrana celular como la molécula de adhesión de la célula neural (NCAM/CD56)
- factores de transcripción como CDX2, TTF1
- receptores de somatostatina (SST): receptores del 1 al 5
- hormonas como la gastrina, la SST, la 5-Hidroxitriptamina (serotonina), la calcitonina, la gonadotropina, la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la insulina, el polipéptido pancreático, el glucagón, la bombesina y la ghrelina, el péptido gastrointestinal, la secretina, el péptido YY, el péptido tipo glucagón tipo 1 y tipo 2, neurotensina, histamina, motilina, sustancia P, colecistokinina.

Estas sustancias regulan un gran número de procesos como la homeostasis de la glucosa, la secreción pancreática exócrina, la motilidad y el vaciamiento gástrico, el crecimiento y la proliferación intestinal, entre otras funciones conocidas [7].

El crecimiento de los TNE está regulado principalmente por señalización autócrina y parácrina a través de neuropéptidos, hormonas peptídicas y bioaminas con funciones fisiológicas bien definidas. Existen evidencias que indican la participación de neuropéptidos específicos, como neurotransmisores y hormonas, además de en tumores de origen NE en cánceres pulmonares, gastrointestinales, colo-rectales, pancreáticos y prostáticos que sufren una diferenciación de tipo NE [8,9]. El efecto de esta señalización depende de la expresión de receptores específicos en las células tumorales y la expresión de éstos receptores se utiliza, entre otras características, para la determinación de TNE [10,11].

La CgA es el biomarcador más ampliamente utilizado para detectar la diferenciación NE en algunos tipos de cáncer, como el de próstata, tanto a nivel tisular como en la circulación general [12,13]. La NSE es actualmente el marcador más confiable para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, del

inglés *small cells lung cancer*) [14]. Tomando toda esta información en consideración es que se utiliza el monitoreo de los niveles de CgA y NSE en el suero de pacientes como marcadores de pronóstico así como también como marcadores de respuesta al tratamiento y evolución de la enfermedad [15].

Clasificación de los TNE

La clasificación de los TNE es muy compleja debido a las características heterogéneas de este tipo de neoplasias, su origen e incluso por la adquisición de características NE en tumores con orígenes muy diversos. La principal clasificación se da en función de la localización de los mismos. Así encontramos los TNE gastroenteropancreáticos (TNE-GEP) y pulmonares (TNE-P), estos surgen de células NE, por lo tanto tienen su origen en el sistema NE difuso.

Como se muestra en la figura IG-1, los TNE-GEP son los más numerosos comprendiendo entre un 60-65% de los TNE seguidos por los tumores broncopulmonares que comprenden entre un 20- 25% aproximadamente.

El primer término que hizo referencia a los tumores neurosecretorios (principalmente endócrinos) fue el de carcinoide, el cual fue utilizado por primera vez en 1907 para describir a una serie de tumores NE gastrointestinales de estructura morfológica característica, crecimiento organoide, celularidad con patrón monomorfo, con comportamiento menos agresivo que los carcinomas [16]. La primera clasificación de este grupo de tumores la realizaron Williams y Sandler [17] en 1963 y las dividieron, principalmente, por su origen embriológico en carcinoides de intestino anterior (broncopulmonares, estómago, duodeno, yeyuno proximal y páncreas), intestino medio (yeyuno distal, ileon, apéndice y ciego) e intestino posterior (colon y recto). También tuvieron en cuenta características de tinción histoquímica y comportamiento. Esta clasificación no tuvo aceptación debido a que presentaba inconvenientes a la hora de estudiar un mismo grupo, como por ejemplo los carcinoides del intestino anterior, donde hay lesiones de comportamiento biológico muy diferente [18].

De éste modo la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó en 1980 como carcinoides a la mayor parte de los tumores endócrinos (entre los que encontramos a los TNE) [16]. Se distinguieron por un lado los tumores endócrinos gastroenteropancreáticos y por otro los de otras localizaciones extragastrointestinales. Los carcinoides a su vez se subdividieron en enterocromafines, de células G o no especificados. Esta clasificación no fue lo suficientemente útil ya que los patólogos denominaron carcinoide a todos los tumores con diferenciación NE, aplicando este término a tumores con morfología clásica y a neoplasias atípicas, mientras que los oncólogos entendían como tal a aquellas neoplasias

productoras de serotonina y de síndrome carcinoide. Un problema más en esta clasificación es el hecho de que los carcinoides difieren en su comportamiento según la localización. Estas dificultades fueron las que llevaron a la nueva clasificación de la OMS en el 2000 para todos los TNE, ya no sólo para los carcinoides, sino para todos los GEP [19], que reconoce tres tipos de tumores basándose en los siguientes criterios histopatológicos:

- Grado de diferenciación
- Tamaño del tumor
- Extensión local
- Invasión vascular
- Índice proliferativo: mitosis, Ki67

Distinguiéndolos así de manera independiente de la localización del tracto digestivo en:

-Tumor NE bien diferenciado (carcinoide): comprende las neoplasias con estructura monomorfa trabecular y microlobulillar, a veces con áreas más sólidas, atipia celular leve, bajo índice mitótico (1-2 mitosis/10 campos de gran aumento) y bajo índice proliferativo valorado con Ki67 (<2%).

-Carcinoma NE bien diferenciado (carcinoide atípico): comprende neoplasias que muestran predominio de nidos sólidos, con necrosis escasa, atipia más evidente y actividad mitótica importante (2-20 mitosis/10 campos de gran aumento) a veces mitosis atípicas y un índice proliferativo valorado con Ki67 >2% y <20%.

-Carcinoma NE poco diferenciado (generalmente de células pequeñas): comprende neoplasias muy agresivas histológica y citológicamente, con atipia marcada, elevado índice mitótico (>20 mitosis/10 campos de gran aumento), mitosis atípicas y abundante necrosis. Es frecuente observar invasión vascular y perineural. El índice proliferativo es >20%.

Y para los TNE-P surge en 2004 una nueva clasificación de la OMS [20], que distingue las siguientes tipos:

-Carcinoide típico: neoplasias NE bien diferenciadas con <2mitosis/10 campos de gran aumento, sin necrosis y >0.5 cm.

-Carcinoide atípico: neoplasias NE bien diferenciadas con 2-10 mitosis/10 campos de gran aumento, y/o necrosis focal.

-Carcinoma NE de células grandes: neoplasias NE de células grandes con >10 mitosis/10 campos de gran aumento y necrosis. El tipo NE de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, del inglés *non-small cells lung cancer*)

-Carcinoma NE de células pequeñas (SCLC): neoplasias NE de células pequeñas con >10 mitosis/10 campos de gran aumento y necrosis.

En el 2010, la OMS y la Sociedad Europea de Tumores Neuroendocrinos (ENETS) realizaron la última clasificación para los TNE que modifica levemente la de 2000 [21, 22]. Esta clasificación toma las características ya utilizadas en las clasificaciones anteriores para TNE-GET y TNE-P: índice de proliferación e índice mitótico, para dividir a los TNE en grado bajo, intermedio y alto (G1, G2 y G3, respectivamente). El índice mitótico y el índice proliferativo de Ki67 son utilizados concomitantemente para la determinación del grado.

-G1: se caracteriza por un bajo índice de proliferación y es típico en los tumores bien diferenciados (BD) (típicos y atípicos).

-G3: se denomina carcinoma NE de grado 3 y presenta una alta tasa proliferativa y es típico en los carcinomas poco diferenciados (PD), entrando aquí los carcinomas de células grandes y de células pequeñas.

-G2: tiene una relevancia clínica y pronóstica doble:

1. en los tumores sin evidencia de actividad maligna, G2 puede ser la expresión de un mayor riesgo de recurrencia y, por lo tanto, indica un mayor seguimiento de los pacientes;

2. en los tumores malignos, el G2 puede ser predictivo de un comportamiento más agresivo [21,22].

En las siguientes tablas se resumen los criterios de clasificación mencionados para TNE GEP (Tabla IG-1) y para TNE-P (Tabla IG-2).

Tabla IG-1

| Clasificación de TNE-GEP según OMS (2010) | | | | | | |
|---|-------|-----------------|--------|----------------|----------------|----------|
| Tipo tumoral | Grado | Índice mitótico | % Ki67 | Tamaño celular | Diferenciación | Necrosis |
| TNE | 1 | <2 | <2 | carcinoide | BD | No |
| TNE | 2 | 3-20 | 2-20 | carcinoide | BD | Focal |
| CNE | 3 | >20 | >20 | Célula grande | PD | Si |
| CNE | 3 | >20 | >20 | Célula pequeña | PD | Si |

TNE: tumor NE; CNE: Carcinoide NE; BD: bien diferenciado; PD: poco diferenciado.

Tabla IG-2

| Clasificación de TNE-P según OMS (2010) | | | | | |
|---|-----------------|------------|----------------|----------------------|----------|
| Tipo tumoral | Índice mitótico | Citoplasma | Tamaño celular | Pleomorfismo nuclear | Necrosis |
| CT | <2 | Abundante | Grande | - | No |
| CA | 3-10 | Abundante | Grande | -/+ | Focal |
| CNCG | >10 | abundante | Grande | + | Si |
| SCLC | >10 | escaso | Pequeño | + | Si |

CT: carcinoide típico; CA: carcinoide atípico; CNCG: Carcinoma NE de Células Grandes (también llamado nSCLC); SCLC: cáncer de pulmón de células pequeñas.

Debido a que las clasificaciones, si bien han mejorado, siguen siendo limitadas desde el punto de vista pronóstico y presentan poca reproducibilidad para los patólogos se está aplicando actualmente el sistema TNM para los TNE. Esta sigla proviene de un sistema de estadificación del cáncer que tiene en cuenta el tamaño y la extensión del tumor principal o primario (de allí la T), la diseminación a ganglios cercanos (de allí la N) y si ha metastatizado o no (de allí la M) [23].

Diagnóstico de TNE

En las últimas décadas, la incidencia y la prevalencia de los TNE se han incrementado de forma llamativa. Esto puede deberse tanto a un mayor y mejor conocimiento de la biología tumoral como también a una mejora en los métodos diagnósticos.

Los TNE tienen una incidencia de entre 3-5 casos cada 100.000 habitantes por año. Los TNE-GEP representan alrededor de dos tercios de todos los TNE, siendo los más

frecuentes los localizados en yeyuno/íleon, seguidos por recto, apéndice, colon y estómago. Los TNE de yeyuno/íleon son generalmente de pequeño tamaño (<1-2 cm) y metastatizan aproximadamente en la mitad de los casos en hígado. Los TNE en general son diagnosticados en personas con una promedio de edad de 60 años. La distribución por sexos es muy similar, con pequeñas variaciones según el área geográfica (52% de mujeres en el registro SEER americano [Vigilancia, epidemiología y resultados finales], 54% de varones en el registro RGETNE español [Registro de TNE]) [24].

La presentación clínica depende de la localización del tumor, de su extensión, y de la producción hormonal. El producto clásico, para los tumores de tipo carcinoide, es la serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) y sus metabolitos de degradación. La producción en exceso de esta amina es la responsable del llamado síndrome carcinoide. Los TNE de intestino delgado son los que con más frecuencia dan lugar al llamado síndrome carcinoide. El síndrome aparece en alrededor del 10% de todos los TNE. En el 90% de los TNE con el síndrome carcinoide existen metástasis hepáticas. El síndrome típico se caracteriza por la aparición de episodios de flushing, diarrea, broncospasmo, lesiones fibróticas en válvulas cardíacas y lesiones cutáneas. En ocasiones los tumores carcinoides se presentan con síntomas gastrointestinales inespecíficos como dolor abdominal, obstrucción intestinal, entre otros síntomas, lo que con frecuencia retrasa el diagnóstico e incluso la mayoría son asintomáticos y representan un hallazgo casual (necropsia, cirugía por otro motivo, etc) [25]. Los tumores carcinoides son con frecuencia de muy pequeño tamaño lo que dificulta encontrar su localización. No todos los TNE son funcionantes, esto quiere decir que no todos producen en exceso alguna hormona polipeptídica. En los tumores funcionantes la secreción en exceso de una o varias hormonas peptídicas produce cuadros clínicos muy específicos que hacen más fácil el diagnóstico y la localización del tumor. Los tumores no funcionantes comprenden entre el 15 y el 52% de los TNE [26].

El diagnóstico se establece, en los casos en los que es posible, por el aumento de la secreción del principal metabolito de la 5-HT con la determinación del 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en orina de 24 horas. Esta determinación tiene una sensibilidad de un 75% y una especificidad de aproximadamente el 10%. La determinación de CgA en suero tiene una alta sensibilidad y es un parámetro muy útil como marcador general de TNE, pero su especificidad en carcinoides es baja, aunque su determinación tiene valor pronóstico y es útil en el seguimiento de este tipo tumor. Los pacientes con carcinoides de intestino anterior (en general carcinoides bronquiales) no suelen producir 5-HTP, sin embargo, en algunos casos, encontramos un síndrome carcinoide atípico debido a la secreción de histamina por el tumor. En estos casos, la determinación de la concentración de histamina y sus productos de degradación en orina puede ser útil para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad [27].

Todos los TNE producen CgA por eso se utiliza como marcador tumoral general de cualquier TNE, siendo especialmente útil en aquellos tumores en los que no encontramos ningún otro marcador disponible (tumores no funcionantes, etc.) y en aquellos casos en que los marcadores tumorales disponibles son inestables o difíciles de determinar, como por ejemplo, 5-HIAA. [28, 29].

Como hemos mencionado anteriormente, muchos TNE son funcionantes, presentando la capacidad de producir en exceso hormonas peptídicas, factores de crecimiento, citoquinas u otras sustancias secretadas por las células tumorales. Los pacientes con TNE con esta capacidad, tal como hemos expresado, habitualmente presentan cuadros clínicos específicos con síndromes no relacionados directamente con el tumor primario, su efecto local compresivo e invasivo o sus metástasis. Estos síndromes no relacionados al tumor, sino a la secreción de sustancias, se conocen como síndromes paraneoplásicos o efectos remotos de la malignidad. Entre estos síndromes encontramos los síndromes hormonales ectópicos, la producción hormonal ectópica ocurre habitualmente en neoplasias y, aunque prácticamente cualquier tumor puede presentar diferenciación NE, hablamos de síndromes hormonales ectópicos cuando hay síndromes endócrinos identificados clínicamente, causados por sustancias bioactivas producidas ectópicamente. Para poder definir la producción hormonal ectópica se deben poder determinar niveles circulantes elevados de la hormona en cuestión, producción hormonal endógena suprimida, presencia de un gradiente arteriovenoso en la concentración de hormona a través del tumor, y demostrar, además, síntesis y secreción de la hormona por el tejido tumoral *in vitro*. Este cuadro clínico y el exceso hormonal desaparecen con la cirugía o el tratamiento adecuado del tumor, por lo que identificar el origen ectópico de la secreción es fundamental para el diagnóstico y el tratamiento apropiado evitando contraindicaciones [30, 31].

En muchos casos, la producción hormonal ectópica y el síndrome asociado constituyen el primer síntoma de una neoplasia, y a veces resulta más importante para el paciente que el propio tumor, por lo que su tratamiento es muchas veces la mejor medida paliativa disponible en pacientes con escasa terapia alternativa. Además, como hemos mencionado en párrafos anteriores, la hormona o péptido producido en exceso puede servir como marcador tumoral, pudiendo detectarse así el tumor precozmente y determinarse su origen, así como también es fundamental para elegir su tratamiento y predecir su posible respuesta a la terapia. La producción ectópica peptídica, además, proporciona la base para el conocimiento de la biología tumoral que permite el avance de nuevas técnicas proporcionando novedosos campos de investigación tanto en oncología como en endocrinología y fisiología.

Un número importante de síndromes paraneoplásicos se relacionan con la producción de hormonas peptídicas, y la base de la producción ectópica, aún por comprender, sugiere, entre otras, dos teorías principales:

- 1)- uno o más genes esconden un cambio fundamental que no se expresa en el desarrollo celular normal
- 2)- las células de las que deriva el tumor tienen la capacidad de expresar el gen en cuestión en algún momento del desarrollo normal.

La mayoría de las teorías aceptan la naturaleza difusa del tejido endócrino tanto si es o no funcionante, y sugieren un cambio fundamental en la regulación génica que condiciona la producción ectópica hormonal [31].

Aunque existen diversos síndromes endócrinos paraneoplásicos, uno de los más comunes es el Síndrome de ACTH Ectópico (EAS). El EAS aparece principalmente en dos tipos de tumores y presenta características muy diferentes. Por un lado, el EAS que ocurre en el SCLC, es violento condicionado por la agresividad del tumor primario y por la presencia de un hipercortisolismo agudo de presentación atípica, de pronóstico desfavorable y es lo que habitualmente se diagnostica. Y por otro lado el EAS de tumor carcinoide que aparece en una neoplasia oculta, benigna, con hipercortisolismo crónico, con una presentación típica e indistinguible de la enfermedad de Cushing, con pronóstico favorable y que es detectada habitualmente por el endocrinólogo [32, 33].

El EAS, como otros síndromes humorales endócrinos ectópicos, constituye un desafío desde el punto de vista clínico, bioquímico y fisiológico. Su manejo nos obliga a pensar de manera interdisciplinar.

Alternativas terapéuticas para TNE

La cirugía es la única opción curativa en los TNE localizados de G1 y G2. En caso que no sea posible se deben tener en cuenta otras opciones terapéuticas, entre ellas los tratamientos paliativos.

En los pacientes con enfermedad metastásica o con enfermedad localmente avanzada, el tratamiento recomendado en el caso que sean TNE GEP G1/G2 incluye SST y sus análogos, interferón α , terapia con radionucleidos, inhibidores del complejo mTOR y, actualmente se están desarrollando nuevas terapias dirigidas [35]. Para los TNE primarios de pulmón y mediastino no existe aún un tratamiento definido, debido a que los estudios clínicos presentan pocos casos con estas localizaciones [36,37], de ser posible se realiza la lobectomía o la resección de la lesión [38].

La quimioterapia es la terapia de elección para pacientes con TNE de G3, particularmente en tumores originados en páncreas y pulmón. La combinación cisplatino/carboplatino y etopósido es considerada la primera línea de tratamiento con una tasa de respuesta de 40-80%, una mediana de respuesta de 8-11 meses y una mediana de supervivencia de 9-15 meses. Si es posible, se asocia radioterapia o cirugía del tumor primario a la quimioterapia [39,40]. También es recomendada para los TNE pancreáticos G2 inoperables o con metástasis hepáticas. La combinación utilizada es habitualmente estreptozotocina y 5-fluorouracilo o doxorrubicina con tasas de respuesta del 35- 40%. El uso de temozolamida sola o en combinación con capecitabina puede ofrecer respuestas parciales de un 40-70%.

Los inhibidores de tirosina cinasa como sunitinib y pazopanib son otra opción de tratamiento y han demostrado eficacia antitumoral significativa en pacientes con TNE pancreáticos [47].

Hemos mencionado que la SST y sus análogos (SSA) son una buena opción de tratamiento dirigido para algunos tipos de TNE avanzados y/o metastásicos. La SST es un neuropéptido con actividad parácrina secretado por células intestinales, pulmonares, pancreáticas y nerviosas. Actúa como un fuerte inhibidor de varias hormonas como la insulina, la gastrina y algunos factores de crecimiento muy importantes en la biología tumoral. También inhibe la proliferación, tanto de células normales como tumorales. La molécula es un péptido cíclico unido por un puente disulfuro, y su actividad biológica es ejercida mediante 5 receptores diferentes acoplados a proteína G (GPCR), presentes en muchos TNE estudiados, principalmente en TNE GET, ver tabla IG-3 [41, 42].

Tabla IG-3- Expresión de receptores de SST en TNE-GEP

| Rasgos principales | Características |
|----------------------------|--|
| Incidencia de receptores | 80-100% (principalmente en TNE pancreáticos e intestinales) 50-70% (insulinomas) |
| Densidad de receptores | Predominantemente alta |
| Distribución de receptores | Principalmente homogénea |
| Expresión de receptores | Tumor diferenciado (BD)>tumor indiferenciado (PD) |
| Subtipo de receptor | Sst ₂ >>sst ₁ >>sst ₅ >>sst ₄ |
| Localización del Receptor | Usualmente unido a membrana (sst ₂) |

Modificado de Reubi, 2007 [42].

Varios SSA han sido desarrollados mostrando una potente actividad biológica con un aumento de la estabilidad, que les otorga actividad más prolongada en comparación con el

péptido parental. Se ha demostrado que la SST y sus análogos no sólo presentan actividad antiproliferativa sino que también disparan actividad antiangiogénica en células tumorales, tanto *in vitro* como *in vivo*, destacando así la importancia que presentan algunos neuropeptidos y sus derivados sintéticos para ser usados como potenciales agentes antitumorales [43].

El uso de SSA, como los fármacos octreotido y lanreotido, es también, la terapia de referencia en TNE funcionantes de cualquier tamaño [35-43]. En la enfermedad tumoral avanzada su uso tiene un importante papel tanto en el control de la secreción hormonal anómala como en el control de la progresión tumoral. La respuesta a estos fármacos depende del patrón de expresión de sus receptores, y de que las vías celulares de respuesta estén preservadas. En términos generales los tumores menos diferenciados (ya sea porque nunca expresaron o por progresiva dediferenciación) tienen menos expresión de receptores de SST [40, 43], ver tabla IG-3.

Estos análogos (octeotrido), con acción prolongada (LAR, del inglés *long acting release*) fueron evaluados en un estudio prospectivo con asignación aleatoria y controlado con placebo (LAR 30 mg cada 4 semanas) en pacientes con TNE de intestino delgado (PROMID), se encontró eficacia antiproliferativa de octreotido LAR, con una mediana de tiempo hasta la progresión tumoral de 14.3 meses con octreotido vs. 6 meses con placebo. Con base en estos resultados, el uso de octreotido LAR es recomendando en TNE G1/G2, independientemente de que el tumor de origen muestre potencial metastásico [40, 44].

Durante el año pasado (2017), se han publicado los resultados de un estudio clínico fase III (NETTER-1) en el que se evaluó la eficacia y seguridad de ¹⁷⁷Lu-Dotatate (análogo de SST radiomarcado, una forma de radioterapia sistémica dirigida que permite la administración de radionucleidos directamente a las células tumorales) en comparación con dosis altas de octreotido de acción prolongada en pacientes con TNE bien diferenciados avanzados de intestino delgado, que hubieran presentado progresión a análogos de SST siendo positivos para los receptores de la SST. Los resultados arrojaron remisiones tumorales completas en el 2% de los pacientes y remisiones tumorales parciales en el 28%, con una mediana de supervivencia libre de progresión de 33 meses [45]. El análisis sugiere mayor supervivencia general con ¹⁷⁷Lu-Dotatate que con dosis altas de octreotido con limitados efectos tóxicos agudos resultando un tratamiento beneficioso para éste grupo de pacientes con TNE progresivos de intestino [46].

Es interesante destacar que hay una gran carencia de estudios clínicos fase II y III en TNE de pulmón; los resultados terapéuticos provienen exclusivamente de datos recuperados de la literatura en series heterogéneas o reportes de casos, constituyendo este un nicho vacío para la búsqueda de nuevas terapias dirigidas. Los estudios en desarrollo son el RAD001 en TNE avanzados, existe un subanálisis del mismo estudio publicado en 2013

(RADIANT 2-RAD001 en tumores neuroendócrinos avanzados), en el que se evaluó la eficacia y la seguridad de la administración de everolimus (inhibidor del complejo mTOR) y octreotido de acción prolongada en una cohorte de pacientes con TNE-P de grado bajo e intermedio. Se encontró una mediana de supervivencia libre de progresión de 13.6 meses para los pacientes tratados con el producto en comparación con 5.59 meses en los pacientes tratados con placebo [45]. Esta combinación también fue evaluada en TNE avanzados con síndrome carcinoide, siendo efectiva y de elección [48].

El manejo y tratamiento de los carcinoides debe ser multidisciplinario. En los carcinoides no metastásicos el tratamiento quirúrgico es el único potencialmente curativo. También puede llevarse a cabo la resección quirúrgica de las metástasis hepáticas si es posible. Otras opciones terapéuticas para las metástasis hepáticas son la quimioembolización, y la ablación con radiofrecuencia que mejoran notablemente la sintomatología del síndrome [50]. En la mayor parte de los casos tratar el síndrome metabólico asociado generado por el tumor es parte fundamental del tratamiento del tumor. Para el EAS, que constituye una enfermedad heterogénea cuya manifestación tiene múltiples causas producida por tumores con pronóstico desfavorable, la elección del tratamiento depende de la identificación del tumor, su origen, localización y clasificación. El tratamiento ideal es la cirugía, pero muchas veces no es posible, debido a la presencia de enfermedad metastásica, al diagnóstico o bien por la dificultad para encontrar el tumor primario. En estos casos, el abordaje es muy complejo ya que no existen terapias alternativas eficaces. El tratamiento farmacológico también mejora los síntomas del síndrome, especialmente los análogos de la SST ya nombrados (octreotido, lanreotido), y puede prolongar la supervivencia. Otros tratamientos son el interferon- α y la quimioterapia como ya hemos mencionado para otros TNE. Existen nuevos tratamientos en desarrollo como fármacos antiangiogénicos y los inhibidores del complejo mTOR [51].

En términos generales, no se encuentran bien establecidas las segundas líneas de tratamiento, de modo que son necesarios estudios complementarios [39,52]. Se debe realizar un abordaje multidisciplinario y el tratamiento debe ser individualizado en función del sitio de origen. Los análogos de SST deben ser empleados en aquellos pacientes que presentan captación positiva de sus receptores, con la intención de mejorar los síntomas del síndrome carcinoide. La administración continua de octreotide LAR genera un incremento estadísticamente significativo en la supervivencia libre de progresión en los pacientes con TNE de páncreas G1/G2 y, ante la progresión, pueden ser utilizados inhibidores de mTOR y tirosina cinasa. Se necesitan estudios adicionales para evaluar la eficacia del tratamiento por sitio de origen [43]. Por último, es necesario seguir conociendo la enfermedad y su biología molecular a fin de avanzar en la clasificación y la predicción del pronóstico de los TNE, así

como para favorecer el desarrollo de futuras estrategias terapéuticas. En la tabla IG-4 se presenta un resumen de las alternativas terapéuticas actuales mencionadas aquí.

Tabla IG-4- Resumen de tratamientos disponibles actualmente para los TNE

| Tratamiento | | Tipo de TNE |
|---|---|---|
| Cirugía | | Localizados de G1 y G2 Primarios pulmonares y de mediastino (de ser posible) Primario de G3 (de ser posible, luego de quimioterapia), con diseminación únicamente hepática. Metástasis hepática (de ser posible) TC no metastásicos |
| Análogos de SST (Octeotrido y Lanreotido) | | GET Avanzados, metastásicos y no metastasicos de G1 y G2 Funcionantes de cualquier tamaño, incluso metastásicos |
| Inhibidores de mTOR (everolimus) combinados o no con análogos de SST (Octeotrido) | | GET Pulmonares G1 y G2 TC |
| Interferón α | | GET Avanzados, metastásicos G1 y G2 |
| Radionucleidos (^{177}Lu -Dotatate) | | GET Avanzados, metastásicos G1 y G2 |
| Quimioterapia | (cisplatino/carboplatino y etopósido) Primera línea | G3 |
| | estreptozotocina y 5-fluorouracilo o doxorrubicina | Pancreáticos G2 inoperables y con metástasis en hígado |
| | temozolamida sola o en combinación con capecitabina | TC |
| Radioterapia (asociada a quimioterapia) | | G3 |
| Inhibidores de tirosina cinasa y antiangiogénicos (sunitinib y pazopanib) | | Pancreáticos TC |
| Embolización-Quimioembolización | | Metástasis hepáticas |

G1: Grado 1; G2: Grado 2; G3: Grado 3; TC: Tumores carcinoideos; GET: Gastroenteropancreáticos

Cáncer de pulmón y próstata con características NE

Como ya mencionamos la OMS clasifica a los TNE-P en 4 subtipos histológicos: tumores de bajo grado (G1, carcinoides típicos), tumores de grado intermedio (G2, carcinoides atípicos) y 2 neoplasias de alto grado (G3, carcinoma NE de células grandes y SCLC).

La incidencia de TNE-P es baja, los carcinoides típicos comprenden el 1-2% y los carcinoides atípicos solo el 0.2% de las neoplasias pulmonares generales. Hasta el 90% de los pacientes con TNE-P central presenta síntomas, mientras que los tumores periféricos pueden diagnosticarse de manera incidental [36,37].

El SCLC es un tipo de TNE de G3, muy agresivo, altamente metastásico, que representa el 15% de los carcinomas broncogénicos y que causa la muerte de 250.000 personas anualmente en el mundo [53, 54]. El SCLC se caracteriza por un rápido crecimiento tumoral, alta vascularización, inestabilidad genómica, desregulación de la apoptosis y metástasis temprana, entre otras características, y está asociado a más síndromes paraneoplásicos que cualquier otro tipo de cáncer, siendo la secreción inadecuada de hormona antidiurética y EAS los más comunes [54]. Casi todos los pacientes con SCLC son actuales o ex fumadores y los pacientes que sobreviven más de dos años desde el diagnóstico tienen un alto riesgo de desarrollar un segundo tumor primario [55]. Este tipo de cáncer está en aumento en países de ingresos medios y bajos.

Los tumores de SCLC, como todo TNE, tienen la capacidad de secretar hormonas polipeptídicas de bajo peso molecular y aminas biogénicas y presentan una alta heterogeneidad entre pacientes. Estos pueden contener elementos de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC del inglés *non small cells lung cáncer*, pudiendo ser éstas NE o no) y a éstos tumores se los denomina combinados [56].

Además, en cáncer de pulmón se ha reportado una transformación desde NSCLC a SCLC como un mecanismo de resistencia adquirida a la terapia con inhibidores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Estos tumores mantienen la mutación original de EGFR y desarrollan, además, la pérdida de RB1 [55]. Presentan pobre pronóstico y aumento de NSE en suero [15, 58, 59, 60,61]. En pacientes con cáncer se correlacionan niveles elevados de CgA y NSE con tamaño tumoral, número de metástasis y pérdida de respuesta clínica, mientras una disminución de estos marcadores indica mejor pronóstico [62].

Debido a la falta de tejidos resecados de SCLC para investigación es que los modelos preclínicos con células y ratones presentan una gran importancia para comprender la biología de la enfermedad y poder desarrollar investigación traslacional.

Ocasionalmente, tumores histológicamente y biológicamente parecidos a SCLC pueden surgir en otros sitios (conocidos como carcinomas de células pequeñas

extrapulmonares) [63]. En cáncer de próstata (CaP), por ejemplo, se observa una transición desde tumores primariamente andrógeno dependientes hacia tumores hormono independientes con pronóstico desfavorable. La transdiferenciación NE es fundamental en estos procesos y contribuye a la progresión tumoral y resistencia hormonal [13, 64]. Así como también, se ha detectado una transdiferenciación de tipo NE en células tumorales prostáticas y pulmonares vinculada al tratamiento, resistencia a la terapia, mayor agresividad del tumor y pobre pronóstico [60,65, 66].

Por todo esto podemos decir que la diferenciación de tumores no NE hacia rasgos NE, entre otras características, se relaciona con la transición desde células tumorales con rasgos epiteliales hacia células invasivas y con fenotipo metastásico [61]. Los tumores de SCLC, así como también los tumores que sufren una diferenciación NE como respuesta de resistencia a la terapia, representan modelos interesantes tanto para la comprensión molecular de estos tipos de cáncer como para el estudio de nuevas terapias dirigidas.

El neuropéptido vasopresina y el cáncer

La vasopresina (AVP, también denominada hormona antidiurética; ADH) es una hormona neuropeptídica sintetizada primariamente en el hipotálamo, almacenada y liberada por la neurohipófisis, presente en la mayoría de los mamíferos (Fig. IG-2).

Figura IG-2

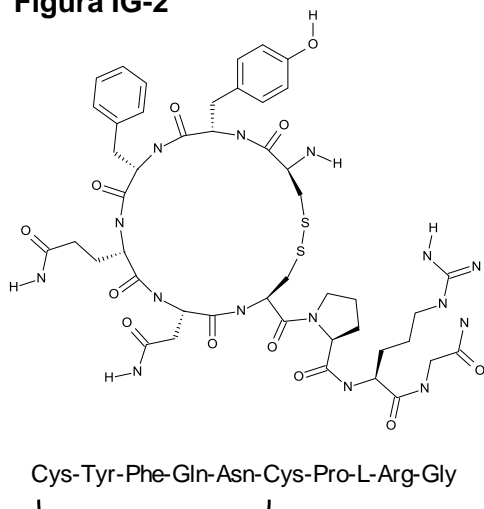


Figura IG-2. Estructura química y secuencia peptídica de la hormona neuropeptídica AVP.

La estructura química fue dibujada con BIOVIA (<http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-draw/>).

La AVP es un nonapéptido (ver secuencia en parte inferior de figura IG-2) con un puente disulfuro entre las cisteínas de las posiciones 1 y 6, que tiene un efecto principalmente endócrino pero también puede ser secretada por tejidos normales y patológicos ejerciendo actividades autócrinas y parácrinas [65].

Los efectos de AVP son mediados por tres tipos de receptores de membrana pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR). Estos

receptores son receptores de tipo 1 (V1ar y V1br también llamado V3r) y receptores de tipo 2 (V2r) y tienen numerosas acciones centrales y periféricas [68,69]. Los receptores de AVP son proteínas de membrana, cuyos tamaños oscilan entre 371 y 424 aminoácidos, formados por 7 hélices transmembrana unidas por 3 bucles intracelulares y 3 bucles extracelulares. Dentro de la misma especie los tres tipos de receptores presentan una homología de secuencia del 45%. Además, estas isoformas son conservadas evolutivamente entre especies, alcanzando un 90% de homología para un tipo de receptor en particular. Los miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de un puente disulfuro entre el primer y segundo bucle extracelular, y una arginina conservada en el triplete Arginina (Arg)-Ácido aspártico (Asp)-Tirosina (Tyr) localizada en el segundo bucle intracelular [70].

La función principal de la AVP en mamíferos es mantener el balance hidrosalino, causando un efecto antidiurético e incrementando la presión arterial [71]. Despliega también otras acciones incluyendo la agregación plaquetaria, la liberación del factor de von Willebrand (FVW), el factor VIII de la coagulación y el activador tisular del plasminógeno (tPA) [72]. Los V1ar se expresan en la musculatura vascular donde median la contracción muscular, y también en cerebro, corteza adrenal, tejido adiposo y hepatocitos. Los V1br se expresan principalmente en la glándula pituitaria anterior, la medula adrenal, los islotes de Langerhans y el tejido adiposo blanco regulando el eje hipotalámico-pituitaria-adrenal. V2r se expresa en los túbulos colectores del riñón y las células epiteliales del endotelio vascular, estimulando la reabsorción de agua y la liberación de factores hemostáticos desde la microvasculatura [72].

De modo interesante, se ha reportado producción *in vitro* de AVP en algunos tipos de cánceres como SCLC y síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética en pacientes con cáncer de pulmón y de próstata [73,74]. Existen evidencias de la presencia de receptores (V1ar, V1br y V2r) para AVP en SCLC [75, 76,77], en cáncer mamario [75,78,79] y carcinoma de colon [8,11], entre otros.

No está esclarecido por completo cuál sería la ventaja adaptativa que ofrece la presencia de estos receptores en la superficie de las células tumorales, aunque se ha establecido que los receptores V1 están vinculados a la estimulación del crecimiento del tumor mientras que V2r se encuentra asociado al efecto contrario [80]. Este último se expresa además de en los tejidos ya mencionados en células epiteliales transformadas y en algunas variantes tumorales, incluidas cáncer pulmonar, mamario y colo-rectal [8,1, 75-79]. La acción antiproliferativa de las vías asociadas a V2r se encuentra relacionada directamente con un aumento en los niveles de AMP cíclico (AMPc), tras la activación de la adenilato ciclasa (AC). La AC puede responder a señales de otras subunidades de la proteína G, y distintas quinasas tales como la PKC o la proteína quinasa dependiente de AMPc (proteína quinasa A o PKA), entre otras proteínas. El AMPc producido por la AC es

degradado por fosfodiesterasas (PDE). [80, 81]. La PKA activada puede migrar a núcleo y fosforilar la proteína reguladora de respuesta a AMPc cíclico CREB (del inglés *cAMP response element binding protein*). CREB, luego de reclutar a su coactivador, la proteína de unión a CREB (CBP), induce la expresión de múltiples genes blanco regulando eventos que incluyen procesos metabólicos, de señalización, proliferación, diferenciación y supervivencia [81].

Desmopresina: un análogo selectivo de AVP agonista de V2r

La desmopresina (dDAVP) es un análogo sintético de AVP con una desaminación de la cisteína en posición 1 (que genera el ácido 3-mercaptopropiónico; Mpa) que prolonga su vida media, presentando efecto antidiurético por más tiempo y una sustitución de L-Arginina (L-Arg) por D-Arginina (D-arg) en posición 8 que reduce el efecto presor disminuyendo la afinidad con V1r (Fig. IG-3)

Figura IG-3

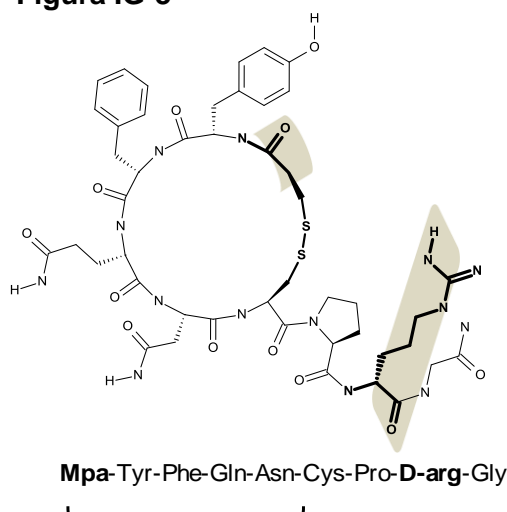


Figura IG-3. Estructura química y secuencia peptídica del análogo sintético de AVP, Desmopresina (dDAVP).

La estructura química fue dibujada con BIOVIA (<http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-draw/>).

El análogo sintético dDAVP es así un agonista selectivo de V2r, dicho receptor está presente, como ya hemos mencionado, en las células de los túbulos colectores del riñón, en las células del endotelio vascular normal y transformado y en las células de algunos tipos tumorales. El péptido presenta propiedades hemostáticas utilizadas en varias aplicaciones clínicas como desórdenes de sangrado y otras enfermedades hemostáticas [71,72]. Los efectos hemostáticos del péptido están dados por la liberación endotelial del factor de coagulación VIII, el tPA y particularmente el FVW. El FVW es una glicoproteína con un rol clave en el mantenimiento de la hemostasia del organismo, facilita la adhesión de las plaquetas al subendotelio y además funciona como un transportador del factor VIII de la coagulación, protegiéndolo de la degradación proteolítica. El FVW es sintetizado como una proteína precursora en las células endoteliales y megacariocitos. Los multímeros de FVW son almacenados en gránulos secretorios especializados llamados cuerpos de Weibel-

Palade. La dDAVP activa los receptores V2r e induce la secreción del FVW a través de la liberación de los cuerpos de Weibel-Palade. Por otra parte, dDAVP induce un incremento en los niveles plasmáticos del factor VIII de la coagulación, aunque los mecanismos por los que esto se lleva a cabo no son aún totalmente conocidos. La dDAVP podría inducir la secreción del factor VIII o favorecer su protección de la degradación proteolítica por el incremento del FVW.

Mencionamos previamente que uno de los factores de coagulación liberados por la acción hemostática de dDAVP es el tPA, una enzima proteolítica encargada de convertir el plasminógeno en plasmina *in vivo* y de esta manera iniciar la degradación de fibrina. La mayor parte de la plasmina es rápidamente transformada en un complejo α_2 -antiplasmina y no produce fibrin(ógeno)olisis en la sangre circulante [82]. Por lo tanto, generalmente no se necesita inhibir la fibrinólisis cuando se usa dDAVP con fines terapéuticos. En respuesta a dDAVP, se produce un incremento rápido del tPA plasmático, como ocurre con la administración sistémica de agentes β -adrenérgicos. La co-localización del FVW y el tPA en el mismo compartimiento podría explicar el efecto coordinado de la dDAVP sobre los niveles plasmáticos de estas dos proteínas [83].

Además, la dDAVP induce un incremento transitorio de la expresión de P-selectina sobre el endotelio vascular. Los primeros estudios indicaron que la expresión de P-selectina en las células endoteliales es muy importante durante el inicio de la interacción entre leucocitos y células endoteliales, conocido como rodamiento, requisito inicial para la adhesión y migración leucocitaria [84]. Además, se ha demostrado que la dDAVP incrementa la capacidad de los monocitos sanguíneos de unirse activamente a las plaquetas, debido a la expresión de ligandos sialilados de P-selectina sobre la superficie de los monocitos [85].

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

Luego, el espectro de uso de dDAVP con fines médicos fue ampliado. A fines de los 70, se introdujo el uso de dDAVP para el tratamiento de las coagulopatías hereditarias más comunes, la Hemofilia A y la enfermedad de von Willebrand. Dos enfermedades vinculadas a deficiencias de factores de coagulación. La Hemofilia A es una patología causada por la deficiencia del factor VIII y la enfermedad de von Willebrand es causada por una deficiencia,

tanto en cantidad como en calidad, del FVW. El tratamiento con dDAVP ha mostrado ser muy eficaz, seguro y con buena tolerancia también en el manejo de desórdenes de la coagulación inducidos por drogas, anormalidades en el funcionamiento plaquetario causado por falla renal o hepática y en cirugías con alto riesgo de sangrado que involucran a pacientes que no necesariamente presentan desórdenes en la coagulación [86,87].

Los efectos de dDAVP sobre células tumorales han sido estudiados en nuestro laboratorio demostrándose por primera vez que dDAVP es capaz de reducir la capacidad metastásica en cáncer mamario murino [88], posee actividad antiangiogénica provocando una reducción significativa de la vascularización de los implantes tumorales en ratones [89] y presenta un efecto antiproliferativo y antimetastásico en cáncer de colon [90]. Nuestros estudios también han demostrado que el tratamiento perioperatorio de dDAVP reduce drásticamente las metástasis en pulmón y en nódulos linfáticos en un modelo de manipulación y cirugía de carcinoma mamario de ratón [91].

Además de sus propiedades metastásicas, dDAVP presenta propiedades citostáticas [92] y antiangiogénicas. Las propiedades sobre la diseminación tumoral fueron demostradas por primera vez en cáncer mamario murino en 1999 en nuestro laboratorio [93], y confirmadas posteriormente en otros estudios [88, 91, 94]. También se ha evaluado el efecto *in vitro* sobre la agregación de las células tumorales, donde las células incubadas en plasma de animales tratados con dDAVP permanecían principalmente como una suspensión monocelular, estos resultados indicarían que los factores de la hemostasia liberados desde el endotelio vascular por acción de dDAVP, tales como la proteasa tPA o el FVW, podrían modular la agregación multicelular y reducir la formación de émbolos tumorales circulantes, limitando así el potencial metastásico de las células diseminadas [93]. En este mismo sentido Terraube *et al.* mostraron que el factor de FVW juega un rol protector contra la diseminación de las células tumorales en un modelo murino deficiente para el factor de FVW [94].

Por otro lado, fue muy interesante el hallazgo de que la dDAVP presenta un efecto antoangiogénico en cáncer mamario. Se demostró que este efecto está dado por la producción mediada por el tumor vía V2r de angiostatina, un potente agente antiangiogénico que se genera a partir del clivaje del plasminógeno presente en la matriz extracelular (MEC). El agregado de dDAVP *in vitro* moduló de manera positiva la generación de angiostatina en líneas de cáncer mamario positivas para V2r pero no en las variantes tumorales negativas para V2r. La producción de angiostatina en presencia de dDAVP se correlacionó con la producción de proteasas, mostrando un aumento considerable de los niveles de activadores de plasminógeno en los medios condicionados por las células tumorales, así como también se encontró una modulación positiva de las metaloproteasas de matriz (MMPs) expresadas

por las líneas tumorales [89]. En distintas líneas tumorales se demostró que los activadores del plasminógeno se asocian directamente con la generación de angiostatina [95].

De este modo dDAVP parece inducir un efecto antitumoral dual al actuar sobre los V2r de las células tumorales y sobre los receptores del endotelio microvascular, rompiendo así el diálogo necesario para la progresión tumoral entre las células tumorales y endoteliales [96].

Las propiedades citostáticas de dDAVP mediante la estimulación selectiva del V2r, tal como fue explicado para AVP, se ha vinculado a la activación de la enzima AC, con el subsecuente aumento de los niveles de AMPc y la actividad de la PKA [78, 80, 97, 98]. Se ha reportado ampliamente que incrementos en los niveles de AMPc intracelular usando análogos permeables de AMPc tales como el 8-Br-AMPc o agentes elevadores de AMPc, como algunas hormonas y forskolina, pueden conducir al arresto del ciclo celular, a la inhibición de la migración y a respuestas proapoptóticas de numerosas variantes de células tumorales, entre ellas cáncer mamario [99,100]. Con estos estudios varios autores han postulado que la vía de señalización AC/AMPc/PKA funciona como un sistema supresor del crecimiento tumoral en cáncer de mama y sugieren que podría ser utilizado como blanco para el bloqueo de la progresión tumoral [100, 101].

Por todo lo expuesto podemos sintetizar que el péptido sintético dDAVP al actuar sobre los V2r de las células tumorales y sobre los receptores del endotelio microvascular, ejercería un doble mecanismo antitumoral: (a) acción citostática y angiostática en las células tumorales, estimulando la producción de AMPc, estimulando señales intracelulares antiproliferativas y generando un ciclo proteolítico que lleva a la producción de angiostatina; (b) liberación endotelial de factores de la coagulación por parte del endotelio vascular, que mejoran la hemostasia e interfieren la anidación y sobrevida de células metastásicas [80,94,95,96].

Nuestro laboratorio ha comenzado luego de todos éstos hallazgos la búsqueda de nuevos análogos de AVP con el fin de encontrar análogos mejorados y de complejizar nuestras interpretaciones del mecanismo de acción de los agonistas del V2r. Se han sintetizado y estudiado de manera racional un amplio panel de péptidos derivados de dDAVP [92, 102]. También se sabe que el conocimiento de la historia evolutiva y la determinación de la presencia de neuropeptidos, en particular los genes de péptidos tipo AVP que son muy antiguos y conservados encontrándose la superfamilia AVP/oxitocina (OT) presente tanto en vertebrados como en invertebrados [103], puede enriquecer y complejizar nuestras interpretaciones fisiológicas y nuestra comprensión de los mecanismos de acción de la AVP así como también arrojar luz al diseño de nuevos análogos.

Hipótesis

El desarrollo de esta tesis doctoral se basa en 3 hipótesis centrales arrojadas a partir del análisis de los antecedentes mencionados previamente:

- Si V2r, uno de los subtipos de receptores de la superfamilia de GPCR de la hormona neuropeptídica altamente conservada AVP, está asociado a efectos antitumorales, y está presente en TNE y tumores con transdiferenciación NE; entonces los análogos de AVP agonistas de V2r tendrían un efecto antitumoral en dichos tumores.

-Si, el conocimiento evolutivo de la molécula AVP en el reino animal y el diseño racional a partir de la molécula de dDAVP proporcionan una fuente para el desarrollo de nuevos análogos con propiedades antitumorales en TNE; entonces éstos conocimientos permitirían el diseño de análogos mejorados.

-Si los análogos peptídicos de AVP, agonistas de V2r, activan una respuesta en las células de TNE que expresan dicho receptor, que lleva a reducir la proliferación y la migración celular, favorecer la producción de efectores antiangiogénicos, estimular la diferenciación celular, y reducir el crecimiento tumoral; entonces éstos análogos constituirían posibles terapias para dichos tumores con características NE agresivos y con pocas alternativas terapéuticas.

Objetivo general

El objetivo de la presente tesis doctoral se centró en diseñar, mediante una aproximación racional y una evolutiva, análogos de AVP agonistas selectivos para el V2r; y evaluar las propiedades antitumorales *in vitro* e *in vivo* de éstos nuevos análogos de AVP sobre líneas celulares con características NE, incluyendo las siguientes líneas celulares: NCI-H82, agresiva de SCLC y PC-3, adenocarcinoma de próstata y sobre líneas sin características NE como la línea NCI-H125 de NSCLC (tipo carcinoma escamoso).

Metodología General

*(Solo se explica la metodología general los detalles de los ensayos estarán especificados en
cada capítulo)*

Líneas celulares y condiciones de cultivo.

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron las siguientes líneas de células tumorales humanas: NCI-H82 (#HTB-175™), una variante de SCLC derivada de sitio de metástasis (efusión pleural); NCI-H125 (#CRL-5801™), una línea de NSCLC y dentro de éstos de carcinoma escamoso; PC-3 (#CRL-1435™), una línea de adenocarcinoma prostático humano grado IV hormono independiente derivada de sitio de metástasis (hueso) y MCF-7 (# HTB-22™) una línea de carcinoma mamario humano derivada de sitio de metástasis (efusión pleural). NCI-H82 crece formando cúmulos y las demás líneas se adhieren al sustrato formando monocapas confluentes. Todas las líneas, excepto MCF-7, fueron mantenidas en RPMI 1640 (Gibco) con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, 2 mM de glutamina y 80 µg de gentamicina. La línea MCF-7 se mantuvo en D-MEM (Gibco) con 10% de SFB inactivado por calor, 2 mM de glutamina y 80 µg de gentamicina. Todas las líneas fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC).

Todas las células adherentes utilizadas fueron subcultivadas aproximadamente tres veces por semana, usando una solución de disociación enzimática con 0.025% de tripsina y 0.01 % de ácido etildiaminotetraacético o EDTA (Gibco) diluido en solución de *buffer* fosfato salino (PBS). La viabilidad celular fue evaluada usando la técnica de exclusión con el colorante vital azul tripán.

Análogos peptídicos

Los análogos sintéticos, en el inicio de la tesis, fueron sintetizados en el marco de un convenio de co-desarrollo entre la Universidad Nacional de Quilmes y la compañía Romikin S.A. Las responsables de la síntesis fueron las Dras. Nancy Iannucci y María Belén Pastrán de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Biotecnología, Universidad de Buenos Aires. Los péptidos se sintetizaron en fase sólida con protección N α -Fmoc mediante la estrategia de bolsa de té. Los productos sintéticos fueron purificados por la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC, del inglés *reversed-phase high-performance liquid chromatography*) e identificados mediante espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS del inglés *electrospray ionization mass spectrometry*). La cuantificación se realizó utilizando como referencia un estándar comercial de dDAVP adquirido de BCN *Peptides* (San Quinti de Mediona, Barcelona, España). La droga liofilizada fue resuspendida y diluida para los ensayos *in vivo* en solución fisiológica. En una segunda etapa, los péptidos fueron comprados en *American Peptide Company, Inc.* (Miembro de BACHEM). En cada capítulo especificaremos como se obtuvieron los péptidos utilizados y en que concentración o tratamientos fueron empleados.

ENSAYOS *IN VITRO***Inmunofluorescencia (IF)**

Con el objetivo de detectar la presencia del V2r en las líneas tumorales estudiadas, las células fueron sembradas sobre cubre objetos (CV) ubicados en una placa de 12 pocillos en medio suplementado con 10% de SFB. Los CV fueron lavados con PBS en frío. Se fijaron las células sobre los CV con 0.5 ml de paraformaldehído 4% por pocillo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se incubaron los CV en 0.5 ml de NH₄Cl 50 mM por 5 minutos para exponer y fijar epítopes. Tras lavar con PBS, los CV fueron incubados en 0.5 ml de SFB al 3% por 15 minutos para bloquear sitios inespecíficos y reducir el ruido de fondo. Los CV se incubaron durante 1 hora en cámara húmeda a 37°C con 50 µl de una dilución 1:50 del anticuerpo primario de conejo anti-V2r (Santa Cruz *Biotechnology*). La unión del anticuerpo primario fue detectada mediante incubación con una dilución 1:400 de un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína en PBS 0.1% SFB (Caltag). Finalmente, las células fueron montadas en medio con 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para contrastar núcleos. Se almacenaron en -20°C protegidos de la luz hasta visualizarlos en el microscopio. Se utilizó el microscopio de fluorescencia Nikon TE-2000 y las fotografías fueron adquiridas con el software Nikon NIS-Elements.

Ensayo de proliferación celular.

Para medir la proliferación celular se utilizó un ensayo metabólico basado en la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales (método del MTT (reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazo, para células adherentes o el método del MTS (reducción metabólica del bromuro de 3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboxi-metoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) para células que crecen en suspensión). Las células tumorales se sembraron en medio con 10% de SFB en placas de 96 pocillos. A las 24 horas se cambió el medio de cultivo y se llevaron a cabo los tratamientos con los distintos análogos sintéticos a distintas concentraciones (ver en cada capítulo). Tras 72 horas de incubación con los análogos el ensayo se reveló agregando 20 µl de MTT o MTS (Sigma) en una concentración inicial de 5 mg/ml en medio de cultivo sin rojo fenol. Se incubó a 37°C, se descartó el medio, en el caso del ensayo de MTT, y se disolvieron los cristales de formazan en 200 µl de dimetil sulfóxido (DMSO). Por último, se leyó la absorbancia a 570 nm para el ensayo de MTT o 490 nm para el ensayo de MTS.

Cultivo clonogénico

Adicionalmente, los efectos antiproliferativos de los análogos fueron evaluados en cultivos celulares de baja densidad utilizando un ensayo de crecimiento clonogénico. Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos y cultivadas durante 7 días en medio completo con concentraciones específicas de análogos peptídicos (ver capítulo correspondiente). El medio completo con droga o vehículo (PBS) fue reemplazado cada 72 horas. Los cultivos fueron luego fijados con una solución al 10% v/v de formalina y teñidos con cristal violeta 0.5% para facilitar el conteo de colonias.

Migración de células tumorales.***Ensayo de herida en monocapa.***

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y crecidas en presencia de medio suplementado con 10% SFB. Cuando las células alcanzaron 95% de confluencia en cada pocillo, se realizaron tres heridas sobre la monocapa con un tip de p200 y la placa se incubó a 37°C durante 20 horas en presencia de los análogos o PBS. Una herida control se realizó 1 hora antes de finalizar el ensayo. Las células fueron lavadas con PBS, fijadas con una solución al 10% v/v de formalina y luego teñidas con una solución al 5% p/v de azul de toluidina. El área invadida de 10 campos aleatorios por pocillo fue cuantificada usando el programa Image J (NIH).

Migración en Transwell®

Se utilizaron insertos para cultivo celular (Corning) para placas de 24 pocillos con poro de 8 µm. Se crecieron las células 24 horas en medio con 10% de SFB y luego fueron mantenidas durante 24 horas en condiciones de baja concentración de suero. Posteriormente las células fueron sembradas en el compartimiento superior de la cámara en medio sin suplementar en presencia de los distintos análogos peptídicos o del vehículo mientras que en la parte inferior de la cámara se agregó SFB al 10% como quimioattractante. Luego de un período de incubación de 16 horas, las células que atravesaron la membrana porosa fueron fijadas y teñidas o fueron obtenidas directamente del compartimiento inferior en las líneas en las que las células logran atravesar la membrana para ser cuantificadas bajo microscopio. Las células presentes en la parte superior de los filtros fueron retiradas suavemente con un hisopo de algodón. El número de células que migraron y lograron atravesar la membrana en el grupo control fue considerado como el 100%.

Tiempo de duplicación

Las células fueron sembradas en places de 12 pocillos en presencia de análogos o vehículo. Las células viables fueron contadas cada 24 horas por 3 días en cámara de Neubauer usando el método de exclusión de azul tripán.

qRT-PCR y RT-PCR

Se evaluó la presencia del V2r, la expresión y modulación de marcadores NE y la expresión de las proteínas involucradas en la vía intrínseca de la apoptosis BAX, Bcl-2 y Bcl-xL por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa (qRT-PCR, del inglés *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*). La expresión del V2r y del marcador NE NSE fue determinada también mediante reacción en cadena de polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR del inglés *reverse transcription polymerase chain reaction*).

El ARN total de células fue purificado por extracción con Trizol (Invitrogen). La muestra fue cuantificada mediante espectrofotometría UV a 260 nm y se evaluó la pureza de cada una de las muestras analizando la relación de absorbancia 260/280 nm. Luego el ARN extraído fue sometido a transcripción reversa (RT). Para la reacción de RT, 1 µg de ARN molde junto a 500 ng de primers oligodT (12-18 pares de base o pb de longitud) y 1 µl de un mix de 10 mM de dNTPs fueron incubados a 65°C durante 5 minutos y luego 1 minuto en hielo. Tras el agregado de ditiotritol (DTT), buffer de primera cadena, inhibidor de ARNasa y la retrotranscriptasa SuperScript III (Invitrogen) se incubó la mezcla durante 50 minutos a 50°C. Se inactivó la reacción de polimerización a 70°C durante 15 minutos. Una vez obtenido el ADNc se realizó la qPCR.

Los primers específicos se encuentran detallados en los capítulos correspondientes. La qRT-PCR se realizó usando *SYBR Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific Inc) y el Sistema de PCR en tiempo real *StepOne* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 48°C por 30 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos seguidos por 60°C por 60 segundos.

Para la RT-PCR un volumen de 4 µl del mix resultante de la reacción de RT se agregaron a 20 µl de Supermix (Invitrogen) junto a los *primers Forward y Reverse* (1 µl de una solución stock de 20 pmoles/ul cada uno). Las RT-PCR se visualizaron mediante la confección de geles 2% de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Silenciamiento de V2r

Para determinar la especificidad de los análogos por el V2r se realizó el ensayo de proliferación celular de las líneas tumorales silenciando V2r. Se realizaron dos rondas de transfección de las células utilizando ARN de interferencia (ARNi) para el V2r o ARNi control

utilizando Lipofectamina 2000 (Life Technologies) siguiendo indicaciones del proveedor. A los 7 días las células fueron sembradas y tratadas por 72 horas con los análogos. La proliferación celular se midió utilizando el ensayo de metabolización de MTS o MTT tal como se describió previamente.

Bloqueo de V2r a través de antagonista no peptídico

Para estudiar la selectividad de los análogos se utilizó un bloqueo del receptor incubando las células con el antagonista no peptídico (químico) competitivo del V2r *Tolvaptan* coincubado con los análogos y evaluando la proliferación celular por los ensayos ya mencionados.

ENSAYOS *IN VIVO*

Animales

Para los ensayos *in vivo*, se utilizaron ratones inmunocomprometidos atímicos machos BALB/c Fox1nu^{-/-}, de 6-12 semanas de edad y un peso de 20-25 gramos provistos por el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Los animales fueron mantenidos en jaulas de a 5-10 ratones, con temperatura y ciclos de luz-oscuridad controlados, con libre acceso al agua y alimento en camas de viruta. Los animales inmunocomprometidos fueron mantenidos en gabinetes de aislamiento en condiciones estériles con aire filtrado (HEPA 99.99%) con acceso a agua, alimento y viruta esterilizado.

Se evaluó latencia, toma, crecimiento y agresividad tumoral tras el implante subcutáneo (s.c.) de las distintas líneas celulares humanas en el flanco de ratones atímicos Balb/c Fox1nu^{-/-} y colonización pulmonar mediante inyección intravenosa (i.v.) de las células tumorales. En cada capítulo se detallará el protocolo llevado a cabo.

Concentraciones

Los experimentos *in vitro* fueron llevados a cabo usando concentraciones de los análogos en el rango nanomolar (nM) y micromolar (μM) bajo, un rango consistente con las dosis empleadas *in vivo* [89, 91, 92].

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa *GraphPad Prism 6*, versión 6.01 (*GraphPad Prism Software*, La Jolla, CA, Estados Unidos). Los resultados presentados son expresados como media ± error estándar (SEM), media ± desvío estándar (SD), media ± Intervalos de confianza para la media al 95%(IC95) o mediana ± rango intercuartil (IQ), según corresponda. La normalidad de los datos fue testeada por medio de

la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad fue determinada con la prueba de Barlett. Para comparaciones entre grupos experimentales se utilizó ANOVA con diseño simple completamente aleatorizado, ANOVA factorial o ANOVA de medidas repetidas según corresponda. Para ANOVA de medidas repetidas fue utilizada la corrección de Geisser-Greenhouse para cumplir el supuesto de esfericidad. Los tiempos de duplicación se calcularon usando la ecuación de crecimiento exponencial y los ajustes de las curvas fueron comparados. Los datos que no superaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas fueron analizados con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se utilizaron como test a posteriori la prueba de Dunnett, la de Tukey, la comparación de IC95 o la prueba de Dunn según corresponda. Los datos analizados fueron arrojados de al menos 3 experimentos independientes de al menos un $n=6$ cada uno. Se consideraron estadísticamente significativas las pruebas que tuvieron un $p<0.05$. En los protocolos de progresión tumoral las tasas de crecimiento representan las pendientes de las regresiones lineales de los volúmenes tumorales en función del tiempo.

Capítulo I: Búsqueda de nuevos análogos de AVP con capacidad antitumoral: diseño de drogas basado en aproximaciones evolutiva y racional.

Introducción Capítulo I

Como se ha mencionado en la introducción general, nuestro laboratorio viene evaluando desde hace tiempo el efecto antitumoral de la dDAVP, un análogo sintético agonista del V2r de la hormona neuropeptídica AVP, y ha comenzado el estudio de análogos de la dDAVP a fin de encontrar nuevos compuestos con actividad antitumoral aumentada y para comprender la base estructural del efecto antitumoral encontrado. Así como también ha sido un objetivo de nuestro grupo extender el estudio del efecto antitumoral a nuevos tipos de tumores con pocas alternativas terapéuticas.

El desarrollo de medicamentos adecuados, seguros y efectivos para el tratamiento de enfermedades es una tarea que requiere de la interacción de diferentes disciplinas. La química medicinal se dedica al diseño y síntesis de nuevos compuestos bioactivos a partir de la información biológica previamente generada desde distintos campos disciplinares. Esta información, incluye la generada por el campo evolutivo, fisiológico, bioquímico, computacional y por otras disciplinas que utilizan un gran abanico de aproximaciones metodológicas.

Aproximación evolutiva como herramienta para el diseño de drogas

La identificación y análisis de secuencias peptídicas naturales presentes en organismos vivos es una aproximación ampliamente usada para el desarrollo de nuevos compuestos con aplicaciones terapéuticas, constituyendo de este modo la diversidad biológica, una de las principales fuentes de compuestos líderes farmacológicos. En la naturaleza encontramos un gran número de péptidos con funciones muy variadas. Todos los organismos, desde los microorganismos hasta el hombre, presentan alguno de éstos péptidos con una actividad determinada. Durante la evolución de la vida se ha ido generando y diversificado una sofisticada colección de péptidos ricos en di-sulfuros combinándose asombrosamente a lo largo de millones de años dando como resultado el gran abanico de péptidos que encontramos hoy. Muchos productos peptídicos naturales producen actividades biológicas a través de blancos moleculares variados y a veces no relacionados. Entre estos péptidos encontramos un gran número de agonistas y antagonistas, los cuales actúan sobre canales iónicos, transportadores y GPCRs, entre los que se encuentra la AVP y los péptidos relacionados que encontramos en animales [104]. El conocimiento de estos productos y de su historia evolutiva puede enriquecer las interpretaciones fisiológicas y la comprensión de los mecanismos de acción de los péptidos, representando una estrategia para la búsqueda de nuevos compuestos líderes para el diseño de nuevas drogas [105].

Aproximación racional como herramienta para el diseño de drogas

Además de la aproximación evolutiva antes mencionada, existen otras estrategias para la búsqueda de drogas. Algunos de estos métodos están basados en el *screening* de bibliotecas de compuestos, donde la estrategia de búsqueda está basada exclusivamente en el azar. En contraste, otras aproximaciones involucran el diseño racional de drogas, donde el conocimiento del blanco no solo es a nivel molecular sino también a nivel estructural, siendo estos conocimientos elementos fundamentales para el diseño. El diseño racional de drogas basado en estudios de estructura actividad (SAR), constituye una indispensable herramienta para el desarrollo de nuevas medicinas, contribuyendo a aumentar las posibilidades de éxito y disminuyendo los costos. Los estudios de SAR relacionan características de la estructura química con las propiedades, efectos y/o la actividad biológica. En la industria química y farmacéutica, los estudios de SAR han sido usados desde hace tiempo para el diseño químico de drogas seguras con propiedades deseables [106].

Ala scanning

El ala-scanning (Ala-Scan) es una técnica rápida utilizada ampliamente para el diseño racional de drogas a partir del estudio de las SAR de muchas moléculas con potencial terapéutico [107]. Esta técnica consiste en la sustitución secuencial de cada aminoácido del péptido líder por un residuo alanina (Ala), con el objetivo de identificar los aminoácidos que son fundamentales para la estabilidad y la actividad biológica de la molécula [108], así como también para diseñar análogos selectivos y/o con actividad mejorada [109]. La alanina se usa en esta técnica ya que se considera el aminoácido más neutral, tiene una cadena lateral simple con un grupo funcional metílico químicamente inerte, no es altamente hidrófobo y no tiene carga, además imita la estructura secundaria de muchos otros aminoácidos. Estas características permiten determinar la SAR del péptido de interés.

Ala-Scan se ha utilizado para investigar las SAR de varias moléculas terapéuticas potenciales y se ha utilizado para diseñar análogos con actividad mejorada y/o con selectividad [108,109,110,111].

Aproximaciones evolutiva y racional basadas en el neuropéptido AVP y su análogo dDAVP

La AVP es una hormona nonapeptídica multifuncional altamente conservada que se encuentra relacionada evolutiva y estructuralmente con la hormona oxitocina (OT). Estos dos péptidos se habrían originado de una hormona ancestral llamada vasotocina (VT) la cual a través de la evolución se diversificó en diferentes péptidos tipo VT/AVP/OT, con un alto

grado de conservación interespecífica en todo el reino Metazoa. Los péptidos derivan de precursores más largos y presentan múltiples actividades fisiológicas [112].

Este antiguo sistema hormonal VT/AVP/OT ha sido conservado evolutivamente, encontrando péptidos relacionados a AVP en un amplio rango de especies y, como se mencionó recientemente, se cree que todos éstos péptidos tipo AVP han evolucionado desde el péptido ancestral VT hace 600-700 millones de años, originándose antes de la división de Protostomados y Deuterostomados [113]. Todos los miembros de la familia peptídica VT/OT/AVP presentes en las diferentes especies de vertebrados e invertebrados muestran un alta similaridad en la secuencia con 6 residuos que conforman un anillo unido mediante un puente disulfuro entre los dos residuos cisteína (Cys) de las posiciones 1 y 6 conservadas, y una cola flexible C-terminal con tres residuos (del 7 al 9), con una prolina (Pro) en la posición 7 altamente conservada y una glicina (Gly) en posición 9 (CXXXXCPXG*). Las posiciones 2 y 3 son residuos aromáticos o hidrofóbicos y las posiciones 4 y 5 son residuos polares o cargados. La variabilidad observada se da en las posiciones 2-5 y en la posición 8 [114]. Todos los péptidos tipo VT/AVP de vertebrados tienen una tirosina (Tyr) en posición 2, una Pro en posición 7 y un residuo básico en posición 8 (Arginina (Arg) o Lisina (Lys)), indicando que estas podrían ser posiciones evolutivamente conservadas. De este modo podemos concluir que hay solo cinco o seis sitios capaces de tolerar cambios para la interacción receptor-ligando.

Los ligandos peptídicos, como AVP, y sus receptores datan de hace más de 600 millones de años de evolución y comprenden uno de los más viejos y mejor estudiados sistemas de señalización peptídicos de GPCR [115,116]. Este sistema de señalización constituye un modelo interesante en el campo de la endocrinología y de la neurofisiología comparada. Los GPCRs constituyen la familia más grande de proteínas conocidas de receptores de superficie celular que regula un amplio espectro de procesos celulares por transducción de señales. Los receptores se han adaptado a una gran variedad de ligandos; comprendiendo un rango de agonistas endógenos que comprende lípidos, azúcares, compuestos orgánicos volátiles, aminoácidos, ácidos orgánicos y péptidos, entre otros [117].

Además de la importancia que despierta la AVP y sus receptores a nivel evolutivo y funcional, también el estudio de éste péptido, tal como se mencionó en la introducción general, ha despertado mucho interés para el desarrollo de potenciales compuestos terapéuticos con diversas aplicaciones médicas. En este sentido la AVP ha sido extensamente estudiada y modificada racionalmente dando como resultado nuevos derivados con actividad agonista o antagonista. De estos estudios surgió la dDAVP, a la cual se ha hecho extensa referencia en la introducción general.

Por lo tanto la hipótesis a contrastar en este capítulo es:

-Si, el conocimiento evolutivo de la molécula AVP en el reino animal y el diseño racional a partir de la molécula de dDAVP proporcionan una fuente para el desarrollo de nuevos análogos con propiedades antitumorales en TNE; entonces éstos conocimientos permitirían el diseño de análogos mejorados.

Para lo cual previamente debemos contrastar en parte ésta otra hipótesis:

-Si V2r, uno de los subtipos de receptores de la superfamilia de GPCR de la hormona neuropeptídica altamente conservada AVP, está asociado a efectos antitumorales, **y está presente en TNE y tumores con transdiferenciación NE**, entonces los análogos de AVP agonistas de V2r **tendrían un efecto antitumoral** en dichos tumores.

Objetivos específicos Capítulo I

- Identificar el blanco molecular (V2r) en las líneas NCI-H82 (SCLC), NCI-H125 (NSCLC, carcinoma escamoso de pulmón) y PC-3 (adenocarcinoma de próstata).
- Determinar la expresión de marcadores de diferenciación NE tales como enolasa neuronal específica (NSE) y Cromogranina A (CgA) en las líneas tumorales humanas NCI-H82, NCI- H125 y PC-3.
- Determinar el efecto de AVP y dDAVP sobre la proliferación celular en las líneas que expresan V2r.
- Explorar péptidos bioactivos tipo AVP desde fuentes naturales focalizando en los procesos evolutivos de los metazoos y su actividad fisiológica.
- Realizar estudios de SAR para identificar las posiciones aminoacídicas claves en el compuesto parental dDAVP usando la probada capacidad citostática como criterio en una línea de SCLC.
- Buscar análogos con actividad antitumoral aumentada en SCLC altamente agresivo generados a partir de las dos metodologías mencionadas en los objetivos específicos anteriores.

Metodología Capítulo I

Compuestos peptídicos

Diseño de drogas basado en una perspectiva evolutiva.

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica de la evolución molecular del sistema VT/AVP/OT para arrojar luz al mecanismo de receptor-ligando en animales y diseñar un nuevo análogo tomando como criterio la actividad biológica y fisiológica relacionada con eventos biológicos claves que ocurren durante el desarrollo del cáncer. El análogo fue desarrollado combinando el péptido natural elegido con los cambios en posición 1 y 8 presentes en el péptido de primera generación dDAVP. El nuevo análogo diseñado fue: 1-desamino-2-leucina-3-isoleucina-4-treonina-8-D-AVP (dDInotocina; dDINT; MpaLITNCPrG*) y fue obtenido de *American Peptide Company Inc.* (California, USA, un miembro del grupo BACHEM). Certificado de análisis: 958.1amu; pureza: 98.4%.

Diseño de drogas basado en una aproximación racional usando la técnica de Ala-Scanning.

Productos químicos: La resina de Rink-amida, los aminoácidos Fmoc, los reactivos de acoplamiento y los disolventes para la síntesis de péptidos fueron obtenidos de Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Alemania). Los disolventes para la purificación de péptidos fueron de grado HPLC comprados en *Tedia Company Inc.* (Fairfield, OH).

Péptidos: Los péptidos Ala sustituidos fueron sintetizados en fase sólida, tal como fue detallado en la metodología general. La ciclación de los péptidos se realizó en fase sólida, aprovechando el fenómeno de pseudo-dilución que puede favorecer la formación de puente intramolecular. En resumen, (Trt) -Mpa y (Trt) -Cys se desprotegieron en una solución de ácido trifluoroacético (TFA): diclorometano (DCM): disolución de triisopropilsilano (TIS) (2: 95: 3) durante 1 hora a temperatura ambiente, después de la oxidación con 10 eq I₂ en N, N dimetilformamida durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se desprotegieron los péptidos y se escindieron de la resina usando una solución de TFA: H₂O: TIS (95: 2,5: 2,5) durante 3 horas a temperatura ambiente.

Las posiciones 2, 3, 4, 5, 7, 8 y 9 fueron ala-sustituidas en dDAVP. Las posiciones 1 y 6, involucradas en la formación del puente disulfuro, no fueron ala sustituidas con el fin de mantener la característica cíclica de los análogos. Los péptidos fueron purificados, cuantificados e identificados como se explicó en la metodología general.

El péptido resultante de este análisis de SAR fue: 1-desamino-4-valina-5-glutamina-8-D-AVP (conocido como [V⁴Q⁵] dDAVP; MpaYFVQCPrG*) y fue comprado en *American Peptide Company Inc.* (California, USA, un miembro del grupo BACHEM). Certificado de análisis: 1054.2 amu; pureza: 98.4%.

Expresión de V2r y de marcadores de diferenciación NE.

Inmunofluorescencia (IF) para determinar expresión de V2r

Con el objetivo de detectar la presencia del V2r en células tumorales, las células NCI-H125, MCF-7 y PC-3 fueron sembradas en pocillos sobre los CV ubicados en una placa de 12 pocillos en medio suplementado con 10% de SFB y se esperó que las células lleguen a la confluencia adecuada. Las células NCI-H82 fueron sembradas en placas de 12 pocillos y una vez que llegaron a un número adecuado fue extraído el medio con células y centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos a fin de obtener el *pellet* celular para realizar todos los pasos del procedimiento.

Los CV o *pellets* fueron tratados tal como se explicó en la metodología general. La línea celular de carcinoma mamario MCF-7 fue usada como control positivo de la expresión del V2r.

RT-PCR para determinar expresión del V2r

El ARN total de las células NCI-H82 o NCI-H125 fue obtenido realizando una extracción con *Trizol* (Invitrogen). La muestra fue cuantificada y luego se realizó la RT como se detalló en la metodología general. Una vez obtenido el ADNc para la PCR se utilizaron los *primers* diseñados previamente [102]. Los *primers* utilizados amplificaron una secuencia de aproximadamente 500 pb. El gen de β -Actina se utilizó como control de carga.

qRT-PCR para determinar expresión del V2r y de marcadores NE

Se evaluó la expresión del V2r y los marcadores de diferenciación NE, NSE y CgA, en las líneas NCI-H82, PC-3 y NCI-H125 usando qRT-PCR como fue detallado en la metodología general. La línea celular de carcinoma mamario MCF-7 fue usada como control positivo de la expresión del V2r. Cada muestra se analizó por triplicado y los valores de número de ciclo promedio para llegar al umbral (Ct) se usaron para el análisis posterior. Los valores de Ct se normalizaron para los niveles de expresión de GAPDH y se normalizaron al control (MCF-7 para V2r y NCI-H125 para marcadores NE). Los valores de cuantificación relativa (RQ) se calcularon como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Los *primers* utilizados para la RT-PCR y para la qRT-PCR se encuentran en la tabla C1-1.

Tabla C1-I. *Primers* utilizados en éste capítulo.

| Gen | Secuencia <i>Primers</i> | Referencia |
|--------------------|---|------------------------------------|
| V2r qRT-PCR | Fwd: 5-CTGGCCAAGGACACTTCATC-3 Rv: 5-GAAGGCAGCTGAGCTTC-3 | Diseñados en esta tesis |
| V2r RT-PCR | Fwd: 5'-GTG GCC AAG ACT GTG AGG AT-3 Rv: 5'-ATA CAG CTG GGG ATG TGG AG-3'. | Pastrian <i>et al</i> , 2014 [102] |
| NSE | Fwd: 5-GAGACAAACAGCGTTACTTAG-3 Rv: 5-AGCTGCCCCCTGCCTTAC-3 | Tai <i>et al</i> , 2011 [65] |
| CgA | Fwd: 5-GCGGTGGAAGAGCCATCAT-3 Rv: 5-TCTGTGGCTTCACCACTTTTCTC-3 | |
| GAPDH | Fwd: 5-CATGGGTGTGAACCATGAGA-3 Rv: 5-CAGTGATGGCATGGACTGTG-3 | Ring <i>et al</i> , 2005 [118] |

Western Blot para determinar expresión del marcador NE, NSE

Monocapas de células o suspensiones celulares fueron recogidas en PBS y separadas por centrifugación. Los *pellets* celulares se homogeneizaron y fueron lisados. Las proteínas presentes fueron separadas por electroforesis y transferidas a una membrana para electrotransferencia. La membrana fue bloqueada en 5% caseína en PBS durante 1 hora e incubada con una dilución 1:500 del anticuerpo primario de conejo anti-NSE (Abcam) *overnight*. Luego de lavados con PBS, se adicionó un anticuerpo secundario anti conejo IgG biotinilado en una dilución 0,05 µg/ml (Invitrogen). Las bandas proteicas se visualizaron usando un *kit* comercial de inmunoperoxidasa.

Ensayo de proliferación celular

Se evaluó el efecto sobre la proliferación celular de AVP ([Arg⁸]-Vasopressin acetate salt; Sigma-Aldrich), dDAVP, los análogos ala sustituidos y los nuevos análogos sobre el crecimiento rápido de células NCI-H82 (5x10³ células por pocillo) usando el ensayo de MTS (Promega) tal como se describe en la metodología general. Las concentraciones usadas fueron 100 y 1000 nM por tener un efecto antiproliferativo reportado [91, 92, 93, 117] o PBS como vehículo. Se leyó la absorbancia a 490 nm y se relativizó al control tomando la absorbancia promedio de esto grupo como 100%.

Resultados Capítulo I

Identificación del blanco molecular V2r, en las líneas NCI-H82, PC-3 y NCI-H125.

Los resultados muestran por medio de inmunofluorescencia que las líneas NCI-H82 y PC-3 expresan el V2r y que la línea NCI-H125 es negativa para dicho receptor (Fig. C1.1A), resultado confirmado para NCI-H82 y NCI-H125 por RT-PCR (Fig. C1.1B). Por otro lado la qRT-PCR indica que la línea NCI-H82, una línea de SCLC con rasgos NE expresa altos niveles de V2r. La línea MCF-7, una conocida línea de cáncer de mama que expresa todos los receptores de AVP, incluyendo el V2r, fue usada como control positivo. Como se ve en la figura C1.1C, NCI-H82 expresa 10 veces más ARNm para el V2r en comparación a MCF7.

Figura C1.1

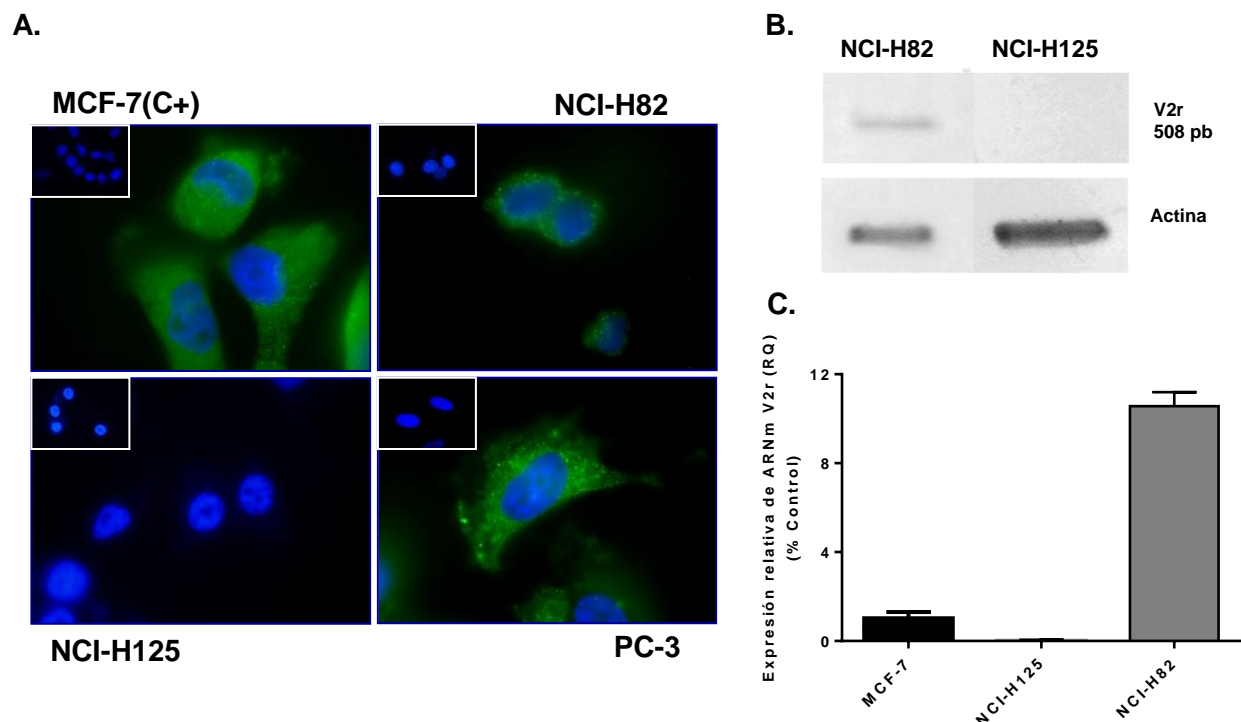


Figura C1.1 A. Identificación del Blanco Molecular. A. Inmunofluorescencia: se sembraron las células tumorales en placas de 12 pocillos sobre cubreobjetos en medio de cultivo con 10% de SFB, luego de 24 horas se fijaron con paraformaldehído 4% y se incubaron con un anticuerpo primario específico para V2r (Santa Cruz); se reveló empleando un anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína. Las fotos fueron tomadas con el software Nikon NIS Elements. Aumento X1000. **B. RT-PCR:** se extrajo el ARN de *pellets* de células tumorales con *Trizol* y se obtuvo el ADNc con retrotranscriptasa SuperScript III. Las bandas se visualizaron en geles de agarosa 2%, teñidos con BrEt. **C. qRT-PCR.** El ARN de 1×10^6 células fue extraído con *Trizol* y cuantificado. La RT se llevó a cabo con SuperScript III first-Strand. Se realizó una PCR en tiempo real con *SYBR Green PCR Master Mix*. Las condiciones de ciclado fueron: 48°C por 30 minutos, 95°C por 10 minutes, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos seguida por 60 °C por 60 segundos. Cada muestra fue analizada por triplicado y los valores de Ct se usaron para el análisis. Los valores de Ct se normalizaron a los niveles de expresión de GAPDH y se expresaron en relación a la muestra control (MCF-7). Los valores de RQ (cuantificación relativa) se calcularon como: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Evaluación de la expresión de los marcadores de diferenciación NE, NSE y CgA.

CgA y NSE son los marcadores NE más comúnmente empleados para determinar las características NE, tanto a nivel tisular como en la circulación general [4,5]. Los mismos fueron evaluados por qRT-PCR. Como muestra la figura C1.2B tanto la línea NCI-H82 como PC-3 expresan niveles significativos de dichos marcadores, para el marcador NSE este resultado fue confirmado, además, por *Western Blot* para ambas líneas (Fig. C1.2B).

Figura C1.2

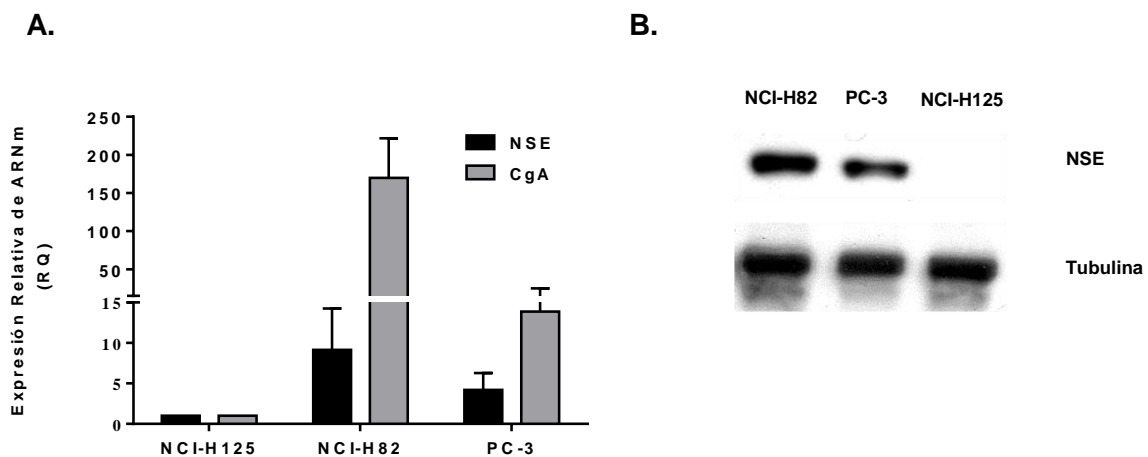


Figura C1.2. Expresión de los marcadores NE, Enolasa neuronal específica (NSE) y Cromogranina A (CgA) en líneas tumorales de pulmón y próstata. **A. qRT-PCR:** El ARN total de 1×10^6 células fue extraído con *Trizol* y luego fue cuantificado. La RT se llevó a cabo con SuperScript III first-Strand. Se realizó una PCR en tiempo real con *SYBR Green PCR Master Mix*. Las condiciones de ciclado fueron las descritas en la figura C1.1C. Cada muestra fue analizada por triplicado y los valores de Ct se usaron para el análisis. Los valores de Ct se normalizaron a los niveles de expresión de GAPDH y se expresaron en relación a la muestra control (NCI-H125). Los valores de RQ se calcularon como: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los resultados se expresan como media \pm SEM. **B. Western Blot:** Monocapas de células NCI-H125 y PC-3 o suspensiones celulares de NCI-H82 fueron recogidas en PBS y separadas por centrifugación. Los *pellets* celulares fueron lisados. Las proteínas presentes se separaron por electroforesis y se transfirieron a una membrana. La membrana se bloqueó en 5% caseína en PBS y se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-NSE (ABCAM) overnight. Luego se adicionó un anticuerpo secundario biotinilado. Las bandas proteicas se visualizaron usando un *kit* comercial de inmunoperoxidasa.

Evaluación del efecto sobre la proliferación celular del neuropéptido no selectivo AVP y el análogo selectivo para el V2r dDAVP sobre células NCI-H82.

La línea NCI-H82 (variante de SCLC) es una línea tumoral humana de rápida expansión y alta tasa de crecimiento, debido a esto es considerada un modelo celular adecuado para el estudio de nuevos compuestos terapéuticos. Muchas líneas celulares de

SCLC, como NCI-H82, son células derivadas de sitios metastásicos y en general representan enfermedad resistente. Además, dicha línea expresa altos niveles del V2r, tal como fue mostrado en la figura C1.1C, siendo por estas razones la línea elegida para realizar la evaluación inicial de AVP y sus análogos [118]. Para evaluar el impacto de la intervención agonista de los diferentes receptores de AVP sobre las células tumorales testamos el efecto del péptido natural AVP y de su análogo sintético dDAVP en fase *log* de crecimiento sobre células de cáncer de pulmón. Luego de 72 horas de exposición, AVP, que tiene la capacidad de unirse a todos los subtipos de receptores, incrementó significativamente la proliferación en un 14% a una concentración de 100 nM. Los efectos mitogénicos del ligando natural AVP fueron mayores a bajas (100 nM) que a altas concentraciones (1000 nM). De modo muy interesante, el agonista selectivo para el V2r, dDAVP, redujo significativamente la proliferación celular en un 23% a una concentración de 1000 nM. (Fig. C1.3).

Figura C1.3

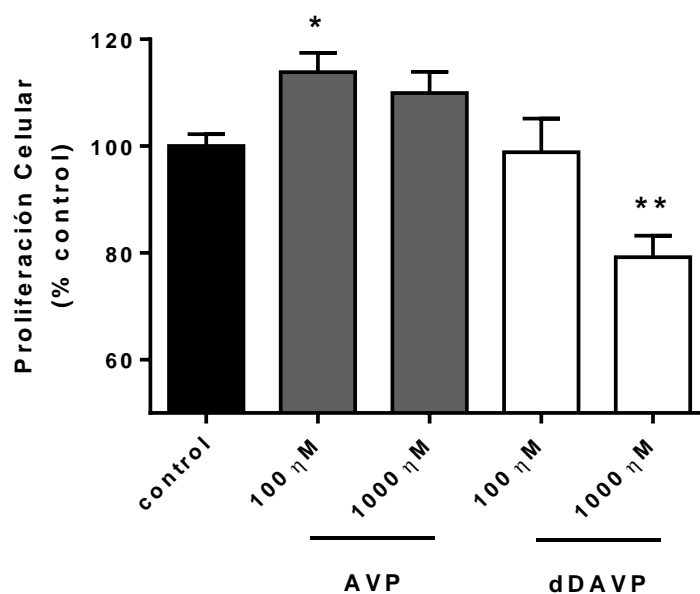


Figura C1.3 Evaluación del efecto sobre la proliferación celular en la línea NCI-H82 de AVP y dDAVP.

El efecto de AVP y dDAVP (100 y 1000 nM) en fase *log* de crecimiento fue medido usando el ensayo de MTS. La densidad óptica de las células control fue considerada como 100% de viabilidad. Los resultados están expresados como media \pm SEM. ANOVA seguido de la prueba de Tukey. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ (correspondiente a cada concentración vs. control).

Diseño de drogas basado en una perspectiva evolutiva.

Como ya mencionamos, las hormonas peptídicas tipo VT se encuentran en todo el reino animal, desde invertebrados, como moluscos, anélidos, artrópodos y nematodos, hasta en vertebrados no mamíferos y en mamíferos [120].

Los agnatos constituyen el grupo más primitivo de vertebrados (Superclase Agnatha) en los cuales encontramos péptidos tipo VT/AVP, la arginina vasotocina neurohipofisiaria (AVT) es un neuropéptido ancestral homólogo a AVP/OT de vertebrados [121, 122] que aparece en este grupo con funciones que no están vinculadas a la osmorregulación. En los Chondrichthyes, el gen fue duplicado apareciendo otro péptido vinculado a la reproducción que presenta un cambio en posición 8 con respecto a la AVT (Leucina 8 en lugar de Arginina 8). Así los péptidos neurohipofisiarios se dividieron en dos funciones principales, por un lado el grupo de la OT vinculado a la reproducción y por otro el grupo de la AVT vinculado al balance de electrolitos. Dentro de los Actinopterygii encontramos la AVT y la Isotocina (IT), recién en este grupo la AVT adquiere funciones relacionadas al balance hidrosalino. En el primer grupo de tetrápodos y anfibios aparece la Mesotocina (MT) evolucionando a partir de la IT, cumpliendo funciones reproductivas. En reptiles y aves encontramos el mismo estado que en anfibios. En los Prototheria (primer grupo de mamíferos), aparece la Arg-vasopresina (AVP) mientras que la MT evoluciona hacia la OT. Los mamíferos euterios (entre ellos el hombre) tiene la misma condición que los prototerios con una copia simple de AVP y una de OT [123, 124].

En invertebrados, el sistema de señalización VT/AVP/OT ha sido aislado de varias especies. En anélidos y nematodos han sido identificados péptidos relacionados a OT, la anetocina y lys-conopresina G en anélidos y la nematocina en nematodos. La anetocina fue aislada de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* y participa en procesos vinculados a la reproducción y motilidad muscular y la Lys-conopresina G fue hallada en sanguijuelas participando en la reproducción y osmorregulación [125, 126]. La nematocina, ha sido identificada en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Los análisis genéticos denotan que este péptido actúa como un neuromodulador de los circuitos neuronales involucrados en el comportamiento reproductivo y el aprendizaje asociativo [127].

En moluscos cefalópodos está presente la cefalotocina en *Octopus vulgaris* y la sepiatocina en *Sepia sp.* Estos dos péptidos son homólogos y modulan la actividad contráctil de varios músculos como los del pene, oviducto y vena cava sugiriendo que estarían involucrados en la reproducción y circulación sanguínea [128]. Homólogos de AVP también han sido aislados del veneno de caracoles. La caracterización bioquímica de estos péptidos mostró que son idénticos a la Lys-conopresina G. Podría ser un ejemplo de conversión evolutiva de péptidos endógenos que se especializaron en otros usos como la defensa. Los

dos tipos de conopresina encontrados presentan lisina o arginina en posición 8, una posición que está fuertemente relacionada al efecto presor en vertebrados. Los péptidos fueron aislados de los moluscos gasterópodos *Conus geographus* y *Conus striatus*, ambos poseen un residuo hidrofóbico neutral en posición 2: Fenilalanina (Phe) en la conopresina G (*C. geographus*) e Isoleucina (Ile) en la conopressin S (*C. striatus*) [129]. Presentan un residuo Arg en posición 4 ambos péptidos, esto les otorga una carga neta de +3, superior a la que encontramos en AVP (+2), esta carga solo es encontrada en otros dos péptidos, la cefalotocina y la anetocina.

Diferentes tipos de Inotocina (INT) han sido encontrados en insectos. Gruber *et al.* describieron la secuencia de la INT y sus posibles receptores en el genoma de la especie de hormiga *Camponotus floridanus* [130], evidenciando variaciones aminoacídicas en las posiciones 2 y 4 con respecto a la INT encontrada en otros insectos como langostas y otras especies de hormigas. La secuencia del receptor en hormigas también mostró similitud con la de otros insectos, tales como los escarabajos [131, 132], sugiriendo que ellos podrían tener una función similar. Este sistema neuropeptídico, dentro de los órdenes basales de Holometábolos (presentan metamorfosis completa), está restringido al orden Coleoptera y otros grupos basales. De este modo podemos ver que el sistema peptídico INT está solo en los holometábolos basales, mientras que otros ordenes lo han abandonado. En el escarabajo, *Tribolium castaneum*, el receptor de INT se expresa principalmente en la cabeza y hay baja expresión en los túbulos de *Malpigi* o intestino (órganos vinculados a la excreción), sugiriendo que la INT no estimula la reabsorción de agua como si lo hace en mamíferos la AVP [133]. La elevada expresión de los receptores de INT en los estados larvales tempranos, en los huevos y en el estado de pupa, podrían indicar que el péptido cumple alguna función relacionada al desarrollo del animal [134]. En *Tribolium*, Akins *et al.* proponen que INT estimula (directa o indirectamente) la secreción de factores diuréticos, recordemos que los insectos tienen excreción por secreción y no por reabsorción como ocurre en los mamíferos, estos factores actuarían sobre los túbulos de *Malpigi* a nivel de la diuresis [135].

De la información mencionada anteriormente (resumida en la Tabla C1-II) elegimos a la INT como un buen candidato para ser utilizado como péptido base para el desarrollo de un nuevo compuesto antitumoral, debido a que la secuencia primaria de la INT de insectos tales como *Tribolium* posee una actividad fisiológica natural vinculada a la diferenciación celular que ocurre en gran medida durante la metamorfosis, ya que los receptores del péptido fueron encontrados en altísima expresión en los primeros estadios larvales y en el estadio de pupa. Dado que la diferenciación y la proliferación celular son dos procesos claves en el desarrollo y progreso del cáncer es que fue elegido este péptido como base para el diseño del nuevo análogo. Así, el péptido elegido fue modificado teniendo en cuenta

los cambios introducidos en AVP que dieron origen al péptido de primera generación dDAVP (posiciones 1 y 8), a fin de otorgarle mayor estabilidad y evitar la interacción con V1r, y así un nuevo análogo fue sintetizado: 1-desamino-2-leucina-3-isoleucina-4-treonina-8-D-AVP (dDIntocina; dDINT; MpaLITNCPrg*) (ver Fig. C1.5). La actividad biológica de dDINT fue evaluada en la línea celular de SCLC NCI-H82 que expresa altos niveles de V2r, tal como se demostró en este capítulo.

Tabla C1.II- Variantes moleculares de neuropéptidos tipo VT/AVP/OT en Metazoa.

| Neuropeptido (tipo AVP/OT) | Secuencia | Phylum/Clase/Especie | Función | Referencias |
|--|--------------|--|---|--|
| Vasotocina ancestral de Metazoos (VT) | CFVRNCPPG* | Precursor | Precursor | Douzery <i>et al.</i> , 2004; Gruber, 2014 |
| Annetocina | CFVRNCPTG* | Annelida/ Oligochaeta (Subclase) <i>Eisenia foetida</i> | Relacionado a OT: reproducción y motilidad del intestino | Oumi <i>et al.</i> , 1994 |
| Lys-Conopressina G | CFIRNCPKG* | Annelida/Hirudinea (subclase) <i>Whitmania pigra</i> , <i>Erpobdella octoculata</i> | Reproducción y osmorregulación | Salzt <i>et al.</i> 1993 |
| Nematocina | CFLNSCPYRRY* | Nematoda/Secernentea <i>Caenorhabditis elegans</i> | Reproducción y aprendizaje | Beets <i>et al.</i> , 2013 |
| Cephalotocina | CYFRNCPIG* | Mollusca/Cephalopoda <i>Octopus vulgaris</i> | Actividad contráctil (pene, oviducto, músculos de la vena cava); Reproduction y circulación sanguine | Henry <i>et al.</i> , 2013 |
| Sepiotocina | CFWTTCPIG* | Mollusca/Cephalopoda <i>Sepia officinalis</i> | | |
| Conopressina G | CFIRNCPKG* | Mollusca/ Gastropoda <i>Conus geographus</i> | Lys o Arg en posición 8; defensa | Nielsen <i>et al.</i> , 1994 |
| Conopressina S | CIIRNCPKG* | Mollusca/ Gastropoda <i>Conus striatus</i> | | |

**Tabla C1.II- Variantes moleculares de neuropéptidos tipo VT/AVP/OT en Metazoa.
(Continuación)**

| | | | | |
|---|------------|--|---|--|
| Inotocina | CLIVNCPRG* | Arthropoda/Insecta/Hymenoptera (Orden)/ Formicidae (Familia) <i>Camponotus floridanus</i> , | Estimulación de carbo hidratos y movilización de lípidos; ecdisis | Gruber and Muttenthaler, 2012 |
| | CLITNCPRG* | Arthropoda/Insecta/ <i>Coleoptera</i> <i>Tribolium castaneum</i> <i>Orthoptera</i> <i>Locusta migratoria</i> <i>Hymenoptera</i> <i>Atta cephalotes</i> , <i>Harpegnath saltator</i> , <i>Nasonia vitripennis</i> | Desarrollo y diferenciación celular; ecdysis; diuresis indirecta | Proux <i>et al.</i> 1987; Dulcis <i>et al.</i> , 2005; Kim <i>et al.</i> , 2006; Zitnan <i>et al.</i> , 2007; Stafflinger <i>et al.</i> , 2008; Li <i>et al.</i> , 2008; Aikins <i>et al.</i> , 2008; Hauser <i>et al.</i> 2010; Dircksen <i>et al.</i> 2011; Gruber and Muttenthaler, 2012. |
| Vasotocina ancestral de Vertebrados (AVT) | CYIQNCPRG* | Chordata/Vertebrata (subphylum)/Agnatha | Neuropéptido ancestral homólogo a OT y AVP en vertebrados | Mayasich and Clarke, 2016; Koehbach <i>et al.</i> , 2013 |
| | | Chordata/Vertebrata (subphylum)/ Chondrichthyes | Duplicación del gen AVT (AVT+OT) | Kiss and Mikkelsen, 2005 |
| | | Chordata/Vertebrata (subphylum)/ Actinopterygii | Comienza a aparecer como función la Homeostasis | Kiss and Mikkelsen, 2005 |
| | | Chordata/Vertebrata (subphylum)/ Reptilia/Aves | (Balance electrolítico) | Kiss and Mikkelsen, 2005 |

**Tabla C1.II- Variantes moleculares de neuropéptidos tipo VT/AVP/OT en Metazoa.
(Continuación)**

| | | | | |
|-------------------------------|------------|--|---|-----------------------------|
| Isotocina (IT) | CYISNCPIG* | Chordata/Vertebrata (subphylum)/ Actinopterygii | Reproducción | Kiss and Mikkelsen, 2005 |
| Oxitocina (OT) | CYIQNCPLG* | Chordata/Vertebrata (subphylum)/Mammalia Eutheria | Reproducción (Duplica ción del gen AVT, cambio d Arg8 por Leu8) | Kiss and Mikkelsen, 2005 |
| Mesotocina (MT) | CYIQNCPIG* | Chordata/Vertebrata (subphylum)/ Reptiles y Aves | Reproducción | Kiss and Mikkelsen, 2005 |
| Arginina vasopresina (AVP) | CYFQNCPRG* | Chordata/Vertebrata (subphylum)/Mammalia Prototheria and Eutheria | Homeostasis y balance hidrosalino | Kiss and Mikkelsen, 2005 |

*Amidación C-terminal.

Diseño de drogas basado en una aproximación racional mediante la técnica de *ala-scanning*.

Los péptidos ala sustituidos fueron sintetizados como se explicó previamente y luego fueron estudiados utilizando la línea celular agresiva NCI-H82 y evaluando la proliferación celular como evento clave en las SAR de dDAVP. La Tabla CI.2 resume los rasgos más importantes de la síntesis de los análogos usados para estudiar el efecto antiproliferativo con SAR de dDAVP. La actividad citostática fue reducida un 100% cuando los aminoácidos 2 y 3 fueron ala sustituidos; y en un 50% cuando el aminoácido 4 fue reemplazado (Fig. C1.4B izquierda). El efecto antiproliferativo fue conservado cuando los aminoácidos en la posiciones 8 y 9 fueron sustituidos (Fig. CI.4B derecha), y parcialmente reducida cuando la sustitución ocurrió en las posiciones 5 y 7 (Fig. CI.4B).

Basándonos en los resultados mencionados, un nuevo análogo fue sintetizado, reemplazando la glutamina (gln) en posición 4 por una valina (val) y la asparagina (asn) de posición 5 por una gln. Los aminoácidos de las posiciones 4 y 5 pertenecen al *loop* conformacional de la molécula, el cual tiene un rol clave en la interacción ligando-receptor para su actividad antitumoral. Un aumento de hidrofobicidad en la posición 4 y una sustitución conservativa en posición 5 podría resultar en un incremento de la afinidad por el V2r el cual posee una cavidad en la cara extracelular del receptor que contiene un lado hidrofóbico [115].

El péptido resultante fue 1-desamino-4-valina-5-glutamina-8-D-arginina vasopresina ([V⁴Q⁵] dDAVP; MpaYFVQCPrG*) (ver Fig. CI.5) y fue evaluado, al igual que dINT, como agente antiproliferativo en las células de SCLC, NCI-H82.

Tabla CI. II: Análogos de dDAVP Ala sustituidos. Nombre, secuencia y rasgos fisico-químicos del compuesto de primera generación dDAVP y sus Ala-análogos.

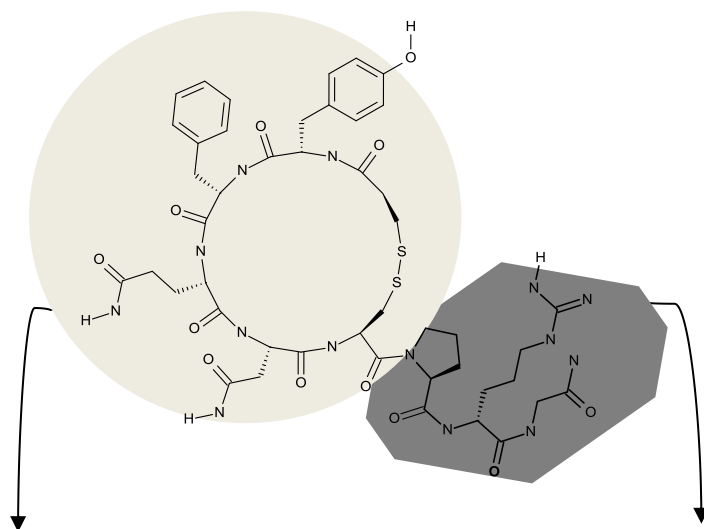
| Peptido | Secuencia ^a | RT ^b (min) | MW ^c Experimental | MW ^c Teórico |
|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------------|-------------------------|
| dDAVP | MpaYFQNCPrG* | 24.7 | 1068.45 | 1068.24 |
| [Ala ²] dDAVP | Mpa <u>A</u> FQNCPrG* | 20.3 | 976.40 | 976.14 |
| [Ala ³] dDAVP | MpaY <u>A</u> QNCPrG* | 15.5 | 992.41 | 992.14 |
| [Ala ⁴] dDAVP | MpaYF <u>A</u> NCPrG* | 26.3 | 1011.54 | 1011.18 |
| [Ala ⁵] dDAVP | MpaYFQ <u>A</u> CPrG* | 28.1 | 1025.45 | 1025.21 |
| [Ala ⁷] dDAVP | MpaYFQNC <u>A</u> rG* | 23.7 | 1042.58 | 1042.20 |
| [Ala ⁸] dDAVP | MpaYFQNCPr <u>A</u> G* | 24.9 | 983.40 | 983.13 |
| [Ala ⁹] dDAVP | MpaYFQNCPr <u>A</u> * | 25.3 | 1082.49 | 1082.26 |

Modificado de Pastrian et al, 2014 [102]

^aA: alanina (Ala); Y: tirosina (Tyr); F: fenilalanina (Phe); Q: glutamina (Gln); N: asparagina (Asn); C: cisteina (Cys); P: prolina (Pro); Mpa: ácido 3-mercaptopropionico (desamino-Cys); r: D-arginina (D-Arg). ^bRT: Tiempo de retención en RP-HPLC. ^cMW: Peso molecular (Da).

Figura C1.4

A.



B.

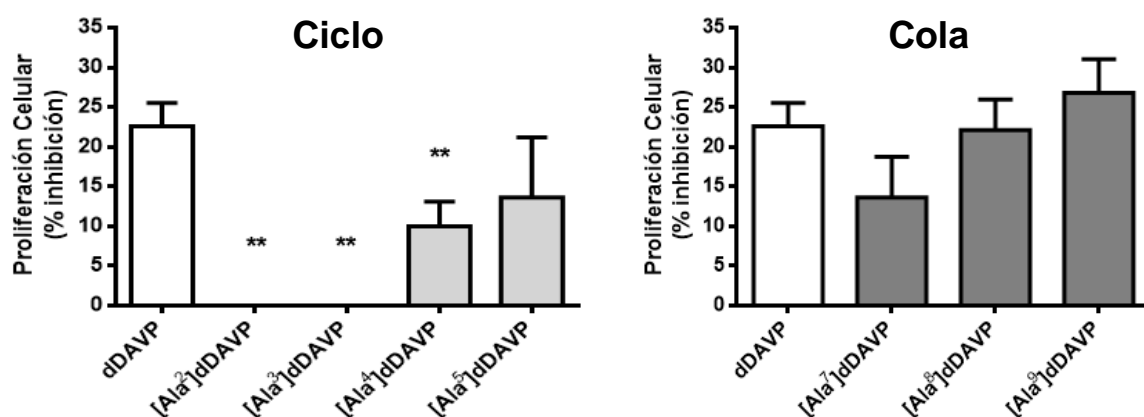
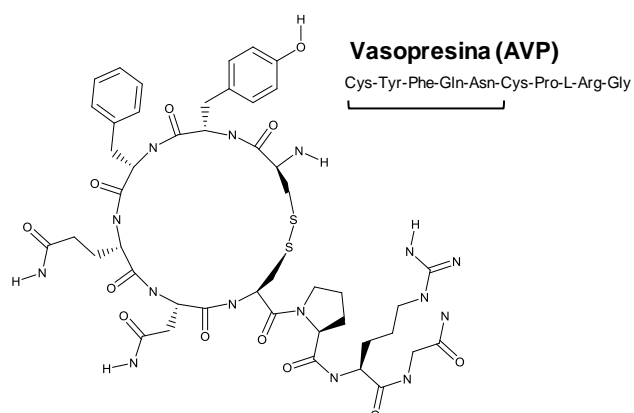


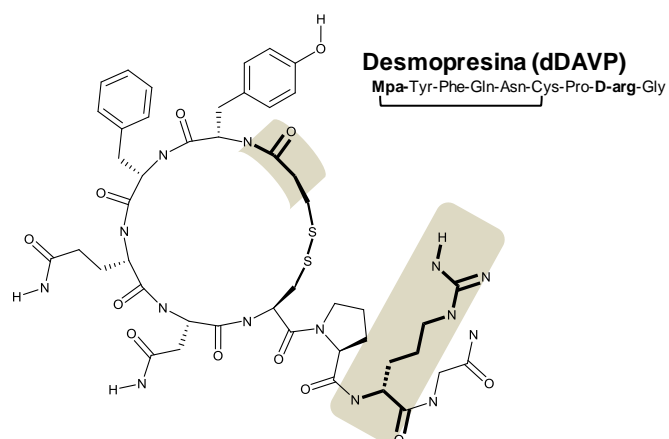
Figura CI.4. Ala-Scan de dDAVP sobre células de cáncer de pulmón agresivas NCI-H82. A. Estructura química y secuencia peptídica del compuesto nonapeptídico parental dDAVP. Las estructuras químicas fueron dibujadas con BIOVIA (<http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-draw/>). **B. Proliferación celular.** Inhibición de la proliferación luego de 72 horas de exposición a una concentración de 1000 nM del péptido sobre células NCI-H82 en fase *log* de crecimiento. Los datos están representados por la media \pm SEM., ANOVA seguido por la prueba de Dunnett, ** $p < 0.01$ análogo vs. dDAVP (Control).

Figura C1.5

Compuesto natural



Análogo de primera generación



Análogos de segunda generación

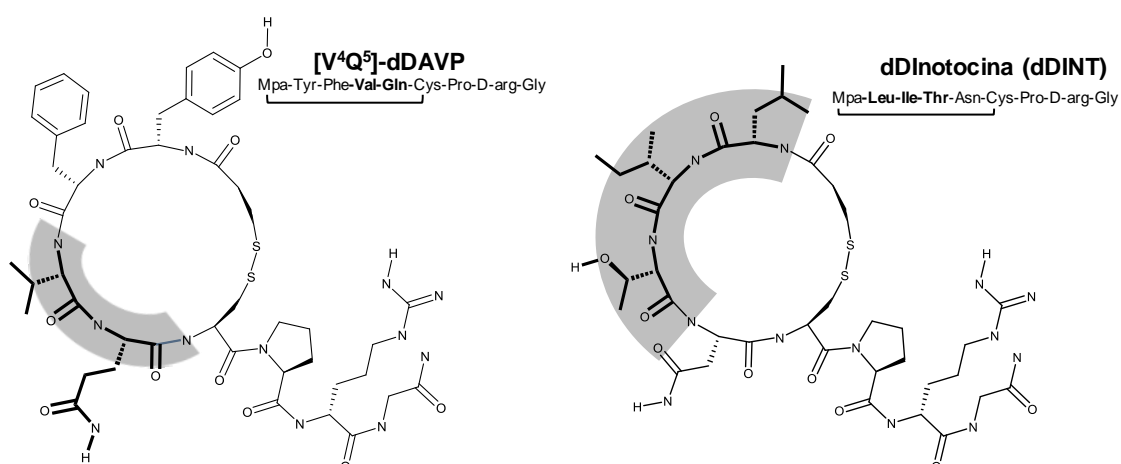


Figura C1.5. Estructura química y secuencia peptídica del compuesto natural, AVP; el compuesto de primera generación dDAVP y los compuestos de segunda generación [V⁴Q⁵]dDAVP (diseño racional) y dDINT (diseño evolutivo). Las estructuras químicas fueron dibujadas con BIOVIA (<http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-draw/>).

Evaluación del efecto antiproliferativo mediante la estimulación de V2r de los nuevos análogos, dDINT y $[V^4Q^5]$ dDAVP, sobre células NCI-H82.

Se evaluó el efecto citostático de los nuevos análogos, $[V^4Q^5]$ dDAVP y dDINT, en comparación con el péptido de primera generación dDAVP sobre células agresivas de cáncer de pulmón NCI-H82 en fase *log* de crecimiento. Luego de 72 horas de exposición, el análogo $[V^4Q^5]$ dDAVP mostró un mayor efecto citostático que dDAVP tanto a altas (1000 η M) como a bajas concentraciones (100 η M), llegando a una reducción máxima de la proliferación celular del 40% a altas concentraciones (Fig. C1.6). Sin embargo, el nuevo análogo dDINT redujo el crecimiento de las células tumorales solo en un 10% a la máxima concentración utilizada, mostrando una marcada reducción en la eficacia como agente citostático comparado con dDAVP (Fig. C1.6).

Figura C1.6

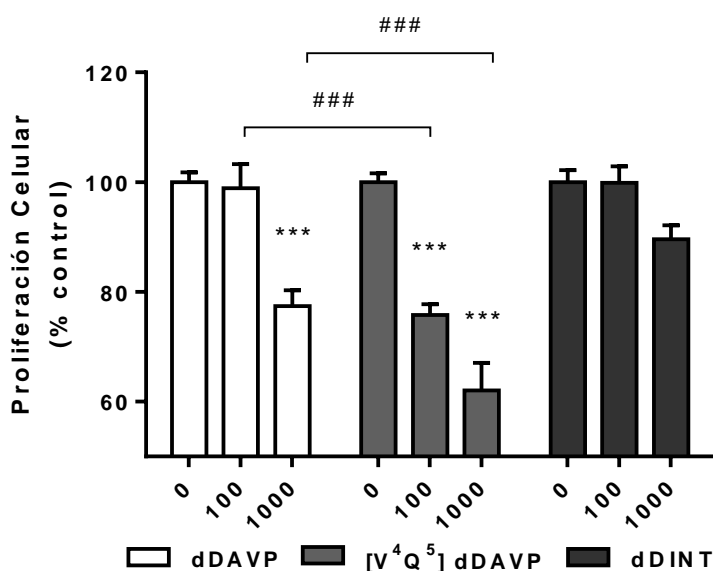


Figura C1.6 Efecto de los análogos sobre la proliferación celular en la línea NCI-H82. $[V^4Q^5]$ dDAVP y dDINT, (100 η M y 1000 η M) sobre células NCI-H82 en fase *log* de crecimiento usando el ensayo de MTS. 0=Control (PBS); 100=100 η M; 1000=1000 η M. Los resultados se expresan como media \pm IC95. ANOVA de doble vía seguido de comparación de intervalos de confianza para la media al 95%.*** $p < 0.001$ (cada análogo vs. control); ### $p < 0.001$ (misma concentración de análogo vs. dDAVP).

Resumen Resultados Capítulo I

- Se evaluó la presencia del blanco molecular V2r y la expresión de marcadores NE en las líneas estudiadas, encontrando dos líneas positivas para ambas características (NCI-H82 y PC-3).

- Se evaluó el efecto sobre la proliferación celular del péptido natural AVP y de su análogo selectivo para el V2r, dDAVP, sobre la línea NCI-H82 confirmando que AVP tiene un efecto proliferativo y dDAVP antiproliferativo.

- Se demostró la importancia del *loop* conformacional de la molécula de primera generación dDAVP para la interacción con el V2r y su actividad antiproliferativa.

- Se desarrolló el análogo [V⁴Q⁵]dDAVP que presenta un aumento de la hidrofobicidad en la posición aminoacídica 4 para una mejor interacción con el bolsillo hidrofóbico de la cara extracelular del receptor.

- Se diseñó el nuevo análogo dDINT tomando como base el péptido tipo AVP presente en insectos a partir de un análisis evolutivo de la estructura y actividad fisiológica de los péptidos tipo VT/AVP/OT del reino animal.

- [V⁴Q⁵] dDAVP presentó un efecto citostático aumentado con respecto al péptido de primera generación dDAVP sobre células tumorales de SCLC.

Discusión Capítulo I

Nuestro laboratorio viene trabajando desde hace años en la investigación y desarrollo de nuevos compuestos peptídicos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, haciendo foco principalmente en los tumores con pocas alternativas terapéuticas.

La complejidad fisiológica, la conservación evolutiva y sobre todo la relevancia terapéutica de los receptores de VT/AVP/OT hacen a esta familia de receptores uno de los GPCRs más estudiados [114]. La expresión de los diferentes receptores de AVP en varios tipos de cáncer, resaltan el rol multifacético de AVP y su interés e implicancias patofisiológicas [135]. Como ya mencionamos, el V2r está asociado con señalización antiproliferativa, a través de la activación de la adenilato ciclasa seguida por el aumento intracelular de AMPc [80]. La AVP activa todos los subtipos de receptores y tiene actividad mitogénica en algunos tipos de cáncer, indicando que el péptido natural puede actuar como un factor de crecimiento en células malignas, aumentando la transcripción, la proliferación y la sobrevivencia celular [136]. Esto es consistente con los resultados obtenidos en la línea NCI-H82, donde pudimos observar un leve aumento de la proliferación celular en las células tratadas con AVP. El agonista de V2r, dDAVP, ha demostrado disparar propiedades antitumorales en modelos preclínicos de cáncer de mama y colo-rectal. Este compuesto parece romper con la interacción cooperativa entre las células tumorales y endoteliales durante la progresión tumoral inhibiendo la angiogénesis y la colonización metastásica [81, 88, 89, 91, 137]. En éste capítulo pudimos identificar la presencia de altos niveles del V2r en la línea tumoral humana y agresiva de SCLC NCI-H82 y determinar que el compuesto presenta actividad antiproliferativa *in vitro* en dicha línea celular. Tomando toda la información previa y éstos resultados podemos decir que compuestos como dDAVP, los cuales interaccionan específicamente con receptores involucrados en la regulación de eventos biológicos claves para las células tumorales, son muy apreciados como compuestos líderes para el desarrollo de nuevos péptidos antitumorales derivados y su estudio en líneas tumorales agresivas. Una de las aproximaciones metodológicas utilizadas aquí fue llevar adelante un estudio de SAR mediante la técnica de *Ala-scan* para identificar los aminoácidos claves para la actividad antiproliferativa de dDAVP en células de cáncer de pulmón agresivo. Este análisis demostró que los aminoácidos localizados en el *loop* del péptido son fundamentales para la interacción con V2r y la actividad antiproliferativa de dDAVP.

Como fue previamente reportado todos los vertebrados tienen una Tirosina en posición 2, una de las posiciones que al ser reemplazada por alanina suprimió completamente el efecto antiproliferativo; y prolina en posición 7, una de las posiciones que causó una pérdida parcial del efecto citostático al ser sustituida [138,139]. Estos resultados son consistentes con los arrojados por el estudio de *Ala-scan* realizado sobre la línea MDA-

MB-231 de cáncer de mama [102] así como también con la evaluación de tetrapéptidos que realizó nuestro grupo, donde pudo determinarse, particularmente a altas concentraciones, una disminución del efecto antiproliferativo comparado con la molécula parental ciclada, esta disminución del efecto podría deberse a la pérdida de la interacción electrostática entre la porción extracelular de V2r y el asa presente en la molécula parental, pero ausente en los tetrapéptidos [92].

Por otro lado, éstos resultados también son consistentes con lo postulado por Czaplewski *et al.* a partir de estudios de *docking* molecular. Este grupo reportó que las posiciones hidrofóbicas N-terminales, Cys-1-Tyr-2-Phe-3, podrían apoyarse e interactuar con el piso de la cavidad hidrofóbica de V2r, mientras la Arg-8 podría ser responsable de la interacción con uno de los *loops* extracelulares del receptor [115]. Manning *et al.*, determinaron tres modificaciones estructurales principales de AVP que determinan una importante mejora en la actividad antidiurética / vasopresora [138, 139]. Dos de estas modificaciones están presentes en dDAVP y se mencionaron previamente: la desaminación de la posición 1 y la sustitución de L-arginina (Arg) por la D-arginina (arg) en la posición 8. La tercera modificación, el aumento de la lipofilicidad en la posición 4 está presente en el análogo intermedio dV⁴DAVP descrito por Manning y evaluado en ensayos de unión de receptores humanos [139], donde se determinó como un aún más potente agonista selectivo de V2r y antagonista de V1r que dDAVP.

Teniendo en cuenta todo esto sintetizamos el nuevo análogo, [V⁴Q⁵] dDAVP, y evaluamos su efecto biológico sobre células de SCLC. En este análogo se reemplazo una glutamina por valina en posición 4, por todo lo expuesto, y sustituimos una asparagina por glutamina en posición 5, constituyendo este un cambio conservativo tendiente a aumentar la estabilidad del análogo debido a la mayor susceptibilidad a la desaminación de la asparagina [140,141].

El péptido resultante, [V⁴Q⁵]dDAVP fue evaluado como agente citostático, mostrando un efecto aumentado comparado con dDAVP tanto a bajas como a altas concentraciones, llegando a un máximo de inhibición de la proliferación celular del 40% . Estos resultados son consistentes con lo reportado por Manning, donde un aumento en la hidrofobicidad en la posición 4 aumenta la afinidad de los análogos de AVP por V2r (con una afinidad 10 veces superior por V2r humano que la de la dDAVP) [72].

Además de esta estrategia, propusimos otra estrategia para el desarrollo de nuevos análogos de AVP, focalizándonos en la búsqueda de secuencias peptídicas naturales usando una aproximación evolutiva a través de todo el reino animal incluyendo los humanos.

Nuestro trabajo se focalizo en: i) el desarrollo de análogos de AVP con potencial aplicación terapéutica en cáncer; ii) que los análogos de AVP tengan actividad estrictamente agonista sobre el V2r de las células tumorales iii) preservar las modificaciones estructurales claves presentes en dDAVP para aumentar la actividad biológica. Esta estrategia condujo al diseño de un análogo de la INT de insectos, llamado dDINT basado en la similitud en la función. El análogo fue evaluado como agente antiproliferativo en células NCI-H82. Luego de su evaluación como agente citostático, el nuevo análogo dDINT no mostró mayor potencia antiproliferativa que el compuesto parental dDAVP. Los resultados de la técnica de *ala-scanning* podrían explicar por qué el análogo dDINT no presentó actividad antitumoral. A pesar de la similitud en la función entre AVP e INT, los aminoácidos presentes en el ciclo de la molécula son muy diferentes a los encontrados en AVP. Estos aminoácidos son los responsables de la especificidad de la interacción del péptido con el bolsillo de unión del V2r. Cuando los aminoácidos de naturaleza hidrofóbica de las posiciones 2 y 3 son sustituidos por un aminoácido alifático neutral como la alanina, el efecto antiproliferativo se pierde completamente. En dDINT estos aminoácidos son alifáticos y neutrales como la alanina mientras que en AVP y dDAVP son aromáticos. Este cambio podría ser el responsable de suprimir el efecto antitumoral mediado por V2r observado luego del tratamiento con dDAVP. Aunque el diseño a partir de un análisis evolutivo enfatizando en la función fisiológica no fue efectivo en este caso, este puede constituir un punto de partida para futuros diseños y desarrollos de drogas para desórdenes relacionados al V1r y V2r.

En este capítulo hemos identificado dos líneas celulares agresivas humanas que expresan el V2r y que presentan características NE pudiendo constituir modelos celulares interesantes de TNE, la línea de SCLC NCI-H82 y la línea de adenocarcinoma de próstata PC-3. También hemos demostrado la estrecha relación entre el *loop* de dDAVP y su actividad antiproliferativa ensayada sobre células agresivas de SCLC y hemos encontrado un péptido mejorado respecto al péptido parental mediante un diseño racional. NCI-H82 es una línea celular humana altamente agresiva de células de cáncer de pulmón y representa un valioso modelo de enfermedad de SCLC con rasgos NE recurrente y resistente a las terapias, que además expresa altos niveles de V2r y de marcadores NE, tal como lo hemos mostrado en este capítulo.

Este capítulo constituye un punto de partida para el desarrollo de potenciales compuestos con aplicación terapéutica en TNE como SCLC y otras posibles aplicaciones en tumores de similares características. Demostramos aquí que el diseño racional a partir de la molécula de dDAVP proporcionó una fuente para el desarrollo de un nuevo análogo con

propiedades antitumorales mejoradas en TNE, encontrando en $[V^4Q^5]dDAVP$ un compuesto prometedor para el tratamiento de éstos tipos tumorales.

Capítulo II: Estudio preclínico *in vitro* de dDAVP y el nuevo análogo [V⁴Q⁵]dDAVP sobre líneas tumorales humanas con características NE de pulmón y próstata.

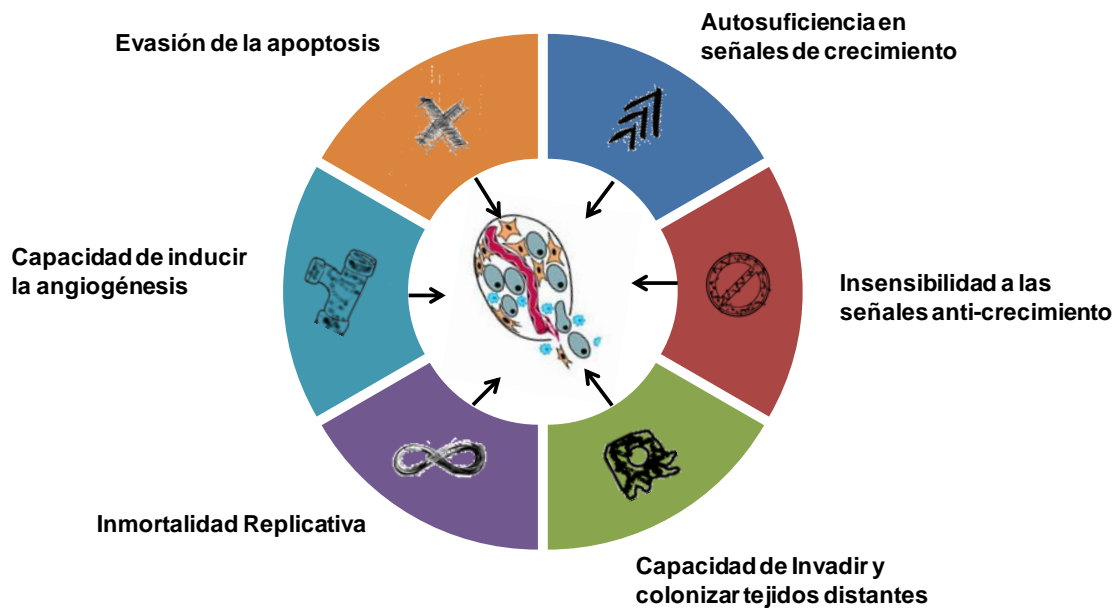
Introducción Capítulo II

Como ya mencionamos en la introducción general, los TNE expresan y producen neuropéptidos, proteínas específicas y hormonas las cuales participan de la regulación del crecimiento tumoral. El estudio de estos productos ha sido desde hace tiempo un tema de interés para los investigadores como punto de partida para encontrar los mecanismos involucrados en la progresión del cáncer y para la búsqueda de nuevas terapias dirigidas. Los TNE son muy controvertidos por su heterogeneidad pero a la vez muy interesantes de estudiar por la agresividad que presentan algunos de ellos y por generar resistencia a las terapias actuales. Tal como demostramos en el capítulo anterior las líneas tumorales humanas de SCLC, NCI-H82, y de cáncer de próstata, PC-3, presentan marcadores de diferenciación NE convirtiéndolas en modelos interesantes para el estudio de nuevas drogas con potencial aplicación terapéutica. Además de esta característica, estas dos líneas expresan el V2r, nuestro receptor de interés, haciendo de las mismas no solo líneas de interés terapéutico sino también modelos para evaluar preclínicamente dDAVP y el nuevo análogo [V⁴Q⁵]dDAVP, como posibles terapias dirigidas para estos tipos de tumores.

Progresión tumoral: transición epitelio mesenquimal (TEM) y diseminación metastásica

El fenotipo celular es el resultado de un equilibrio dinámico entre la maquinaria de transcripción y traducción de la célula con el entorno. Ésta maquinaria regula la proliferación y la diferenciación celular en cada órgano o tejido. En la célula tumoral este equilibrio se encuentra alterado como consecuencia de una serie de múltiples y secuenciales alteraciones genéticas que se van acumulando, conduciendo a perturbar la homeostasis y otras funciones fisiológicas. Este desequilibrio puede conllevar a la malignización celular, que es un proceso complejo que implica múltiples pasos que conducen a la transformación progresiva de células normales a células tumorales. Así las células adquieren características que les permiten transformarse en malignas y logran un microambiente que favorece esta progresión maligna, como se explicará a continuación [142]. La inestabilidad genómica genera que el tumor esté formado por poblaciones heterogéneas de células, donde algunas de éstas adquieren la capacidad de metastatizar, colonizando otros sitios distintos a los del tumor primario, siendo la progresión metastásica la principal causa de muerte por cáncer (Fig. C2.1) [143].

Figura C2.1



Extraído y modificado de Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011) [142].

Figura C2.1 Capacidades adquiridas durante la malignización celular que conduce al cáncer. Si bien no todos los tipos de cáncer adquieren las mismas capacidades funcionales durante su desarrollo, estas son las estrategias más conocidas.

La progresión tumoral se puede considerar un proceso secuencial de etapas concatenadas desde la malignización y formación del tumor primario hasta la colonización metastásica. La pérdida de la organización celular no solo depende de la célula tumoral sino también de la desorganización de la matriz extracelular (MEC) que la circunda. Así, la diseminación metastásica involucra una serie de pasos complejos, interdependientes y secuenciales, donde el no cumplimiento de alguno de ellos impide que una célula tumoral conquiste un órgano distante y se convierta en metastásica. Los pasos secuenciales se pueden resumir del siguiente modo y a este fenómeno se lo denomina cascada metastásica (Fig. C2.2):

1- Transformación inicial y crecimiento de las células tumorales conformando el tumor primario que acumula mutaciones genéticas y epigenéticas gracias a su inestabilidad genética.

2-El tumor debe ser capaz de incrementar la vascularización, a este proceso se lo denomina angiogénesis. Para ello, debe existir una sobreexpresión de factores proangiogénicos aportados tanto por el tumor como por las células del ambiente tumoral.

3-Las células tumorales deben ser capaces de desprenderse del tumor primario, de adquirir capacidad de moverse e invadir el estroma del huésped, intravasarse en los vasos

linfáticos o sanguíneos y diseminarse a través del lecho vascular a los distintos órganos [142,143]. Las células deben ser capaces de disminuir la adhesión intercelular y de esta forma poder alterar la arquitectura tisular y avanzar hacia la progresión maligna. Las moléculas de adhesión E-cadherina e integrinas se constituyen como mediadores importantes en el fenotipo maligno. Las células con capacidad metastásica deben ser resistentes a las señales extracelulares de muerte celular programada (apoptosis), así como también deben presentar la capacidad de perturbar la membrana basal y la matriz extracelular, donde las MMPs juegan un rol preponderante [144].

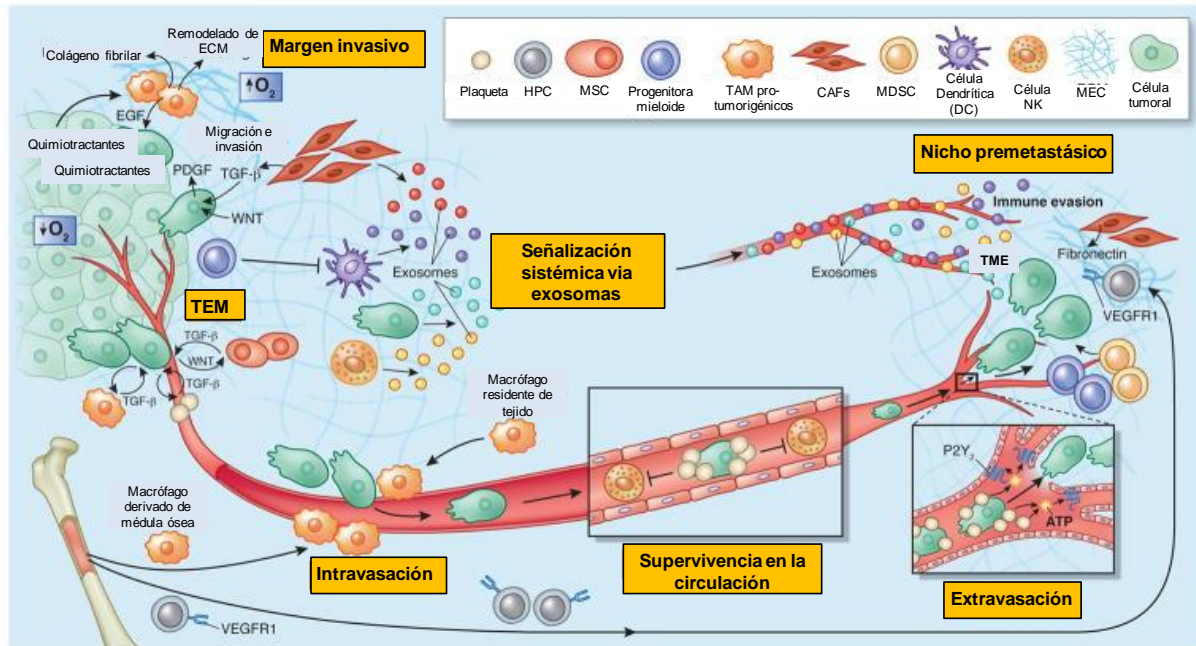
4-Las células logran evadir el sistema inmune y llegar a un órgano blanco receptivo.

5-Las células logran extravasarse en este nuevo órgano y producir micrometástasis y tumores secundarios en órganos distantes.

Durante esta progresión tumoral que llega a la metástasis, se establece una comunicación activa entre las células tumorales y el estroma, mediado por señales autócrinas, parácrinas o endócrinas mediante contactos célula-célula o señales de tipo factores de crecimiento y citoquinas, entablando una comunicación análoga a la establecida entre una célula epitelial y su ambiente durante el desarrollo embrionario [145].

A pesar de los continuos avances en las técnicas quirúrgicas y del desarrollo de terapias adyuvantes y de mantenimiento, la gran mayoría de las muertes por cáncer se relacionan con la diseminación metastásica. Aunque las bases genéticas de la tumorigénesis pueden variar ampliamente entre los diferentes tipos de cáncer, los pasos moleculares y celulares requeridos para la formación de metástasis son similares en las distintas variantes de tumores sólidos. En el proceso de invasión tumoral y metástasis participan distintos factores derivados del tumor y del organismo huésped, como factores angiogénicos, proteolíticos, migratorios y proliferativos, entre otros [146].

Figura C2.2



Extraído y modificado de Quail & Joice, 2013 [145].

Figura C2.2 Resumen de las diferentes etapas de la progresión tumoral, desde la formación de un tumor primario hasta la colonización metastásica de un órgano distante. En respuesta a un ambiente hipóxico, la angiogénesis es inducida por la secreción de distintos factores proangiogénicos por las células tumorales. Los macrófagos, plaquetas y células *stem* mesenquimales (MSC) contribuyen a la TEM, permitiéndole a las células tumorales adquirir un fenotipo invasivo. Un mediador clave en este evento es TGF- β , el cual es secretado por células estromales y participa en un *loop* de señalización parácrina sobre las células tumorales. Los macrófagos asociados a tumor (TAMs), fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) y las células progenitoras derivadas de linaje mieloide suelen asociarse en los bordes del tumor durante la invasión favoreciendo la remodelación de la MEC, y la inmunosupresión al interferir la diferenciación de células dendríticas. Se ha reportado que durante la intravasación de las células tumorales a la circulación, los macrófagos se localizan en áreas perivasculares dentro del tumor donde asisten a las células malignas para atravesar las paredes vasculares. Plaquetas y distintos componentes de la coagulación, en la circulación, se asocian a las células tumorales evitando el reconocimiento de células del sistema inmune. Las plaquetas acompañan a las células tumorales al sitio de extravasación, donde se unen a regiones de retracción vascular favoreciendo la salida del sistema circulatorio. En sitios de colonización secundaria, como el pulmón, los fibroblastos aumentan los niveles de fibronectina, la cual sirve como anclaje para las células tumorales y las células progenitoras hematopoyéticas (HPCs). Células con actividad inmunosupresora, como las células supresoras derivadas de linaje mieloide (MDSCs), también condicionan el nicho premetastásico haciéndolo más permisivo para la colonización tumoral. El tumor primario y el secundario pueden comunicarse entre sí por medio de exosomas liberados por células tumorales y estromales. Su contenido dirige el tropismo de la diseminación tumoral, modula la evasión inmunológica y favorece la transición mesénquimal-epitelio (TME).

Apoptosis

Como se ha mencionado previamente la apoptosis constituye uno de los procesos que se encuentra desregulado en cáncer. La apoptosis es un proceso celular altamente regulado y muy eficiente por el que se produce la muerte celular programada.

La muerte celular programada se puede llevar a cabo por dos vías diferentes:

1)- la vía intrínseca, que constituye la vía regulada por la familia Bcl-2, activadas por estímulos intrínsecos como la activación excesiva de oncogenes, daño del ADN o liberación de proteínas efectoras. Esta vía activa la caspasa 9.

2)- la vía extrínseca que se activa mediante miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), activada en respuesta a estímulos extrínsecos, como la unión de los ligandos Fas y TNF- α a los receptores de superficie como parte de la fase efectora de la respuesta inmune. Esta vía activa la caspasa 8.

En algunas células, la vía extrínseca puede cortar la vía intrínseca a través de la caspasa 8 que activará otras proteínas que generarán la activación de la caspasa 9. Ambas vías confluyen al actuar sobre la membrana mitocondrial externa [147].

En un gran número de tumores la evasión de la apoptosis se vincula a una traslocación que produce un reordenamiento cromosómico que ubica al gen Bcl-2 bajo la regulación de un gen potenciador, generando la sobreexpresión de Bcl-2 e inhibiendo la muerte celular programada, sin necesidad de aumentar la proliferación celular [148]. En mamíferos la apoptosis se produce por medio de proteínas de la familia de la Bcl-2 formada por aproximadamente 14 proteínas divididas en pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, cuando existe mayor proporción de alguna de estas actividades se determina la susceptibilidad de la célula hacia la muerte o hacia la supervivencia [149].

TEM y diferenciación NE.

La TEM es un proceso que ocurre en condiciones normales durante el desarrollo embrionario y también es uno de los procesos claves para la colonización metastásica antes mencionada. Las células epiteliales se caracterizan por una morfología cuboidal y por presentar polaridad celular. Las células interactúan estrechamente entre sí a través de complejos de adhesión homotípicos mediados por proteínas de unión célula-célula (compuestas principalmente por la familia de las cadherinas).

El proceso de TEM fue descrito por primera vez en 1968 por Elizabeth Hay y hace referencia al cambio fenotípico mediante el cual las células de tipo epitelial adquieren características de células mesenquimales como la capacidad de moverse, la capacidad invasiva, la pérdida de polaridad y de adhesión célula-célula y la expresión de proteínas como la Vimentina [150- 152]. La pérdida de la expresión y la función de E-cadherina se han

asociado con la interrupción de las uniones E-cadherina y la ganancia de la motilidad celular e invasividad en varios tipos de tumores. Se ha identificado la pérdida de E-cadherina en carcinomas NE gástricos y esto fue asociado con la metástasis en ganglios linfáticos; sin embargo, no se correlacionó con la invasión a órganos adyacentes o metástasis a distancia. Adicionalmente, la pérdida progresiva de E-cadherina en células tumorales con la acumulación de β -catenina indica que se han sometido una TEM [151].

El proceso inverso a TEM, o sea la transición mesenquimo epitelial (TME) se da en el órgano colonizado [153-155]. La diferenciación NE de los tumores está relacionada con la transición desde células con características epiteliales a células con fenotipo invasivo y metastásico. Se ha encontrado diferenciación NE en un subgrupo de una variedad de carcinomas que incluyen cáncer de próstata [156], cáncer de mama [157], cáncer gástrico y cáncer colo-rectal [158] y NSCLC [159]. Se ha sugerido que marcadores de diferenciación NE, tales como la NSE, una enzima enolasa glucolítica que constituye un marcador bioquímico específico para neuronas y células NE secretoras de péptidos pueden utilizarse para identificar células NE y para determinar mal pronóstico y colonización metastásica en varios carcinomas y principalmente en TNE de pulmón [160, 161].

Capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales

Clásicamente, el proceso de invasión puede ser dividido en tres pasos secuenciales:

- 1)- la adhesión de las células tumorales a la membrana basal u otras estructuras de la MEC,
- 2)- la disgregación de la membrana basal por digestión proteolítica y
- 3)- la migración de las células invasivas a través de la membrana basal modificada.

Las similitudes biológicas observadas en los procesos de invasión tumoral y angiogénesis subrayan la función cooperativa de las células tumorales y las células endoteliales durante el proceso de progresión tumoral. Las proteasas extracelulares están encargadas de la degradación, remodelación y liberación de factores reguladores de la angiogénesis a partir de la MEC durante la progresión de la migración celular y la invasión. Existen tres grandes grupos de proteasas compuestos por MMPs, cisteíno proteasas y serino proteasas, tales como los activadores de plasminógeno tipo tisular o uroquinasa (tPA y uPA). Estas últimas se encargan de activar diversas MMPs latentes y degradar algunas proteínas de matriz tales como fibronectina, laminina y colágeno tipo IV [162]. La adhesión de las células tumorales a la membrana basal involucra el anclaje específico a glicoproteínas de matriz, tales como fibronectina, laminina y colágenos, las cuales se unen a

una variedad de receptores de la superficie de las células tumorales como la integrina $\beta 1$ entre otras moléculas de anclaje. Sin embargo, a medida que el tumor pierde diferenciación y aumenta su agresividad, la dependencia al anclaje no resulta esencial para la célula tumoral, ya que las integrinas continúan mediando en las señales de supervivencia aún en ausencia de su ligando [163].

En este capítulo se examina el impacto de la estimulación del V2r sobre eventos celulares claves relacionados a la progresión tumoral a partir del uso de los análogos selectivos del V2r, dDAVP y $[V^4Q^5]$ dDAVP. Los análogos fueron evaluados en las líneas altamente agresivas NCI-H82 y PC-3 que resultaron positivas tanto para la expresión del V2r como para los marcadores de diferenciación NE estudiados en el capítulo anterior. Los eventos claves estudiados se numeran a continuación: proliferación celular, tanto a alta como a baja densidad; tiempo de duplicación; apoptosis; migración celular y modulación de la expresión de marcadores NE. Por otro lado también se evaluó por silenciamiento y bloqueo del V2r la especificidad del nuevo análogo diseñado racionalmente, $[V^4Q^5]$ dDAVP.

En este capítulo se contrasta parte de las siguientes hipótesis:

-Si V2r, uno de los subtipos de receptores de la superfamilia de GPCR de la hormona neuropeptídica altamente conservada AVP, está asociado a efectos antitumorales, **y está presente en TNE y tumores con transdiferenciación NE**, entonces los análogos de AVP agonistas de V2r **tendrían un efecto antitumoral** en dichos tumores.

-Si los análogos peptídicos de AVP, agonistas de V2r, activan una respuesta en las células de TNE que expresan dicho receptor, que lleva a reducir la proliferación y la migración celular, favorecer la producción de efectores antiangiogénicos, **estimular la diferenciación celular**, y reducir el crecimiento tumoral; **entonces éstos análogos constituirían posibles terapias para dichos tumores con características NE agresivos y con pocas alternativas terapéuticas.**

Objetivos específicos Capítulo II

- Evaluar el efecto antiproliferativo *in vitro* de los análogos selectivos de AVP, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre células de cáncer de pulmón (SCLC y NSCLC) y de próstata.
- Determinar si existen variaciones en el tiempo de duplicación de las líneas celulares utilizadas con y sin tratamiento de los análogos.
- Estudiar el efecto antimigratorio *in vitro* de los análogos selectivos de AVP, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre células de cáncer de pulmón y próstata NE.
- Estudiar el efecto de los análogos sobre la apoptosis, *in vitro*, en líneas tumorales de pulmón y de próstata humanas.
- Demostrar la especificidad del análogo [V⁴Q⁵]dDAVP por el V2r.
- Evaluar el efecto de los análogos, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP, sobre la modulación de la expresión de los marcadores NE, CgA y NSE, *in vitro*, en las líneas de cáncer de pulmón y próstata humanas.

Metodología Capítulo II

Ensayo de proliferación celular

El protocolo utilizado fue el mismo que ya se especificó en la metodología general. Para la línea NCI-H82 fue utilizado al igual que en capítulo anterior el ensayo del MTS y para las otras líneas el ensayo del MTT. La proliferación celular fue cuantificada por la capacidad de las células viables de reducir el MTS o el MTT en formazán. La absorbancia fue medida en una longitud de onda de 490 o 570 nm respectivamente. Se sembraron 5×10^3 células NCI-H82, 3×10^3 células NCI-H125 y 3×10^3 células PC-3, luego se incubaron durante 72 horas con los análogos de AVP o PBS.

El rango de concentraciones utilizadas fue de 100 nM a 1500 nM de los análogos dDAVP y $[V^4Q^5]$ dDAVP.

También se evaluó la proliferación celular en la línea NCI-H82, las células fueron incubadas con el análogo $[V^4Q^5]$ dDAVP (1000 nM) y coincubadas con el análogo y el antagonista no peptídico selectivo y competitivo del V2r *Tolvaptán*® (1500 nM), para probar la especificidad del nuevo análogo por el V2r.

Cultivo Clonogénico

Adicionalmente al ensayo de proliferación celular se realizó el ensayo de crecimiento de colonias a baja densidad celular para la línea PC-3. 350 células PC-3 fueron sembradas por pocillo en placas de 96 pocillos por 7 días, en medio completo, en presencia de distintas concentraciones de los compuestos (100-1500 nM). El medio fue renovado a los 4 días. El día 7 las células fueron fijadas con formalina (10%) y teñidas con cristal violeta 0.5%. Luego se contaron las colonias que presentaban más de 30 células.

Migración

Ensayo en Transwell®

Para evaluar la migración celular se utilizó el ensayo de migración en *Transwell*® utilizando una cámara de Boyden modificada con una membrana con poros de 8 µm en placa de 24 pocillos. 3×10^5 células NCI-H82 o 3×10^4 células NCI-H125 en medio libre de SFB se sembraron en la cámara superior del *transwell*®. En la cámara inferior del pocillo se colocó una concentración de 1000 nM de dDAVP y $[V^4Q^5]$ dDAVP. Luego de incubar por 16 horas las células NCI-H82 que pasaron a la cámara inferior fueron cuantificadas por recuento directo en cámara de Neubauer. Las células NCI-H125 que quedaron en la cara inferior de la membrana luego de 16 horas de incubación, fueron fijadas y teñidas con 0.5% Cristal violeta y 20% metanol y luego solubilizadas en Etanol/acético 3:1. La absorbancia fue medida a 595 nm. La absorbancia del grupo control fue considerada 100% en ambos casos.

Ensayo por herida en monocapa

Para evaluar la migración celular se utilizó el ensayo de migración en herida descrito en la metodología general, 4×10^5 células PC-3 fueron sembradas en placas de 6 pocillos y se incubaron por 20 horas bajo la presencia de los análogos dDAVP y $[V^4Q^5]dDAVP$ a una concentración de 1000 ηM o vehículo. Las heridas fueron fotografiadas usando un microscopio invertido Nikon TE-2000 y el área migrada fue cuantificada usando el software ImageJ (NHI).

Tiempo duplicación

Se evaluó el efecto sobre el tiempo de duplicación de células NCI-H82 y PC-3 tratadas con análogos a una concentración de 1000 ηM o PBS. Se contaron las células en cámara de Neubauer cada 24 horas durante 3 días luego del tratamiento sin cambiar el medio.

Silenciamiento

Las células NCI-H82 y NCI-H125 fueron transfectadas para su silenciamiento (tal como se detalla en la metodología general) y luego sembradas y tratadas por 72 horas con el análogo $[V^4Q^5]dDAVP$ (100 ηM -1500 ηM). La proliferación celular se midió utilizando el ensayo de metabolización de MTS (NCI-H82) o MTT (NCI-H125). Se midió la absorbancia a 490 y 570 nm respectivamente. Luego se evaluó por qRT-PCR la expresión de V2r en las células silenciadas y no silenciadas con los *primers* para el V2r descritos en el capítulo I para determinar el grado de silenciamiento logrado.

qRT-PCR

Se evaluó por qRT-PCR la modulación de los marcadores NE, NSE y CgA y de las proteínas reguladoras de la apoptosis BAX, Bcl-2 y Bcl-xL en las líneas NCI-H82 y PC-3. En la línea NCI-H82 se evaluó la expresión y relación entre BAX y Bcl-xL y en la línea PC-3 la expresión y relación entre BAX y Bcl-2 por ser éstas unas de las responsables de regular la apoptosis y estar sobreexpresadas en cada línea celular.

Para esto las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y cuando superaron el 50% de confluencia fueron tratadas con una concentración 1000 ηM de análogos o vehículo *overnight*. 16 horas después del tratamiento, las células fueron utilizadas para extraer su ARN y posteriormente realizar una qRT-PCR tal como se detalló en la introducción general y en el capítulo I. Las células tratadas con PBS, correspondientes a cada línea celular estudiada, fueron utilizadas como grupo control para relativizar la expresión de los marcadores. Cada muestra se analizó por triplicado y el Ct se usó para el

análisis posterior. Los valores de Ct se normalizaron para los niveles de expresión de GAPDH en el caso de los marcadores NE (NSE y CgA) y para los niveles de HPRT1 en el caso de las proteínas vinculadas a la regulación de la apoptosis (BAX, Bcl-2 y Bcl-xL). Los valores de RQ se calcularon como $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Para los genes vinculados a la regulación de la apoptosis (BAX, Bcl-2 y Bcl-xL) se determinó la expresión de los genes por separado para luego realizarse el cociente entre la expresión relativa de BAX y su par anti-apoptótico y así determinar si los análogos presentan algún efecto sobre la muerte celular programada.

Los *primers* utilizados para NSE y CgA están detallados en el Capítulo I (Tabla C1-II), La tabla C2-I muestra los *primers* utilizados para BAX, Bcl-2, Bcl-xL y HPRT1 en este capítulo.

Tabla C2-I. *Primers* utilizados en éste capítulo.

| Gen | Secuencia Primers | Referencia |
|---------------|--|-----------------------------------|
| BAX | Fwd: 5'-GGCCGGGTTGTCGCCCTTTT-3' Rv: 5'-CCGCTCCCGGAGGAAGTCCA-3' | Zhang <i>et al</i> , 2014 [164] |
| Bcl-2 | Fwd: 5'-GGATGCCTTTGTGGAAGTGTAC-3' Rv: 5'- TTCACTTGTGGCCAGATAGG-3' | Cabrera <i>et al</i> , 2017 [165] |
| Bcl-xL | Fwd: 5'-GGTCGCATTGTGGCCTTTTT-3' Rv: 5'- GCTCTAGGTGGTCATTCAGGT-3' | |
| HPRT-1 | Fwd: 5'-AACGTCTTGCTCGAGATGTG-3' Rv: 5'-GCTTTGATGTAATCCAGCAGG-3' | Cortesía Lic. Hector Cuello (LOM) |

Resultados Capítulo II

Efecto antiproliferativo de los análogos de AVP, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre células de cáncer de pulmón y próstata humanas.

[V⁴Q⁵]dDAVP fue diseñado como un agonista selectivo del V2r de AVP derivado de la molécula dDAVP mediante una aproximación racional, tal como mostramos en el capítulo anterior. En el Capítulo I observamos que el nuevo análogo sintético [V⁴Q⁵]dDAVP resultó un mejor agente antiproliferativo, *in vitro*, que el análogo parental a las dos concentraciones probadas (100 y 1000 nM) en la línea NCI-H82 de SCLC humana. En este capítulo se estudió el efecto del nuevo análogo y del análogo parental dDAVP en un rango más amplio de concentraciones teniendo en cuenta además concentraciones intermedias, tanto en la línea NCI-H82 como en la línea PC-3 que también expresa V2r y marcadores de diferenciación NE.

Para estudiar el efecto citostático de los análogos sobre las líneas de interés se realizaron ensayos de proliferación celular *in vitro*. La incubación de células NCI-H82 en presencia de los compuestos dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP resultó en una significativa inhibición de la proliferación ($p < 0.05$). El análogo [V⁴Q⁵]dDAVP mostró un mayor efecto citostático respecto de dDAVP, a bajas (100 nM) y a altas (1000 nM) concentraciones, llegando a una inhibición máxima del 40% de la proliferación celular (Fig. C2.3A). La incubación de células PC-3 a alta densidad en presencia de los compuestos resultó en una inhibición de la proliferación que no muestra dosis dependencia. El análogo [V⁴Q⁵]dDAVP no mostró un mayor efecto citostático respecto de dDAVP (Fig. C2.3C).

Además se evaluó una línea tumoral de pulmón que, como demostramos en el capítulo I, no expresa V2r ni marcadores de diferenciación NE. En esta línea, NCI-H125, se determinó que no hay efecto antiproliferativo de dDAVP ni del análogo mejorado [V⁴Q⁵]dDAVP (Fig. C2.3B).

Figura C2.3

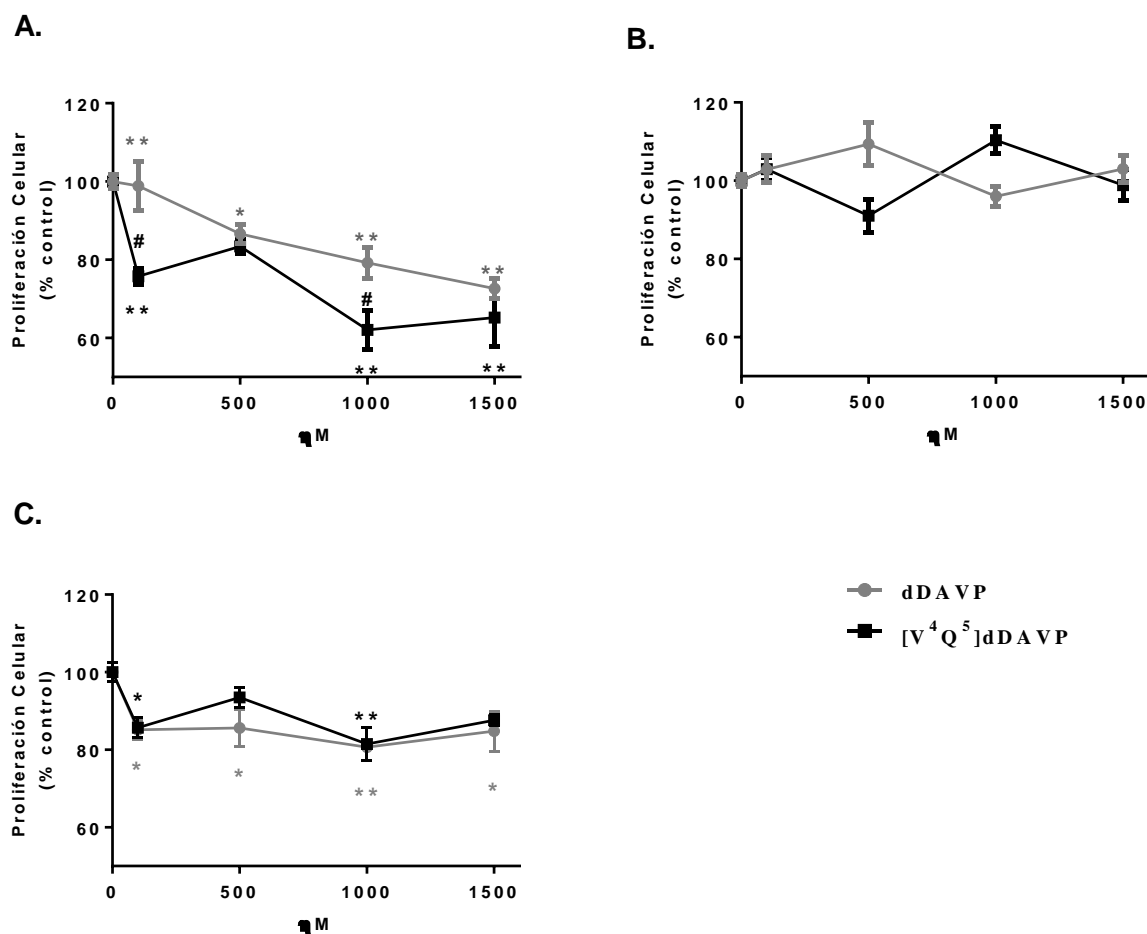


Figura C2.3. Evaluación del efecto de los análogos dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la proliferación celular en líneas tumorales de pulmón y próstata humanas. Se realizó el ensayo de metabolización de MTT para PC-3 y NCI-H125 o MTS para NCI-H82. Se sembraron 3×10^3 células PC-3 y NCI-H82 y 5×10^3 células NCI-H125 por pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 72 horas con los análogos (100 nM a 1500 nM). La proliferación celular fue cuantificada por la capacidad de las células viables de reducir el MTT o el MTS en formazán. La absorbancia fue medida en una longitud de onda de 570 nm para el MTT o 490 nm para el MTS. **A.** NCI-H82. **B.** NCI-H125. **C.** PC-3. Los valores representan media \pm SEM y son representativas de tres experimentos independientes. Para la comparación de análogos se realizó ANOVA factorial (2x4) con comparación de IC95 para la media #p<0.05. Los * corresponden a la comparación de cada concentración de análogo con el control (PBS); *p<0.05 **p<0.01.

Efecto antitumoral *in vitro* de los análogos dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre el crecimiento a baja densidad de células de cáncer de próstata humana PC-3.

Por otro lado se evaluó el efecto de los análogos a baja densidad celular en la línea PC-3, como método complementario al ensayo de MTT con el objetivo de evaluar los análogos en condiciones más limitantes. Se obtuvieron resultados similares al crecimiento en alta densidad pero con un mayor efecto de los dos análogos, llegando a una inhibición del 30-40% a altas concentraciones (1000 nM). Dentro del rango de concentraciones evaluadas no se alcanzó la concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀). (Fig. C2.4).

Figura C2.4

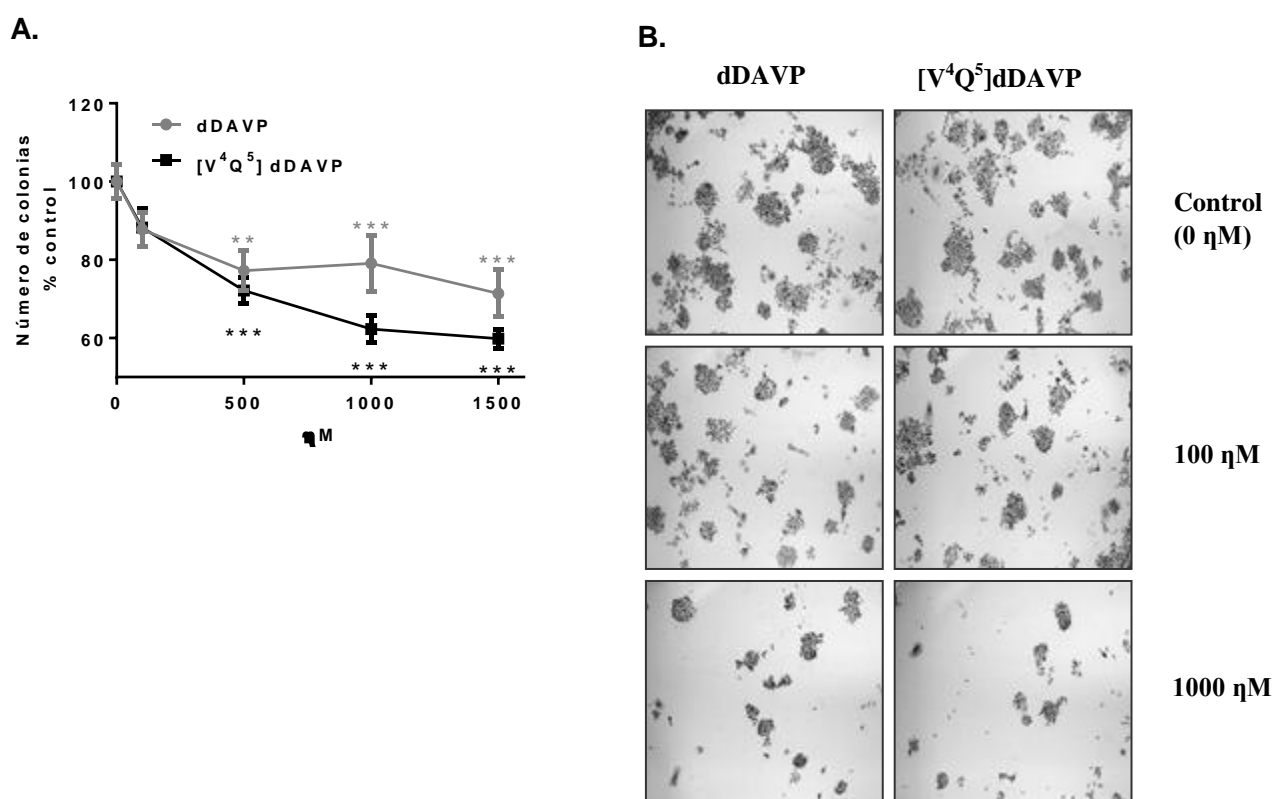


Figura C2.4. Evaluación del efecto de los análogos, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP, sobre el crecimiento a baja densidad en la línea de cáncer de próstata humana PC-3. A. Cultivo clonogénico: se realizó el ensayo de crecimiento en colonias a baja densidad celular. 350 células PC-3 fueron sembradas en placas de 96 pocillos en medio completo en presencia de distintas concentraciones de los compuestos. El medio fue renovado a los 4 días. El día 7 las células fueron fijadas con formalina y teñidas con cristal violeta. Las colonias de >30 células fueron contadas y relativizadas al control (PBS, 100%). Los datos muestran media ± SEM de tres experimentos independientes. ANOVA factorial (2x4) la interacción fue no significativa (n.s), la comparación entre compuestos también fue n.s por lo que se procedió a comparar cada concentración de análogo con el control (PBS) mediante la prueba de Dunnett **p<0.01; ***p<0.001. **B. Microfotografías representativas** del efecto del tratamiento por 7 días de los análogos sobre la formación de colonias a baja densidad. Las colonias fueron fotografiadas usando un microscopio invertido Nikon TE-2000, aumento X40.

Evaluación del tiempo de duplicación de NCI-H82 y PC-3 con y sin tratamiento de dDAVP y el análogo $[V^4Q^5]dDAVP$.

Para reconfirmar el efecto citostático de dDAVP y $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre las células estudiadas se evaluó el tiempo de duplicación con y sin tratamiento de los análogos (Fig. C2.5). El tiempo de duplicación sin tratamiento fue de 33 horas y de 36 horas para NCI-H82 y PC-3 respectivamente. El tratamiento con dDAVP y $[V^4Q^5]dDAVP$ incrementó el tiempo de duplicación en ambas líneas celulares, 6-7 horas más para NCI-H82 y 5-6 horas para PC-3. La comparación de los ajustes de las ecuaciones de crecimiento exponencial fue estadísticamente significativa para ambas líneas (NCI-H82 células control, tiempo de duplicación: 33 horas, Coeficiente de determinación del modelo (R)= 0.98; NCI-H82 células tratadas con dDAVP , tiempo de duplicación: 40 horas R=0, 96; NCI-H82 células tratadas con $[V^4Q^5]dDAVP$, tiempo de duplicación: 38 horas R=0, 94; PC-3 células control, tiempo de duplicación: 36 horas, R=0.92; PC-3 :tratadas con dDAVP, tiempo de duplicación 42 horas, R=0.93; PC-3 células tratadas con $[V^4Q^5]dDAVP$, tiempo de duplicación: 39 horas R=0, 92).

Figura C2.5

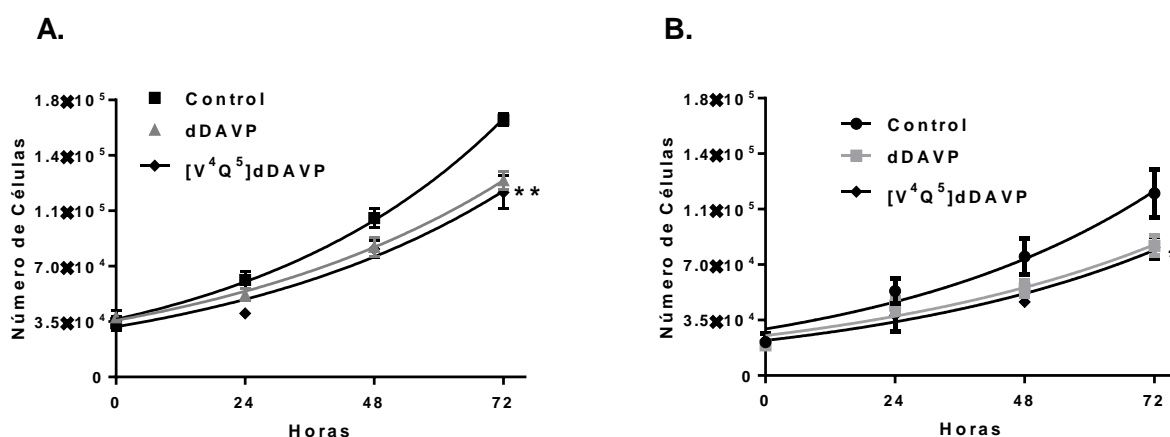


Figura C2.5. Evaluación del efecto de los análogos, dDAVP y $[V^4Q^5]dDAVP$ sobre el tiempo de duplicación en las líneas NCI-H82 y PC-3. Para calcular el tiempo de duplicación las células viables fueron contadas en cámara de Neubauer cada 24 hs por 3 días usando el método de exclusión de azul tripán. El tiempo de duplicación con y sin tratamiento de dDAVP o $[V^4Q^5]dDAVP$ 1000 nM fue calculado con el modelo de fase exponencial de crecimiento. **A. NCI-H82. B. PC-3.** Los resultados expresan media \pm SEM del número de células. Se compararon los ajustes de curvas de crecimiento exponencial de las células control y tratadas a 72 horas $**p < 0.001$.

Efecto de dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la apoptosis en líneas tumorales de SCLC y próstata.

Dentro del grupo de proteínas de la familia Bcl-2 con función anti-apoptótica encontramos a las proteínas Bcl-2 y Bcl-XL, entre otras. Dentro de las proteínas de la familia con actividad pro-apoptótica encontramos a Bax, entre otras. Se ha reportado que la línea PC-3 sobre-expresa Bcl-2 [166] y que la línea NCI-H82 no presenta niveles detectables de expresión de Bcl-2 pero si de Bcl-xL [167].

Por lo expuesto es que se determinó *in vitro* por qRT-PCR la expresión de BAX y Bcl-2 para evaluar si los análogos regulan genes vinculados a la apoptosis en la línea PC-3 y la expresión de BAX y Bcl-xL en la línea NCI-H82. Como puede verse en las figuras C2.6 y C2.7 ambos análogos tuvieron un efecto que conduciría a una regulación pro-apoptótica de las células tumorales. En la línea NCI-H82 puede verse un efecto significativamente mayor del análogo [V⁴Q⁵]dDAVP con respecto al análogo parental dDAVP tanto en los genes separados (Fig. C2.6C y D) como al evaluar la relación (Fig. C2.7B), balanceando la regulación hacia un efecto pro-apoptótico. En la línea PC-3 ambos análogos regularon con el mismo efecto al gen Bcl-2 pero el análogo [V⁴Q⁵]dDAVP (Fig. C2.6B) no presentó efecto estadísticamente significativo en la regulación de BAX (Fig. 2.6A). Al analizar la relación entre ambos genes, el balance hace que ambos análogos tengan un efecto pro-apoptótico siendo significativamente mayor el efecto del análogo dDAVP en PC-3 y el análogo [V⁴Q⁵]dDAVP en NCI-H82 (Fig. C2.8A).

Figura C2.6

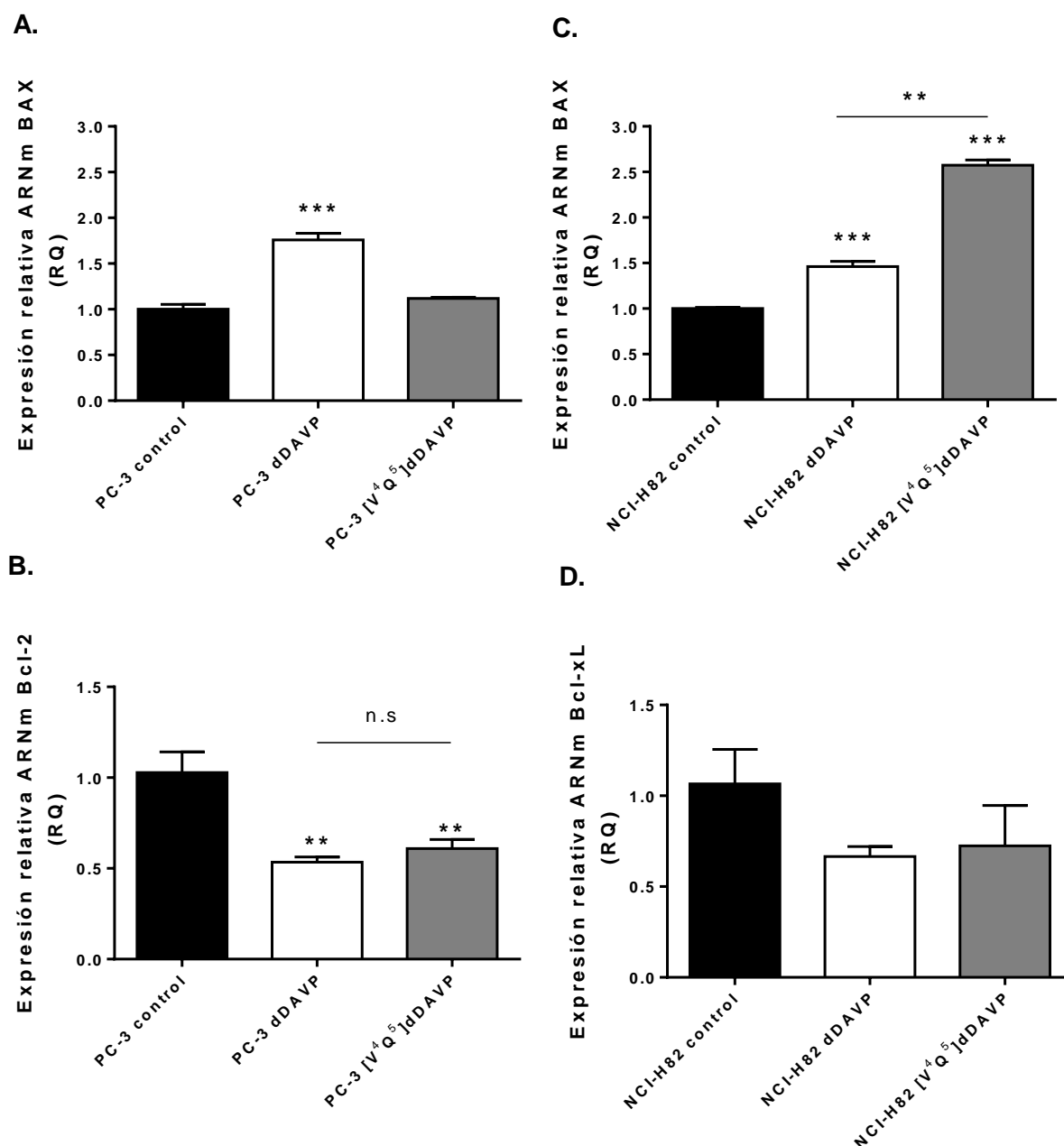
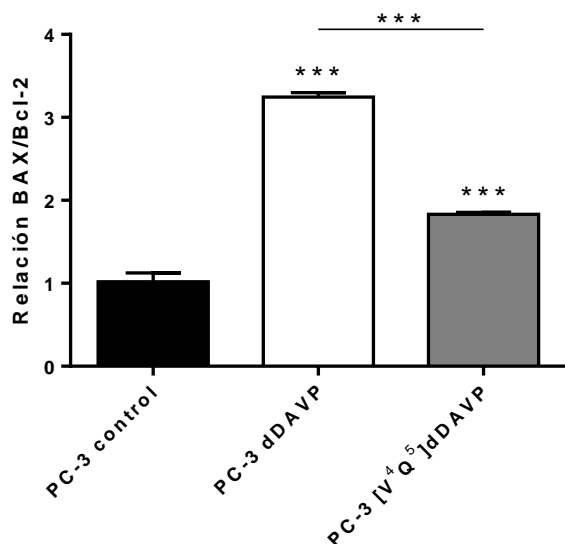


Figura C2.6. Efecto de los análogos, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la modulación de proteínas reguladoras de la apoptosis en las líneas tumorales PC-3 y NCI-H82. Ambas líneas celulares fueron incubadas con dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP (1000 nM, *overnight*). Cada muestra fue analizada por triplicado y los valores de Ct se usaron para el análisis. Los valores de Ct se normalizaron a los niveles de expresión de HPRT1 y se expresaron en relación a la muestra control (tratada con PBS). Los valores de RQ se calcularon como: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. **A. Expresión relativa de ARNm de BAX y B. de Bcl-2 en células PC-3. C. Expresión relativa de ARNm de BAX y D. de Bcl-xL en células NCI-H82.** Los resultados se expresan como media \pm SEM. ANOVA simple contrastado con Tukey **p<0.01; ***p<0.001 ; n.s: no significativo.

Figura C2.7

A.



B.

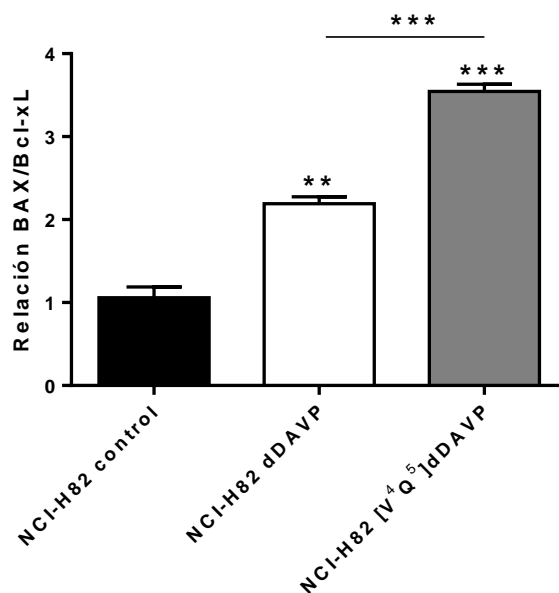


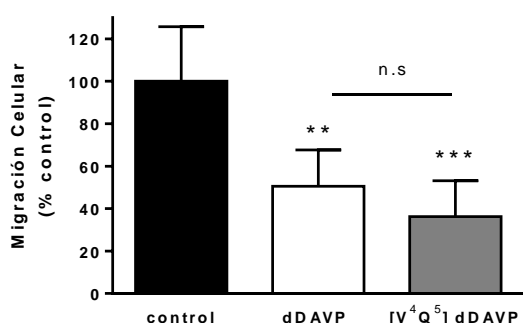
Figura C2.7. Efecto de los análogos, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la Modulación de proteínas reguladoras de la apoptosis en las líneas tumorales PC-3 y NCI-H82. Se evaluó la relación entre la expresión de BAX y su par anti-apoptótico. **A. Expresión relativa de ARNm de BAX/ expresión relativa de Bcl-2 en células PC-3.** **B. Expresión relativa de ARNm de BAX/ expresión relativa de Bcl-xL en células NCI-H82.** Los resultados se expresan como media ± SEM. ANOVA simple contrastado con Tukey **p<0.01; ***p<0.001.

Efecto antimigratorio *in vitro* de los análogos selectivos de AVP, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre células de cáncer de pulmón y próstata NE.

El tratamiento *in vitro* a una concentración de 1000 nM inhibió un 60-75% la migración de células NCI-H82 en *transwell*® (Fig. C2.8A) y en un 40% la migración en herida en PC-3 (Fig. 2.9C y D). Como era de esperar, los análogos no tuvieron efecto en la migración celular en la línea NCI-H125 que carece de rasgos NE y no expresa el V2r (Fig. C.8.B).

Figura C2.8

A.



B.

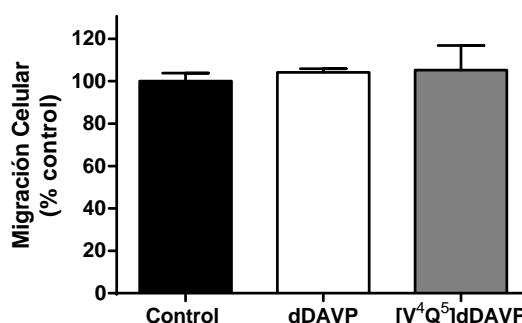


Figura C2.8. Efecto de los análogos dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la migración celular de células de cáncer de pulmón. Para evaluar la migración celular se utilizó el ensayo de migración en *transwell*® utilizando una cámara de Boyden modificada con una membrana con poros de 8-µm en placa de 24 pocillos. 3 x 10³ células NCI-H82 y 3 x 10⁵ células se sembraron en la cámara superior del transwell. En la cámara inferior del pocillo se colocó medio suplementado con 10% de SFB y una concentración de 1000 nM de dDAVP o [V⁴Q⁵]dDAVP. Luego se incubaron por 16 horas. **A. NCI-H82. B. NCI-H125.** Los valores representan media ± SEM y son representativas de tres experimentos independientes. ANOVA simple contrastado con Tukey. *p<0.05 **p<0.01, n.s. (no significativo). Para la línea NCI-H125 (B), el ANOVA fue n.s.

Figura C2.9

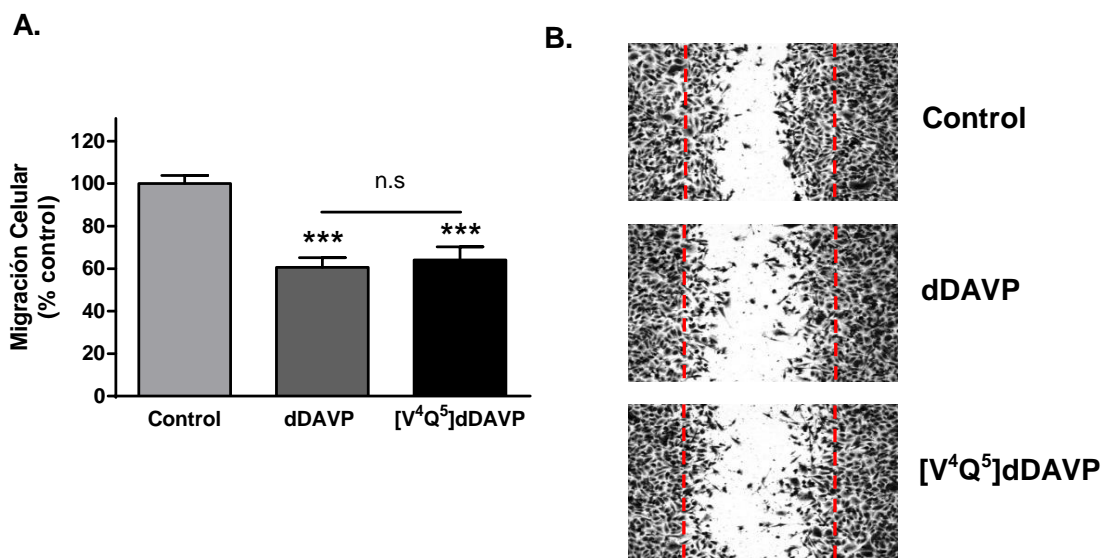


Figura C2.9. Efecto de los análogos dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la migración celular de células de cáncer de próstata. Para evaluar la migración celular se utilizó el ensayo de migración en herida, 4×10^5 células PC-3 fueron sembradas en placas de 6 pocillos, cuando llegaron a confluencia se realizó una herida con un *tip* de p200. Se cambió el medio y se colocaron los péptidos a una concentración de 1000 nM. Se incubaron por 20 horas, se fijaron con una solución de metanol al 20% y tiñeron con Cristal violeta al 0.5%. La herida control se realizó una hora antes de finalizar el experimento. Las líneas rojas punteadas representan el ancho de la herida control realizada a tiempo 0. Las heridas fueron fotografiadas usando un microscopio invertido Nikon TE-2000 y el área migrada fue cuantificada usando ImageJ. Los valores representan media \pm SEM y son representativas de tres experimentos independientes. ANOVA simple contrastado con Tukey. *** $p < 0.001$, n.s (no significativo).

Especificidad del análogo [V⁴Q⁵]dDAVP por el V2r evaluada sobre la línea NCI-H82.

Para determinar la especificidad del análogo [V⁴Q⁵]dDAVP por el V2r se realizó el ensayo de proliferación celular de las líneas tumorales silenciando el gen de V2r con ARN de interferencia (ARNi) en las líneas NCI-H82 y NCI-H125. El efecto citostático del análogo [V⁴Q⁵]dDAVP, diseñado racionalmente en el capítulo I, probado en el capítulo I y en este capítulo se vio suprimido al transfectar con ARNi para el V2r la línea NCI-H82 (Fig. C2.10A) En la línea NCI-H125, negativa para el V2r, no se evidenció efecto alguno en las células transfectadas con el ARNi control ni con el ARNi para el V2r (Fig. C2.10B). Para corroborar el silenciamiento y determinar la eficiencia del silenciamiento logrado con la transfección se realizó una qRT-PCR de las células transfectadas, el resultado evidenció que la eficiencia del silenciamiento fue de un 50%, pudiendo explicar el mismo la pérdida parcial del efecto antiproliferativo que observamos al realizar el ensayo de proliferación con las células NCI-H82 silenciadas para el V2r (Fig. C2.10C).

Figura C2.10

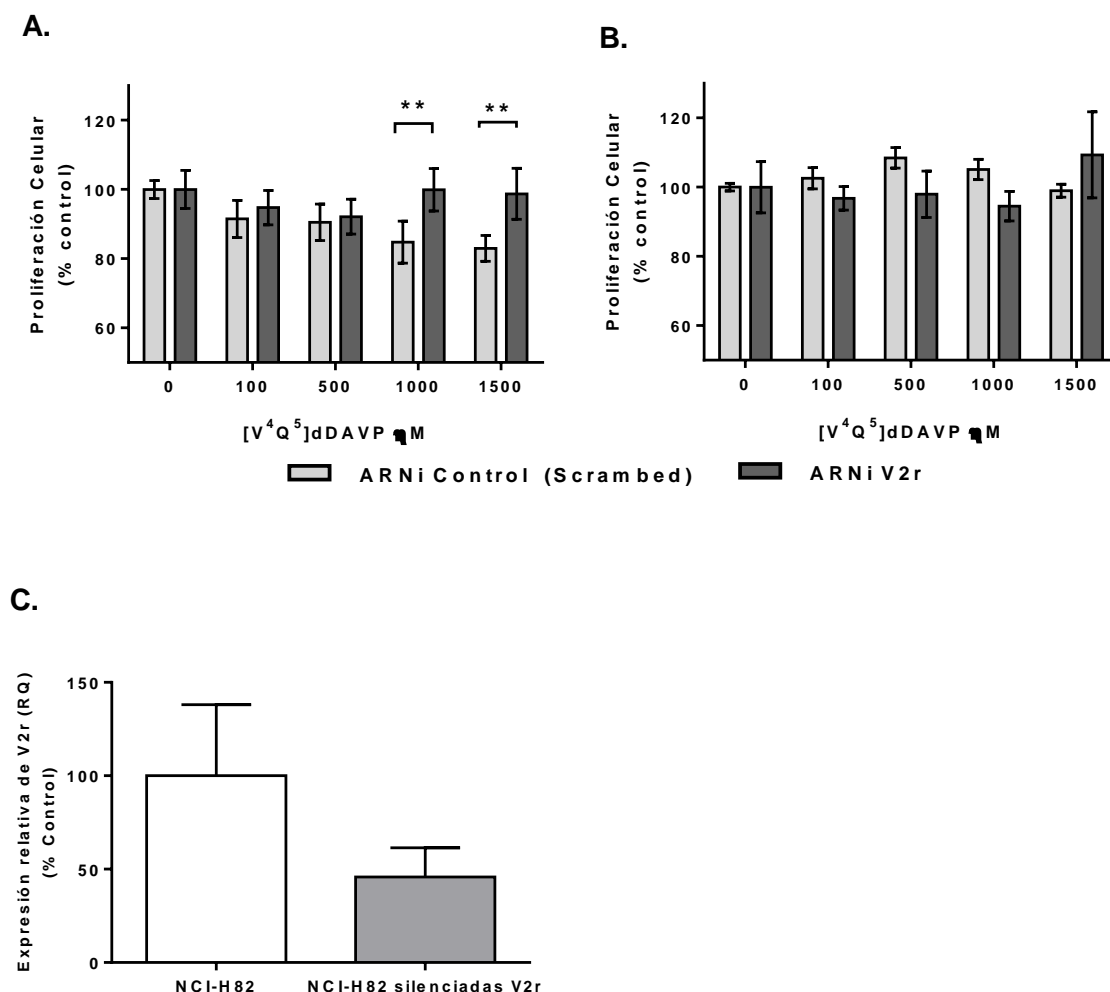


Figura C2.10. A. Especificidad del análogo [V⁴Q⁵]dDAVP por el V2r evaluada por silenciamiento con ARNi en la línea NCI-H82 y posterior ensayo de proliferación celular. Se realizaron dos rondas de transfección de las células utilizando ARNi para el V2r o ARNi control (scrambled) utilizando Lipofectamina 2000 siguiendo indicaciones del proveedor. Las células transfectadas fueron sembradas y tratadas por 72 horas con el análogo [V⁴Q⁵]dDAVP (100-1500 nM). La proliferación celular se midió utilizando el ensayo de metabolización de MTS para **A. NCI-H82** (ANOVA doble vía, contrastado IC 95% *p<0.05) o MTT para **B. NCI-H125**. (ANOVA doble vía no significativo). Los datos muestran media ± IC95 de tres experimentos independientes. **C.** Expresión de V2r en células NCI-H82 silenciadas y no silenciadas.

Por otro lado se realizó el bloqueo del V2r por medio de un antagonista competitivo no peptídico del V2r de AVP: el compuesto *tolvaptán*. Dicho antagonista posee una afinidad muy superior al V2r en comparación a los ligandos peptídicos derivados de AVP (Ki *tolvaptan*: 0.43 nM versus Ki dDAVP: 23.3 nM) [168]. Como se observa en la Figura C2.11, la capacidad moduladora sobre el crecimiento de células tumorales de [V⁴Q⁵]dDAVP a alta

concentración fue completamente bloqueada mediante la coincubación del antagonista tolvaptán.

Figura C2.12

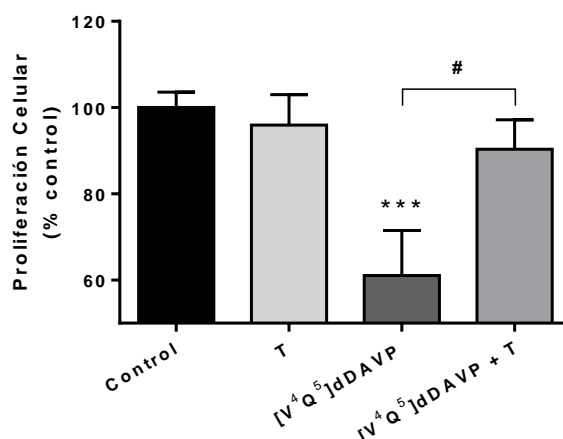


Figura C2.11. Bloqueo químico del V2r en la línea NCI-H82. Se evaluó el efecto antiproliferativo de [V⁴Q⁵]dDAVP (1000 nM) mediante el ensayo del MTS en presencia y ausencia del antagonista selectivo del V2r *tolvaptán* (1000 nM). Los valores están expresados como media \pm SEM y corresponden a los resultados de al menos 3 ensayos independientes. ANOVA simple seguido de la prueba de Tukey. *** $p < 0,001$ tratamiento vs. Control. # $p < 0,05$ análogo vs. análogo + *Tolvaptan*. T=*Tolvaptan*.

Ambos resultados, los arrojados por el silenciamiento del V2r como los arrojados por el bloqueo químico, indican que la reducción del crecimiento celular *in vitro* observada tras la incubación con [V⁴Q⁵]dDAVP en la línea NCI-H82 resultaría principalmente de la activación del V2r de AVP.

Efecto de dDAVP sobre la modulación *in vitro* de los marcadores de diferenciación NE, NSE y CgA en las líneas tumorales estudiadas.

Como previamente demostramos en el capítulo I, NCI-H82 y PC-3 expresan altos niveles de los marcadores de diferenciación NE, NSE y CgA, con relevancia clínica. Para evaluar si dDAVP mediante el V2r tiene capacidad de modular los niveles de expresión de estos marcadores de diferenciación NE, se determinó la expresión de ARNm por qRT-PCR luego de una incubación *overnight* con una concentración 1000 nM de dDAVP. Como muestra la Figura C2.12, la expresión de los marcadores fue drásticamente reducida luego del tratamiento en un 90% para NSE y un 80% para CgA en la línea NCI-H82 y en un 80% para NSE y un 95% para CgA en la línea PC-3.

Figura C2.12

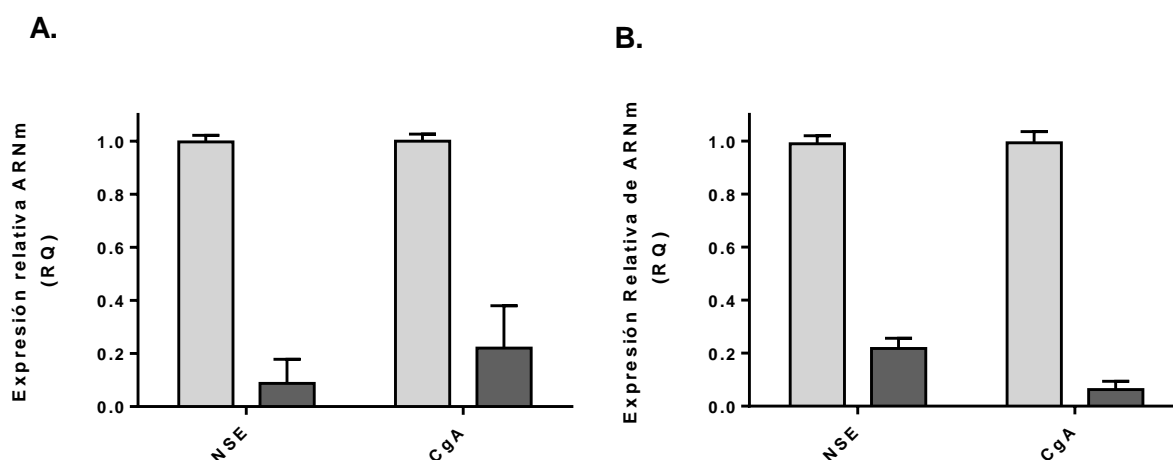


Figura C2.12. Evaluación del efecto de dDAVP sobre la modulación de los marcadores de diferenciación NE, NSE y CgA en las líneas NCI-H82 y PC-3. La expresión relativa de ARNm de CgA y NSE fue evaluada por qRT-PCR en células incubadas con dDAVP (1000 η M, *overnight*). Cada muestra fue analizada por triplicado y los valores de Ct se usaron para el análisis. Los valores de Ct se normalizaron a los niveles de expresión de GAPDH y se expresaron en relación a la muestra control (el grupo incubado con PBS de cada línea celular). Los valores de RQ se calcularon como $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los resultados se expresan como media \pm SEM **A. NCI-H82 y B. PC-3**

Resumen Resultados Capítulo II

- Pudo demostrarse que los análogos de AVP, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP, presentan un efecto antiproliferativo y antimigratorio *in vitro* en las líneas celulares NCI-H82 y PC-3.
- El análogo [V⁴Q⁵]dDAVP presentó propiedades mejoradas con respecto al análogo dDAVP en la línea NCI-H82 de SCLC, no así en la línea PC-3 de adenocarcinoma de próstata.
- Se mostró que los análogos no tienen efecto en la línea celular de NSCLC NCI-H125 que es negativa para el V2r y no expresa marcadores de diferenciación NE.
- Se determinó que ambos análogos son capaces de regular la expresión de BAX y Bcl-2 o Bcl-xL en las líneas de próstata y pulmón promoviendo un balance pro-apoptótico.
- Se logró demostrar, a través del silenciamiento por ARNi y bloqueo del V2r por un antagonista competitivo no peptídico, que el efecto citostático del análogo [V⁴Q⁵]dDAVP es mediado específicamente por V2r.
- Se demostró que los análogos modulan la expresión de los marcadores de diferenciación NE, NSE y CgA, tanto en la línea NCI-H82 como PC-3 disminuyendo drásticamente la expresión de ambos marcadores en ambas líneas celulares.

Discusión Capítulo II

Como ya hemos mencionado, el V2r de AVP se asocia con señalización antiproliferativa, ésta señalización, como han descripto muchos autores, involucra al eje AC/AMPC/PKA, con la activación de adenilato ciclasa seguida por el incremento intracelular de AMPC [80,169-172]. Se ha demostrado que aumentos en los niveles de AMPC intracelular inhiben la proliferación celular al bloquear las señales entre dos proteínas oncogénicas claves para el desarrollo tumoral denominadas Ras y Raf-1. Concentraciones elevadas de AMPC inducen una fosforilación mediada por PKA de Raf, así inhibiendo su activación y bloqueando la cascada mitogénica [171]. Adicionalmente Naviglio *et al.* reportaron que agentes que inducen aumentos en los niveles intracelulares de AMPC en células de cáncer mamario revierten los efectos proliferativos de la leptina, una hormona que actúa como factor mitogénico y estimulador de la sobrevida en muchas estirpes de células tumorales [90]. La reversión de este efecto está caracterizada, entre otras cosas, por descensos en las concentraciones de las proteínas moduladoras del ciclo celular ciclina D1 y A y la proteína antiapoptótica, ya descripta, Bcl-2. Al modular negativamente estas proteínas las células se arrestan parcialmente en la fase G0/G1 [172] y se induce la apoptosis. Resumiendo, la estimulación del V2r, por análogos de AVP agonistas para dicho receptor, produce incrementos en AMPC que pueden desencadenar el arresto del ciclo celular y la apoptosis en numerosos tipos de células tumorales, suprimiendo así la transformación maligna.

Además de la supresión de la proliferación celular y la estimulación de la apoptosis mencionada recientemente, se ha reportado que la activación del V2r y el subsecuente aumento de AMPC que conduce a la estimulación de la vía AMPC/PKA resulta también en la inhibición de la migración y la invasión celular en diferentes tipos de tumores, como cáncer de mama y de vejiga [98,173, 174].

En este capítulo nos hemos focalizado en los efectos antitumorales vinculados a los eventos celulares claves para la progresión tumoral como la proliferación, la migración y la apoptosis. Hemos examinado el efecto *in vitro* de dDAVP y el análogo, diseñado por una aproximación racional, [V⁴Q⁵]dDAVP, sobre líneas tumorales de cáncer de pulmón y de próstata con fenotipo NE. NCI-H82 y PC-3 son líneas celulares altamente agresivas, las cuales, tal como mostramos en el capítulo I, expresan altos niveles de los marcadores de diferenciación NE, NSE y CgA, así como también presentan V2r. Como se expuso previamente, la participación de neuropéptidos en el crecimiento tumoral, especialmente en los TNE, es objeto de estudio tanto para comprender los mecanismos involucrados en la progresión del cáncer como para la búsqueda de nuevos tratamientos. Estos tumores son, en general, agresivos y resistentes a las terapias actuales. Las células de TNE expresan marcadores que pueden servir como marcadores para el diagnóstico y el seguimiento del

tratamiento. Los marcadores circulantes específicos para determinados tipos de tumores se pueden usar como la información diagnóstica y pronóstica de TNE [175], de aquí la importancia de encontrar modelos celulares que expresen estos marcadores.

Pudimos demostrar, entonces, en éste capítulo que los análogos agonistas del V2r de AVP, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP, son capaces de reducir significativamente la proliferación y la migración celular, aumentar significativamente el tiempo de duplicación y estimular la apoptosis en ambas líneas celulares humanas, NCI-H82 y PC-3. El análogo [V⁴Q⁵]dDAVP presentó un efecto mejorado, tanto en la proliferación como en la migración celular respecto al péptido parental, dDAVP, en la línea de SCLC humana NCI-H82.

El perfil antitumoral de dDAVP sobre las células PC-3 fue similar al obtenido por Sasaki *et. al*, donde se reportó la capacidad antiproliferativa y anti-invasiva de dDAVP sobre células de cáncer de próstata [176]. Cabe destacar que [V⁴Q⁵]dDAVP no presentó propiedades mejoradas comparado con el péptido parental, dDAVP, en la línea PC-3. Esto puede deberse a las características particulares de la línea que la hacen una línea altamente heterogénea. Se ha reportado que dicha línea puede sufrir transdiferenciación NE bajo ciertas condiciones [177]. Podría ocurrir que ciertas subpoblaciones de células que presentan transdiferenciación NE expresen V2r y por esta razón se observe una respuesta parcial a la incubación con la droga y debido a esto las diferencias entre análogos pueden ser más difíciles de evaluar.

Por esta razón, adicionalmente, se estudió el efecto de los péptidos en el crecimiento a baja densidad celular, en la línea PC-3, utilizando el ensayo de crecimiento clonogénico donde se cuantifican las colonias. Este método complementa el método del MTT, debido a que las condiciones son más limitantes y así el ensayo es mejor para la evaluación de nuevos agentes antitumorales [178]. Bajo estas condiciones el efecto inhibitorio de ambos análogos fue mayor que el observado en el ensayo de metabolización del MTT usando células en fase de crecimiento *log*, el análogo [V⁴Q⁵]dDAVP mostró así un mayor efecto citostático que el péptido parental dDAVP llegando a inhibir un 40% el crecimiento celular a baja densidad a altas concentraciones, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Ambos análogos presentaron un efecto sobre la regulación de la apoptosis hacia un balance pro-apotótico, ésta fue evaluada en las líneas de SCLC, NCI-H82, y de cáncer de próstata PC-3. Como ya se describió, la desregulación de la apoptosis es distintiva del cáncer y varios estudios han sugerido que la actividad de los genes antiapoptóticos es fundamental para la supervivencia celular [179], esta desregulación dependerá de la

expresión y el balance de los distintos genes de la familia Bcl-2 que contiene miembros anti-apoptóticos (como Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 y Bcl-A2) y miembros pro-apoptóticos de múltiples dominios (como Bak, Bax).

En TNE las proteínas de la familia Bcl-2 son reguladores centrales de la apoptosis intrínseca y la sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-xL se encuentran con frecuencia en múltiples tumores donde ejercen distintos roles en la supervivencia celular, el desarrollo del tumor y la resistencia a drogas, especialmente a la quimioterapia [180, 181].

Bcl-2 está sobre-expresado en los linfomas B del centro folicular, también se han detectado altos niveles de Bcl-2 en la leucemia linfocítica crónica, el linfoma difuso de células grandes B y el linfoma de células del manto; así mismo, se ha reportado en tumores sólidos como mama, sistema nervioso central, pulmón [182,183] y en líneas de carcinoma prostático entre las que se encuentra la línea PC-3 [166].

Se ha reportado que Bcl-xL está sobre-expresado en mieloma múltiple y ha sido propuesto como promotor de supervivencia de células B. Estas células son probablemente blancos de reparación por alteraciones en el ADN que pueden generar translocaciones cromosómicas como aquéllas que envuelven al oncogen c-myc. La expresión descontrolada de c-myc es una característica de las neoplasias de células plasmáticas. Se sabe que la sobreexpresión de c-myc y de Bcl-xL bajo el control del promotor de IgH conlleva al desarrollo de plasmocitoma de una manera más rápida. Bcl-xL también se ha asociado al desarrollo de resistencia terapéutica en la leucemia mieloide crónica [184]. Se ha reportado que las células NCI-H82 expresan niveles relativamente altos de la proteína c-myc, sin embargo, no expresan niveles detectables de la proteína bcl-2. Dado que se ha demostrado que bcl-2 y c-myc cooperan en la transformación celular de tal manera que bcl-2 suprime la función promotora de muerte celular de c-myc [185, 186], células como NCI-H82 deben tener algunos otros mecanismos que bcl-2 para compensar la función de promoción de la muerte celular de c-myc, para poder sobrevivir y crecer. Por lo tanto, en las células NCI-H82, algunos otros genes que son funcionalmente similares a bcl-2 podrían en realidad estar desregulados o activados. De hecho, el gen que codifica para la proteína bcl-xL ha sido identificado en ésta línea celular [167].

Aquí pudimos demostrar, si bien restan realizar algunos ensayos complementarios que refuerzan esto, que los análogos de AVP, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP regulan la expresión de las proteínas vinculadas a la apoptosis, BAX, Bcl-2 y Bcl-xL llevando a las células hacia un balance pro-apoptótico.

También hemos mostrado aquí que el nuevo análogo [V^4Q^5]dDAVP actúa vía V2r, por medio del silenciamiento y bloqueo químico del receptor con el antagonista de V2r *Tolvaptán*. Tanto el silenciamiento como el bloqueo químico redujeron drásticamente el efecto citostático observado previamente por el análogo. Estos resultados complementan los hallazgos reportados por nuestro grupo en la línea de cáncer de mama humana, MDA-MB-231 [172], y también los de Keegan *et al.* [79], donde el uso de satavapan (otro antagonista no peptídico de V2r) bloqueó de manera leve los efectos citostáticos de dDAVP sobre células de cáncer de mama humanas.

Como hemos mencionado, la diferenciación NE de tumores se ha relacionado con la TEM, adquiriendo las células de tipo epitelial un fenotipo invasivo y metastásico [187]. De modo muy interesante, luego del tratamiento *in vitro* con altas concentraciones de dDAVP, la expresión de los dos marcadores de diferenciación NE estudiados, NSE y CgA, fue reducida drásticamente en las dos líneas, NCI-H82 y PC-3. En la clínica del cáncer de próstata, la transición desde tumores primariamente andrógeno-dependientes hacia tumores hormono independientes, representa un pronóstico desfavorable para el paciente. La transdiferenciación NE es fundamental en este proceso y contribuye a la progresión tumoral y resistencia hormonal [187,188]. Adicionalmente, en cáncer de pulmón, la transformación desde NSCLC a SCLC fue asociada a pobre respuesta al tratamiento y a un aumento de NSE en suero de pacientes [60, 61]. Una reducción de la expresión de marcadores NE podría indicar desdiferenciación NE. En pacientes con cáncer, elevados niveles de CgA y NSE se correlaciona con carga tumoral, número de sitios de diseminación y pérdida de respuesta clínica, mientras que una disminución de los marcadores NE podrían indicar un mejor pronóstico [64]. Así, la capacidad de dDAVP para modular la expresión de marcadores NE en diferentes tipos de tumor constituye una interesante e importante contribución para futuros estudios.

Las líneas tumorales humanas, NCI-H82 y PC-3, representan valiosos modelos de cáncer de tipo NE recurrente y farmacorresistente [58, 64]. Esta es la primera vez que se demuestra la eficacia de estos análogos sintéticos de AVP como agentes antitumorales en SCLC. Hoy en día, las terapias dirigidas como interferón α , análogos de SST (SSA) e inhibidores de VEGF y mTOR se convirtieron en una parte integral de las terapias para tumores NE, particularmente para tumores gastroenteropancreáticos bien diferenciados y de crecimiento lento. La quimioterapia se usa para tumores poco diferenciados. El tratamiento exitoso de los TNE diseminados requiere un abordaje multimodal, la cirugía del tumor radical puede ser curativa pero rara vez es posible [25]. Por esta razón, los compuestos selectivos como dDAVP y [V^4Q^5] dDAVP, que presentan su acción biológica mediante el V2r y que

poseen, además, baja toxicidad representan candidatos interesantes como agentes antitumorales en estos tipos de tumores, habiendo mostrado aquí su efecto *in vitro* antiproliferativo, pro-apoptótico, antimigratorio y sobre la modulación de la expresión de marcadores de diferenciación NE hacia niveles más bajos vinculados a mejor pronóstico, y restando evaluarlos *in vivo* para confirmar su potencial antitumoral (ver siguiente capítulo).

Capítulo III: Estudio preclínico *in vivo* de dDAVP y el nuevo análogo [V⁴Q⁵]dDAVP sobre líneas tumorales humanas con características NE de pulmón y próstata.

Introducción Capítulo III

Tomando en consideración los antecedentes ya mencionados y los resultados del efecto de los análogos de AVP *in vitro* sobre la modulación de la expresión de marcadores NE, la proliferación celular, el tiempo de duplicación, la apoptosis y la migración celular mostrados en los capítulos I y II para las líneas de cáncer de pulmón y próstata humanas, NCI-H82 y PC-3 y habiendo demostrado la selectividad de [V⁴Q⁵]dDAVP por V2r; es que en este capítulo estudiaremos los efectos *in vivo* de los análogos tanto en el crecimiento como en la angiogénesis tumoral en ambas líneas tumorales, consideradas modelos interesantes para la búsqueda de nuevas terapias.

Crecimiento tumoral

Como ya detallamos en el capítulo II, el crecimiento tumoral depende del éxito de una secuencia de pasos, desde la malignización de las células para constituir el tumor primario hasta el escape de las mismas al torrente sanguíneo y la colonización de un sitio a distancia para la subsiguiente formación de micrometástasis o de un tumor secundario.

El SCLC se caracteriza por un rápido crecimiento, alta vascularización, desequilibrio de la apoptosis, diseminación temprana y rápida resistencia a la quimioterapia, y como ya se describió en la introducción general es un tipo de TNE-P.

El cáncer de próstata NE es un subtipo altamente agresivo de cáncer de próstata que puede surgir de *novo* o más comúnmente de diferenciación de un adenocarcinoma luego de la terapia hormonal. El adenocarcinoma de próstata (CaP) es el cáncer más común en los países occidentales y la segunda causa principal de muerte relacionadas con el cáncer en hombres [189]. A pesar de las mejoras en el diagnóstico, las técnicas quirúrgicas y los tratamientos disponibles, las tasas de supervivencia de CaP han mejorado muy poco, y la mayoría de las muertes relacionadas con CaP se deben del cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC, del inglés *castration-resistant prostate cancer*), que progresa y metastatiza después de la castración quirúrgica o médica. A menudo una manifestación tardía de CaP es el desarrollo del cáncer de próstata NE como célula pequeña o célula grande, también llamado cáncer de próstata NE relacionado con el tratamiento, éste se considera un subtipo de cáncer de próstata refractario a hormonas [190]. Se estima que hasta el 30% de los cánceres de próstata de etapa tardía presentan un predominio de diferenciación NE, además, los pacientes con metástasis viscerales de cáncer de próstata NE suelen tener altos niveles de marcadores NE, como CgA, NSE y péptido liberador de gastrina en suero [191]. La acumulación de diferenciación NE aumenta con la progresión de la enfermedad y se correlaciona con la exposición del paciente a la terapia de privación de andrógenos a largo plazo. Los estudios preclínicos también respaldan la idea de que la transformación de CaP a cáncer de próstata NE relacionado con el tratamiento es promovida por la terapia de privación de andrógenos y puede surgir como

un mecanismo de resistencia [192-194]. Dado que la terapia de privación de andrógenos promueve el desarrollo de cáncer de próstata NE, se prevé que su incidencia aumente con la introducción de nuevos y potentes agentes hormonales en el campo clínico [195].

Angiogénesis

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

La angiogénesis se puede visualizar como un proceso de brotación de nuevos vasos a partir del endotelio vascular preexistente. Dicho proceso puede dividirse en dos etapas; una de activación y otra de resolución. La fase de activación involucra: producción y secreción de factores angiogénicos; activación y proliferación de células endoteliales regulada por la asociación a pericitos y células musculares lisas; aumento en la permeabilidad vascular y deposición extravascular de fibrina; desensamblaje de la pared vascular; degradación de la membrana basal; migración e invasión celular de la MEC por parte de las células endoteliales, también regulada por los pericitos; y formación del lumen capilar. Finalmente, en la etapa de resolución, tras la reconstrucción de la MEC, el ensamblaje de la pared vascular y el reclutamiento y diferenciación de células de músculo liso, el flujo sanguíneo se establece en el vaso recién formado [196, 197].

La regulación del proceso angiogénico está dado por un balance entre moléculas que estimulan el proceso angiogénico y otras que lo inhiben. En este sentido, la migración hacia un fenotipo pro-angiogénico de determinado tejido está dada por el aumento en la biodisponibilidad de factores estimuladores de la angiogénesis. Esto introduce el concepto de “*switch* angiogénico”. En un contexto tumoral, cuando el *switch* está “apagado” los factores antiangiogénicos predominan, en cambio cuando el balance se vuelca levemente hacia agentes activadores del proceso angiogénico y el *switch* se “enciende”, una corona vascular se desarrolla alrededor del foco tumoral, irrigándolo con nutrientes y favoreciendo su crecimiento y diseminación [196].

Angiogénesis inducida por tumor

El crecimiento tumoral requiere de manera imprescindible del establecimiento de una vasculatura por medio de la cual puedan llegar a las células los nutrientes y el oxígeno, y a través de la cual eliminar los productos de desecho. La hipoxia es un fenómeno que sucede

rápidamente en el desarrollo de un foco tumoral debido, principalmente, a la alta tasa proliferativa de las células que lo componen. Bajo estas condiciones, los tumores pueden permanecer en estado latente meses e incluso años hasta que una subpoblación adquiere la capacidad de inducir angiogénesis. Ante el *switch* proangiogénico el tumor entonces es capaz de expandir su tamaño y obtiene también una ruta de escape para diseminarse a otros órganos. Mientras las células tumorales no sean capaces de inducir la formación de nuevos vasos, la masa tumoral no alcanzará un tamaño mayor a 1-1.5 mm de diámetro [198]. El *switch* angiogénico puede ocurrir en diferentes etapas del desarrollo tumoral dependiendo del tipo tumoral que se trate y el ambiente que lo rodea. Algunas lesiones pre-malignas son capaces de inducir angiogénesis y este evento permite la progresión de la enfermedad.

La vascularización que induce un tumor ocurre principalmente mediante el mecanismo de angiogénesis. Sin embargo, existen evidencias recientes que indican que algunos tumores son capaces de reclutar células precursoras endoteliales desde la médula ósea en un proceso que simula el proceso vasculogénico, es decir la formación de primordios vasculares de *novο* [199]. Los factores involucrados en la estimulación de este proceso son el VEGF-A, el factor de crecimiento de placenta, el factor derivado del estroma (SDF-1/CXCL12) y la angiopoietina-1 (Ang-1) [200]. El microambiente tumoral también posee un papel importante en la diferenciación del fenotipo vascular. Por otro lado, se ha demostrado recientemente que las células endoteliales *per se* pueden secretar ciertas quemoquinas que reclutan del lecho vascular a células precursora endoteliales para ser incorporadas a los nuevos vasos en crecimiento [201, 202]. El proceso neoangiogénico tumoral no presenta diferencias en las características generales con el proceso fisiológico normal. La asociación de nuevos pericitos al vaso formado culmina con el proceso angiogénico en condiciones fisiológicas, ya que este evento reduce la dependencia de las células endoteliales al VEGF secretado por el organismo. Sin embargo, la pobre asociación de los pericitos en la angiogénesis tumoral puede explicar la continua estimulación del proceso.

Sin embargo, la fuente de los inductores angiogénicos y la sobreestimulación por parte del tumor y el microambiente tumoral dan como resultado una vasculatura poco organizada y disfuncional. La inducción del factor de crecimiento VEGF-A por parte del tumor puede, por sí solo, iniciar el proceso angiogénico en una vasculatura quiescente. Este agente proangiogénico promueve la dilatación de los vasos e incrementa la permeabilidad permitiendo que las proteínas plasmáticas se filtren a través de los vasos y se depositen sirviendo de matriz provisoria para que las células endoteliales activadas puedan migrar. Este paso es acompañado por la pérdida del recubrimiento de los pericitos, proceso mediado por angiopoietina-2, que presenta su receptor del tipo tirosina quinasa

selectivamente en células endoteliales [203]. La membrana basal y la MEC deben ser degradadas para permitir la migración de las células endoteliales. A medida que esto ocurre las células endoteliales forman una columna de migración, proliferan y se produce la diferenciación endotelial, donde las células cambian su forma y se adhieren unas a otras formando el lumen tubular. Los tumores expresan varios factores pro-angiogénicos. Aunque el FGF fue el primero en ser descubierto, VEGF-A es el más ubicuo. La mayoría de los tumores también son capaces de secretar VEGF-C y VEGF-D, los cuales se unen al receptor VEGFR2 y activan vías estrechamente cercanas a VEGF-A.

Los vasos sanguíneos que se producen en los tumores por la activación crónica de la angiogénesis suelen ser aberrantes, estando marcados por la rápida velocidad en que se forman, siendo distorsionados, con excesiva ramificación, un flujo de sangre errático y presentan microhemorragias, permeabilidad y niveles anormales en la proliferación y apoptosis de las células endoteliales (Fig. C3.1).

Figura C3.1

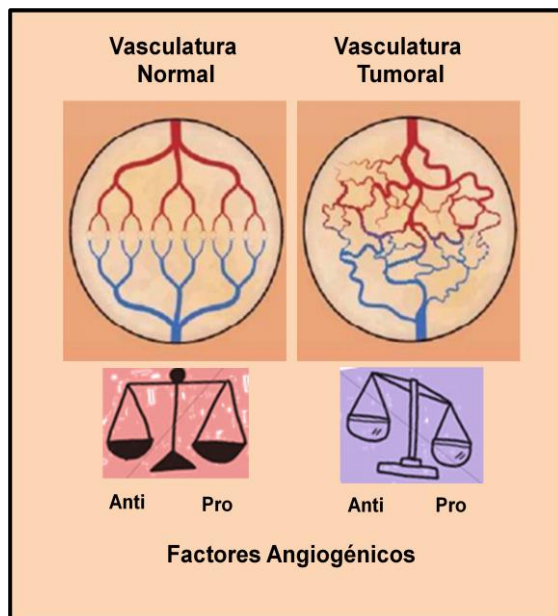


Figura C3.1 Esquema de la vasculatura normal y tumoral. Rojo: sistema arterial. Azul: sistema venoso.

Adaptado de Jain y Carmeliet 2012 [204].

Datos clínicos indican una clara correlación entre la angiogénesis y la agresividad, el crecimiento y la diseminación tumoral. Históricamente, la angiogénesis fue considerada sólo importante cuando los tumores macroscópicos ya habían crecido, pero los datos posteriores indicaron que también contribuye a la fase microscópica premaligna de la progresión neoplásica. En algunos tipos de cáncer, como cáncer de próstata por ejemplo, los primeros eventos moleculares que determinan el encendido del “switch angiogénico” no se conocen, probablemente porque ocurren antes que pueda establecerse el diagnóstico clínico de la enfermedad [205].

Terapias antiangiogénicas

La inhibición de la angiogénesis es una atractiva estrategia terapéutica en oncología. Su rol fundamental en la patogénesis de la progresión maligna se destaca por las mejoras clínicamente relevantes en la supervivencia libre de enfermedad y la tasa de respuesta global reportadas en ensayos clínicos fase III de varias neoplasias malignas, así los agentes antiangiogénicos se han convertido en una parte esencial de las terapias para muchos tumores sólidos. Existen varias evidencias que sugieren que la angiogénesis en SCLC tiene un papel fundamental en la determinación de la tasa de crecimiento, invasividad y desarrollo de metástasis. Además, se considera que la formación de nuevos vasos sanguíneos estructural y funcionalmente anómalos desde los vasos preexistentes es un proceso mediador de la resistencia a la quimioterapia [206, 207].

Debido al rol central que juega el VEGF en el proceso de angiogénesis, este ligando y sus receptores han sido un blanco muy atractivo para la investigación oncológica y el desarrollo de nuevas terapias dirigidas. Así como en la mayoría de tumores sólidos, en los TNE-GEP la sobreexpresión de VEGF se ha relacionado con un estadio más avanzado de la enfermedad y con un peor pronóstico [208]. También en SCLC, la densidad de microvasculatura se ha correlacionado con los niveles de VEGF y un aumento del recuento de microvasos se ha considerado un factor pronóstico adverso en pacientes con SCLC tratados con cirugía y quimioterapia adyuvante [209].

Algunas de estas terapias antiangiogénicas incluyen anticuerpos monoclonales dirigidos contra VEGF, como bevacizumab, y pequeñas moléculas capaces de inhibir los receptores tirosina quinasa de VEGF tales como *sunitinib*® utilizado principalmente en tumores pancreáticos avanzados. Actualmente el avance de los estudios de sunitinib se está desarrollando en TNE-GEP para evaluar su actividad en combinación con SSA.

Como ya hemos mencionado, los análogos de AVP agonistas del V2r inducen la producción mediada por el tumor de angiotatina, un potente agente antiangiogénico [210], reportado en cáncer de mama por nuestro laboratorio [89]. De este modo dDAVP, y los análogos selectivos para el V2r, inducirían un efecto dual, por un lado angiostático y por otro antimetastático, rompiendo el diálogo entre las células tumorales y endoteliales durante la progresión tumoral [96], representando de éste modo interesantes candidatos como agentes para el tratamiento de TNE.

En este capítulo se contrastará parte de las siguientes hipótesis:

-Si V2r, uno de los subtipos de receptores de la superfamilia de GPCR de la hormona neuropeptídica altamente conservada AVP, **está asociado a efectos**

antitumorales, y está presente en TNE y tumores con transdiferenciación NE, entonces los análogos de AVP agonistas de V2r **tendrían un efecto antitumoral** en dichos tumores.

-Si los análogos peptídicos de AVP, agonistas de V2r, activan una respuesta en las células de TNE que expresan dicho receptor, que lleva a reducir la proliferación y la migración celular, favorecer la producción de efectores antiangiogénicos, estimular la diferenciación celular, y reducir el crecimiento tumoral; entonces éstos análogos constituirían posibles terapias para dichos tumores con características NE agresivos y con pocas alternativas terapéuticas.

Objetivos Específicos Capítulo III

- Estudiar los efectos de los análogos, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre el crecimiento tumoral en modelos de xenotransplante de las líneas celulares humanas, NCI-H82 y PC-3, en ratones atímicos.

- Estudiar los efectos de los análogos, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la angiogénesis y agresividad tumoral en un modelo de xenotransplante de la línea celular humana NCI-H82 en ratones atímicos.

-

Progresión tumoral de xenotransplantes en ratones inmunocomprometidos

Las células de adenocarcinoma prostático PC-3 fueron cultivadas hasta semiconfluencia y cosechadas por tripsinización. Luego 3×10^6 células en 0,3 ml RPMI 1640 y fueron inoculadas en el flanco derecho de ratones atímicos por vía s.c. y se dejó progresar el tumor. Con las células NCI-H82 el procedimiento fue similar pero se inocularon 1×10^5 células en 150 μ l RPMI 1640 más 150 μ l de *matrigel*® (1:1 relación medio *matrigel*®) en el flanco derecho de los ratones.

Los animales fueron monitoreados mediante palpación periódica. El diámetro mayor y menor perpendicular del tumor fue medido con calibre 3 veces por semana y el volumen tumoral fue determinado mediante la fórmula: $\pi/6 \times \text{diámetro mayor} \times \text{diámetro menor}^2$. Al día 35 para PC-3, tras palpar los primeros focos tumorales, los animales fueron tratados con 3 dosis semanales de 0,3 μ g/kg i.v. de dDAVP o [V^4Q^5]dDAVP durante 38 días (Fig. C3.2). Los ratones inoculados con NCI-H82 fueron tratados desde el día 5 pos inoculación, por su rápido prendimiento, 3 veces por semana durante 20 días con la misma dosis de análogos (Fig. C3.3). El protocolo finalizó cuando el promedio del tamaño tumoral en algún grupo superó los 1200 mm³. Los animales al finalizar el protocolo fueron sacrificados por dislocación cervical. Las piezas tumorales fueron conservadas en formalina 10% en PBS para posteriores estudios histopatológicos.

Figura C3.2

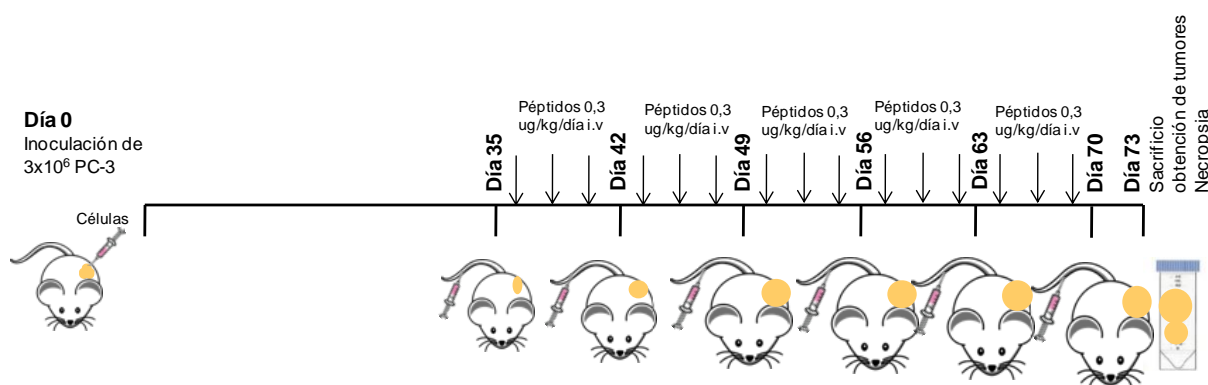


Figura C3.2 Esquema de tratamiento de ensayo de crecimiento tumoral subcutáneo en la línea de cáncer de próstata humana PC-3: 3×10^6 células PC-3 fueron inoculadas de en el subcutis de ratones nude con tratamiento de los análogos a partir del día 35 posinoculación de las células tres veces por semana (0,3 μ g/kg) por 4 semanas.

Figura C3.3

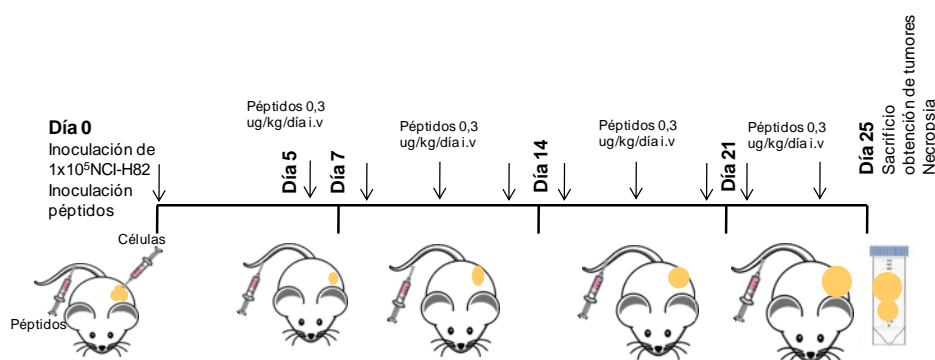


Figura C3.3 Esquema de tratamiento de ensayo de crecimiento tumoral subcutáneo en la línea de SCLC humana NCI-H82: 1×10^5 células NCI-H82 con matrigel fueron inoculadas de en el subcutis de ratones nude. El tratamiento con los análogos comenzó el día 5 pos inoculación de las células y se realizó tres veces por semana (0,3 $\mu\text{g/kg}$) por 25 días.

Angiogenesis in vivo

Se evaluó la angiogenesis inducida por las células tumorales mediante el ensayo de implante de *Matrigel*[®] modificado. Para llevar a cabo dicho ensayo se mezclaron 200 μl de *Matrigel*[®] en hielo con heparina (50 U/ml) y 1×10^5 células NCI-H82 en 100 μl de RPMI 1640. La heparina favorece la unión de distintos factores de crecimiento endotelial y sus respectivos receptores, tal como es el ejemplo de VEGF y el VEGFR [197]. La mezcla de *Matrigel*[®] fue inoculada vía subcutánea en el flanco derecho de ratones atímicos macho nu/nu usando jeringas en hielo para evitar la polimerización del *Matrigel*[®]. Los animales fueron sacrificados utilizando una cámara de monóxido de carbono a los 15 días pos inyección. Las piezas de *Matrigel*[®] fueron recuperadas, pesadas, fotografiadas y homogeneizadas en 300 ml de buffer de lisado RBC (por sus siglas en inglés *Red Blood Cell*). Luego su contenido de hemoglobina fue determinado mediante el *kit* de Drabkin (Sigma). El grupo de animales tratados con los análogos sintéticos dDAVP o $[\text{V}^4\text{Q}^5]\text{dDAVP}$ recibió una dosis de 0.3 $\mu\text{g/kg/día}$ o 1 $\mu\text{g/kg/día}$ por vía endovenosa, media hora antes de la inoculación del *Matrigel*[®] con las células tumorales y 3 veces por semana hasta el día 15 pos desafío (Fig. C3.4).

Figura C3.4

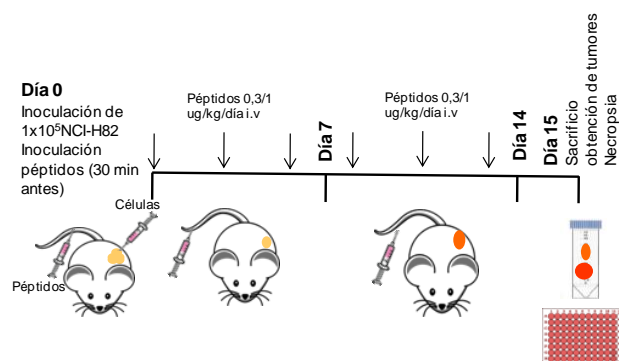


Figura C3.4 Esquema de tratamiento de ensayo de angiogénesis *in vivo*.

Inoculación de células NCI-H82 en el subcutis de ratones nude con tratamiento de los análogos 30 minutos antes de la inoculación de la células y luego tres veces por semana (0,3 μ g/kg) por 15 días.

Tratamientos

Los animales tratados con los análogos dDAVP o $[V^4Q^5]$ dDAVP recibieron dosis de 0.3-1 μ g/kg/día por vía endovenosa. Dicho rango de dosis posee relevancia clínica con efectos hemostáticos ampliamente reportados en humanos [211,212,213], y con propiedades antitumorales reportadas en modelos preclínicos murinos y ensayos clínicos veterinarios en caninos [88,214,215]. dDAVP puede inducir taquifilaxis si es administrada diariamente [71]. Es por esto que en tratamientos que se extienden por más de 5 días, los análogos fueron administrados respetando un esquema de 3 dosis semanales. El grupo control recibió solo el vehículo salino.

Resultados Capítulo III

Efecto de los análogos, dDAVP y [V4Q5]dDAVP sobre el crecimiento tumoral en modelos de xenotransplante de las líneas celulares humanas, NCI-H82 y PC-3, en ratones atímicos.

Se estudiaron los efectos *in vivo* de los compuestos en NCI-H82 y PC-3. Se evaluaron dos modelos heterotópicos para las líneas antes mencionadas, inyectando las células en el subcutis para determinar la progresión tumoral (1×10^5 células NCI-82 con matrigel 1:1 y 3×10^6 PC-3 sin matrigel). Una vez puesto a punto se evaluaron los análogos (0.3 $\mu\text{g/kg}$ -3 veces por semana) observándose una inhibición del crecimiento tumoral de un 40% y un 35% para ambos análogos para NCI-H82 (Fig. C3.5 y C3.6) y PC-3 respectivamente (Fig. C3.7 y C3.8).

Figura C3.5

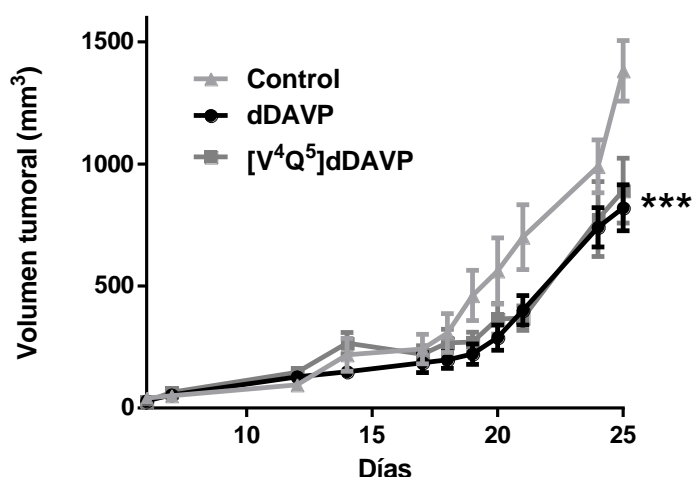


Figura C3.5. Progresión tumoral de la línea de pulmón humana NCI-H82: Ratones *nu/nu* fueron inyectados en el subcutis del flanco derecho con 1×10^5 células NCI-H82 en 150 μl de medio y 150 μl matrigel. Los ratones fueron tratados tres veces por semana (a partir del día 5 pos inoculación de células) con 0,3 $\mu\text{g/kg}$ de los análogos. Los tumores fueron medidos con calibre tres veces por semana. Los valores representan media \pm SEM (n=10 por grupo). ANOVA de medidas repetidas con corrección de Geisser-Greenhouse para supuesto de esfericidad **p<0.01***p<0.001.

Figura C3.6

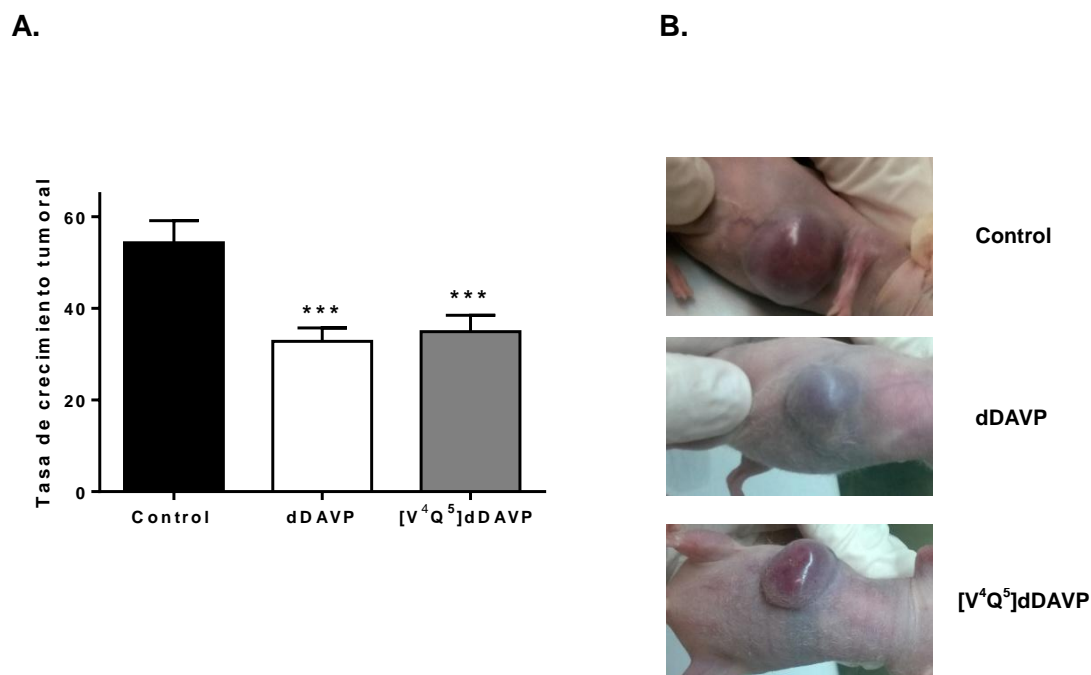


Figura C3.6. Progresión tumoral de la línea de pulmón humana NCI-H82: A. Tasa de crecimiento tumoral al día 25. ANOVA simple contrastado con Tukey*** $p < 0.001$. Los valores representan media \pm SD. B. Fotos representativas de los tumores al día 25.

Figura C3.7

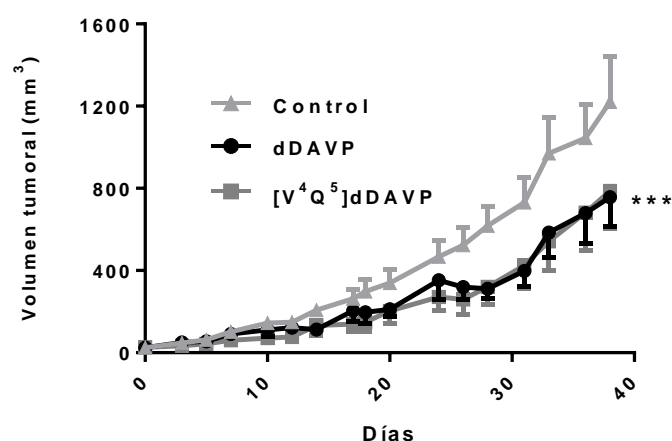


Figura C3.7. Progresión tumoral en la línea de cáncer de próstata humana PC-3: Ratones *nu/nu* fueron inyectados en el subcutis del flanco derecho con 3×10^6 Células PC-3 sin matrigel en 300 μ l de RPMI. Los ratones fueron tratados tres veces por semana a partir del día 35 pos inoculación de células con 0,3 μ g/kg de los análogos. Los tumores fueron medidos con calibre tres veces por semana. Los valores representan media \pm SEM ($n=10$ por grupo). El inicio del gráfico (día 0) se corresponde con el primer día de inoculación del tratamiento (día 35 pos inoculación de las células tumorales). ANOVA de medidas repetidas con corrección de Geisser-Greenhouse para supuesto de esfericidad ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Figura C3.8

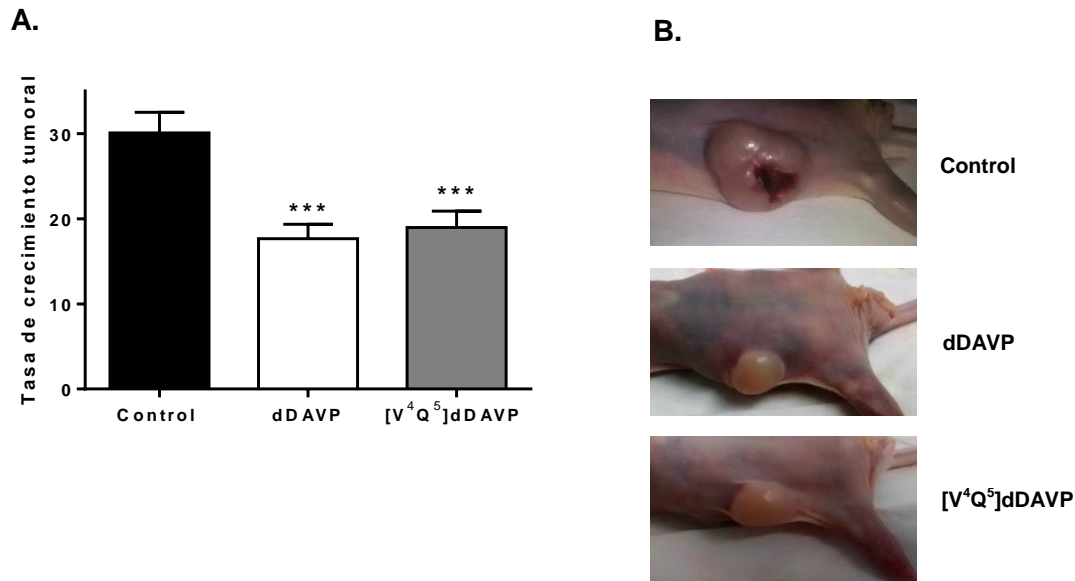


Figura C3.8. Progresión tumoral en la línea de cáncer de próstata humana PC-3: **A.** Tasa de crecimiento tumoral al día 38 pos tratamiento (día 73 pos inoculación). Los valores representan media \pm SD. ANOVA contrastado con Tukey *** $p < 0.001$. **B.** Fotos representativas de los tumores al día 38 pos tratamiento (día 73 desde la inoculación de las células).

Efecto de los análogos, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre la angiogénesis tumoral en un modelo de xenotransplante de la línea celular humana NCI-H82 en ratones atímicos.

Para estudiar el efecto antiangiogénico de los análogos dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP *in vivo* se realizó el ensayo de *plug* de *Matrigel*® para luego cuantificar la formación de vasos por medición de hemoglobina y número de vasos que irrigaban el *plug*. Como puede observarse en la figura C3.9A, ambos análogos a una dosis de 1 $\mu\text{g/kg/día}$ reducen la angiogénesis (hemoglobina en tumor) en un 40%, así como también disminuye la cantidad de vasos que irrigan el tumor en un 50% respecto al control tratado con PBS (Fig. C3.9B).

Figura C3.9

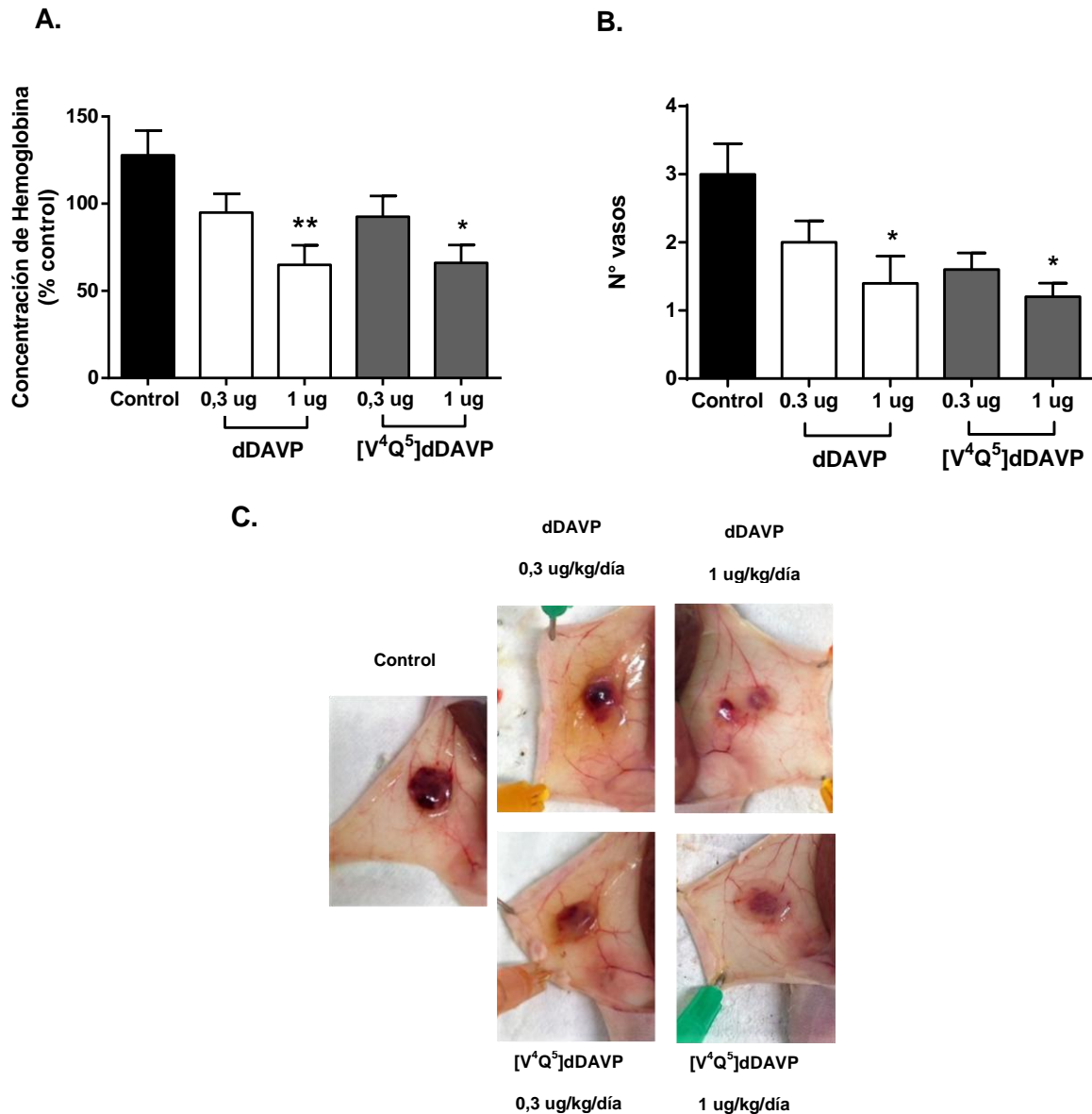


Figura C3.9. Evaluación del efecto de los análogos sobre la angiogénesis en la línea NCI-H82. Ensayo de Plug de matrigel®: 1×10^5 células NCI-H82 fueron inoculadas en el subcutis del flanco derecho de ratones atímicos (1:2 RPMI con células/matrigel, volumen final 200 μ L). El tratamiento se realizó media hora antes de inocular las células y durante 7 días (3 veces por semana; dosis: 0.3 ug/kg y 1 ug/kg). **A.** Los tumores fueron fotografiados y retirados para ser procesados con buffer de lisis y reactivo de drabkin para medir el contenido de hemoglobina a una absorbancia de 405 nm. El contenido de hemoglobina está expresado como % de control. Los valores representan media \pm SEM. ANOVA simple contrastado con Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (dosis de análogos vs. Control) **B.** Los vasos grandes que irrigaban el tumor fueron contados de las fotografías. Los valores representan la mediana \pm Rango intercuartil. Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn * $p < 0.05$ (dosis de análogos vs. Control). **C.** Fotografías representativas.

Resumen Resultados Capítulo III

- Se logró un modelo xenogénico satisfactorio para evaluar el efecto *in vivo* de los compuestos en las línea tumoral humana NCI-H82.
- Se logró un modelo xenogénico satisfactorio para evaluar el efecto *in vivo* de los compuestos en las línea tumoral humana PC-3.
- Los análogos, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP mostraron una inhibición del crecimiento tumoral similar en ambas líneas.
- Se generó un modelo *in vivo* para evaluar angiogénesis en la línea NCI-H82 con resultados satisfactorios, ambos análogos inhibieron la angiogénesis.

Discusión Capítulo III

En este capítulo se exploraron los efectos *in vivo* de los análogos selectivos del V2r, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre las líneas tumorales agresivas humanas NCI-H82 y PC-3. La inyección intravenosa de dosis clínicamente relevantes de ambos análogos provocó una importante reducción del volumen tumoral comparado con el grupo control tanto en el modelos de SCLC como en el de adenocarcinoma prostático hormono independiente con características NE. En consistencia con los resultados *in vitro*, los tumores tratados con los análogos presentaron una tasa de crecimiento significativamente menor (35%) comparada con la de los tumores tratados con el vehículo. Bajo estas condiciones experimentales, el análogo [V⁴Q⁵]dDAVP no mostró un mayor efecto que el péptido parental a diferencia de los observado *in vitro* y en otros modelos de cáncer, como cáncer de mama [172]. Esto podría deberse a que los tumores agresivos tales como los de SCLC y de cáncer de próstata hormono independiente de rápida expansión y tasa de crecimiento elevada demanden mayores dosis para mostrar diferencias significativas entre compuestos. Se requieren futuros estudios *in vivo*, sobre todo de evaluación de dosis para poder arribar a alguna conclusión.

Por otro lado se evaluó el efecto de los análogos sobre la angiogénesis inducida por tumor, pudiendo determinarse que ambos análogos presentan actividad antiangiogénica en los dos modelos estudiados a dosis de 1 µg/kg/día, reduciendo en un 40% el contenido de hemoglobina en el tumor. Como ya se ha mencionado, los análogos de AVP agonistas del V2r presentan, entre otros efectos, un efecto antiangiogénico *in vivo*, el cual dependería, al menos en parte, de la presencia del V2r en las células tumorales y de la modulación de su diálogo con el endotelio vascular debido a la liberación de angiostatina por las mismas [89]. La actividad antiangiogénica se explicaría parcialmente por éste mecanismo y estaríamos reconfirmando, con los resultados arrojados aquí, el mecanismo de los análogos de AVP agonistas del V2r sobre las células tumorales. Recordemos que además, los péptidos también actuarían sobre las células del endotelio vascular generando una rápida liberación sistémica de factores hemostáticos y profibrinolíticos. Es así, que la administración sistémica de dDAVP induce una liberación rápida de FVW mediante la estimulación del V2r presente en la microvasculatura. El FVW es una gran glicoproteína multimérica plasmática que despliega un rol central en la homeostasis. Este factor actúa como proteína transportadora del FVIII y media la adhesión plaquetaria a las células endoteliales [217].

Como ya se mencionó el crecimiento de una masa tumoral necesita establecer un lecho vascular que le permita a las células neoplásicas nutrirse, acceder a oxígeno y eliminar sus productos de desecho para poder crecer y diseminarse. Es así que la capacidad de inducir la formación de nuevos vasos determina la malignidad y permite a las

células tumorales colonizar órganos distantes. Como consecuencia, la modulación del proceso angiogénico se ha convertido en una de las estrategias terapéuticas más estudiadas con el fin de limitar la progresión tumoral [216]. Representando así, compuestos capaces de modular biológicamente factores angiogénicos, como los agonistas del V2r, herramientas terapéuticas muy interesantes tanto como agentes únicos, así como también agentes con posibilidades de combinación con otros tratamientos.

Tanto la línea NCI-H82 como la línea PC-3, representan modelos tumorales NE de droga-resistencia y enfermedad recurrente muy valiosos [58, 59, 62]. El SCLC es un tipo de tumor raro y agresivo, pero en aumento, que presenta características NE. Incluso cuando es tratado inicialmente con quimioterapia y radioterapia, el SCLC eventualmente desarrolla resistencia al tratamiento y los pacientes con enfermedad avanzada tienen una mediana de supervivencia de menos de 12 meses [218]. Se ha detectado cierta plasticidad en las células de SCLC, que antes se consideraban homogéneas, encontrándose variantes celulares como es el caso de la línea aquí utilizada, NCI-H82. Las líneas variantes (~ 10-20%) mostraron diferentes comportamientos *in vitro* e *in vivo* (xenoinjerto), distintos patrones de crecimiento, morfologías diversas y relativa resistencia a la terapia estándar [219]. Muchas de las líneas variantes se establecieron a partir de tejido tumoral obtenido de pacientes en recaída [220]. Al igual que lo que ocurre con tumores de próstata luego del tratamiento de privación hormonal, un problema central para el tratamiento de SCLC es la resistencia a la quimioterapia que ocurre invariablemente después de la terapia, tendiendo a mostrar sensibilidad intrínseca o resistencia multimedicamentosa [221]. Es necesario comprender los mecanismos que causan resistencia a la quimioterapia, así como resistencia a múltiples fármacos. Tales esfuerzos dependerán en gran medida de una mejor comprensión de la biología molecular de SCLC en el diagnóstico inicial y en el momento de la recaída. Suele haber respuesta inicial de SCLC a la terapia citotóxica pero ésta respuesta frecuentemente es de corta duración, y los tumores recurrentes son casi siempre multirresistentes [222]. Una comprensión de los mecanismos de la resistencia a drogas será esencial para desarrollar nuevos enfoques terapéuticos.

Independientemente del estado, el pronóstico actual para pacientes con SCLC es poco satisfactorio a pesar de las mejoras en el diagnóstico y la terapia desarrolladas durante los últimos 25 años debido a que este tipo de tumor tiende a diseminarse y a menudo presenta síntomas poco específicos [223]. Hoy en día, como ya hemos descrito en la introducción general, las terapias dirigidas para NET GET bien diferenciados y de crecimiento lento son interferón, SSA, inhibidores de VEGF e inhibidores de mTOR, mientras que para los tumores NE pobremente diferenciados y progresivos como SCLC solo existe la

quimioterapia y radioterapia, con la subsecuente resistencia generada en un gran porcentaje de los tumores tratados [25], evidenciando así, la urgente necesidad de nuevas aproximaciones terapéuticas para este tipo de tumor.

Es así que los análogos estudiados aquí constituyen interesantes alternativas para el tratamiento de éstos tipos de tumores. Se deben tener en cuenta a la hora de avanzar con los estudios de éstos análogos peptídicos de la AVP, aspectos como los síndromes paraneoplásicos, particularmente, el Síndrome de Secreción Inadecuada de Hormona Antidiurética (SIAH) ya que esto podría presentar un problema a la hora de tratar con éstos análogos a pacientes. Ambos análogos deberían administrarse solo bajo un control estricto del nivel de sodio sérico del paciente y de la ingesta y producción de líquidos para evitar las complicaciones asociadas a la hiponatremia y también se debería prestar atención al riesgo de acumulación de líquido en tejidos. Debe tenerse en cuenta el riesgo de hiponatremia, particularmente en pacientes mayores que reciben soluciones hipotónicas o dosis frecuentes y repetidas del análogo. También se recomendaría precaución en niños pequeños [212,213].

En éste sentido debemos tener en cuenta que a partir de la actividad antitumoral reportada en modelos preclínicos de cáncer de mama, mencionada previamente [88,89,91,92,93], nuestro grupo ha realizado un ensayo clínico prospectivo abierto de fase II donde se evaluó el uso perioperatorio de dDAVP en pacientes con cáncer de mama (NCT01606072) obteniendo resultados satisfactorios en cuanto a seguridad, disminución del sangrado y efectos antitumorales preliminares (reducción de CTC a las 24 horas pos cirugía) [224]. Todos los criterios de exclusión de nuestro ensayo clínico de fase II se tendrán en cuenta para cualquier consideración futura de ensayo clínico para $[V^4Q^5]dDAVP$. Éstos criterios de exclusión incluyeron embarazo o lactancia, tratamiento hormonal, hipersensibilidad conocida a dDAVP o AVP, enfermedad de von Willebrand grave o hemofilia, SIAH, insuficiencia renal o hiponatremia, diabetes tipo I o II, entre otros.

Los estudios farmacológicos / toxicológicos para el nuevo análogo $[V^4Q^5]dDAVP$ se llevaron a cabo previamente a la evaluación del compuesto *in vivo*. Este consistió en el estudio de toxicidad aguda en ratas *Wistar*, con el fin de evaluar los efectos adversos del compuesto. Así, se realizó la evaluación clínica completa de los animales incluyendo, ritmo cardíaco y respiratorio, sistema nervioso, actividad motriz, parámetros bioquímicos y hematológicos. La administración fue vía i.v. utilizando dosis de 1, 10 y 100 $\mu g/kg$ de dDAVP o $[V^4Q^5]dDAVP$, no encontrándose diferencias importantes entre el análogo $[V^4Q^5]dDAVP$ y dDAVP en dosis hasta 300 veces mayores que las que producen un efecto antitumoral *in vivo* [172].

En su conjunto, los resultados obtenidos en éste capítulo muestran los primeros indicios preclínicos *in vivo* del efecto de los análogos de AVP, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre líneas tumorales con características NE. Éstos hallazgos no sólo son muy interesantes sino que resultan muy alentadores en lo referente a la búsqueda de posibles terapias para éste tipo de tumores, aportando, por un lado, valiosos modelos de TNE agresivos para el estudio de fármacos y por otro constituyendo el inicio para el desarrollo preclínico de los compuestos antitumorales dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP para éste tipo de enfermedad

Conclusiones y perspectivas

Como se ha mencionado vastamente, la señalización autócrina y parácrina a través de compuestos como neuropéptidos es fundamental para el crecimiento tumoral en general, y más aún en los TNE. Las células tumorales de los TNE comparten la función común de secretar hormonas polipeptídicas de bajo peso molecular y aminas biogénicas. La expresión de marcadores NE y sus receptores están involucrados en el desarrollo y progresión tumoral y han sido utilizados como biomarcadores para el diagnóstico así como también como blancos para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas. Si bien los TNE son raros, su interés radica en su heterogeneidad, su agresividad, su resistencia a las terapias actuales y el aumento de su incidencia en los últimos años, lo que los convierte en tumores con pocas posibilidades terapéuticas actualmente. A esto debemos sumarle que los síntomas a menudo son inespecíficos lo que hacen que su detección sea en general tardía.

En la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos, péptidos sintéticos análogos de neuropéptidos naturales como la AVP con propiedades reguladoras de eventos claves para la progresión tumoral, probadas en algunos tipos de cáncer, y con acción sobre factores de la hemostasia, resultan candidatos interesantes para su estudio como posibles compuestos para el tratamiento de TNE.

En esta tesis, se examinó el impacto de la estimulación selectiva del V2r de AVP a través de análogos agonistas de dicho receptor como dDAVP y el nuevo análogo, diseñado mediante estudios de SAR sobre el péptido de primera generación dDAVP sobre células de SCLC NCI-H82, [V⁴Q⁵]dDAVP, pudiendo aportar información a la ya reportada [225, 226] para el conocimiento de las posiciones claves para la interacción con el V2r.

Por otro lado se desarrolló y evaluó otro nuevo análogo a partir de una perspectiva evolutiva que nos llevó a diseñar un análogo del péptido encontrado en insectos: INT, denominado dDINT. Si bien éste análogo no mostró efecto antitumoral en SCLC, este análisis arrojó información interesante constituyendo la base para futuros estudios de neuropéptidos derivados de insectos u otros animales para el desarrollo de nuevos análogos. Por otro lado, el análisis evolutivo y el análisis de las funciones de los péptidos tipo AVP en el reino animal nos permitió pensar que los análogos podrían estar afectando la diferenciación celular y esto nos llevó al análisis de la modulación de los marcadores de diferenciación NE por lo análogos en las líneas estudiadas, mostrando de éste modo que el análisis de funciones en la naturaleza podría disparar nuevas e interesantes interpretaciones fisiológicas.

También se estudió el efecto de los análogos agonistas específicos de V2r, dDAVP y [V⁴Q⁵] dDAVP, sobre eventos celulares claves relacionados a la progresión tumoral en dos

líneas celulares humanas con características NE de cáncer de pulmón y de próstata. Se demostró que ambos análogos muestran capacidad antitumoral, tanto *in vitro* como *in vivo*, en estos modelos tumorales. Si bien la comprensión del mecanismo involucrado en la vía de señalización de V2r no está completa, nuestros hallazgos muestran el beneficio potencial de estos compuestos en los tumores agresivos con fenotipos NE, aunque es necesario continuar con los estudios vinculados a los mecanismos de acción de los péptidos.

Dada la agresividad de la enfermedad y la urgente necesidad de enfoques terapéuticos novedosos, los estudios realizados y los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, en el modelo de SCLC humano: NCI-H82, y en el modelo de cáncer de próstata agresivo con rasgos NE: PC-3, constituyen el puntapié inicial para el desarrollo preclínico de éstos análogos de AVP, agonistas del V2r en éstos tipos de cáncer, representando hallazgos que no sólo contribuyen a la búsqueda de posibles terapias para los TNE, sino que también, arrojan valiosos modelos de enfermedad de alta recurrencia y resistencia a fármacos.

Creemos que la búsqueda y caracterización funcional de análogos de AVP desde fuentes naturales en combinación con el diseño racional basado en SAR y estudios computacionales puede ser una estrategia adecuada para el desarrollo de medicamentos selectivos para el tratamiento de enfermedades humanas como los TNE agresivos con pocas alternativas terapéuticas.

El reto restante consiste en optimizar y combinar la información obtenida por cada metodología para lograr un producto superador. Debemos avanzar tanto en los estudios preclínicos como en las investigaciones del mecanismo de acción de dDAVP y el análogo $[V^4Q^5]$ dDAVP ya que los resultados presentados en esta tesis son prometedores como posibles terapias dirigidas para éstos tipos de tumores.

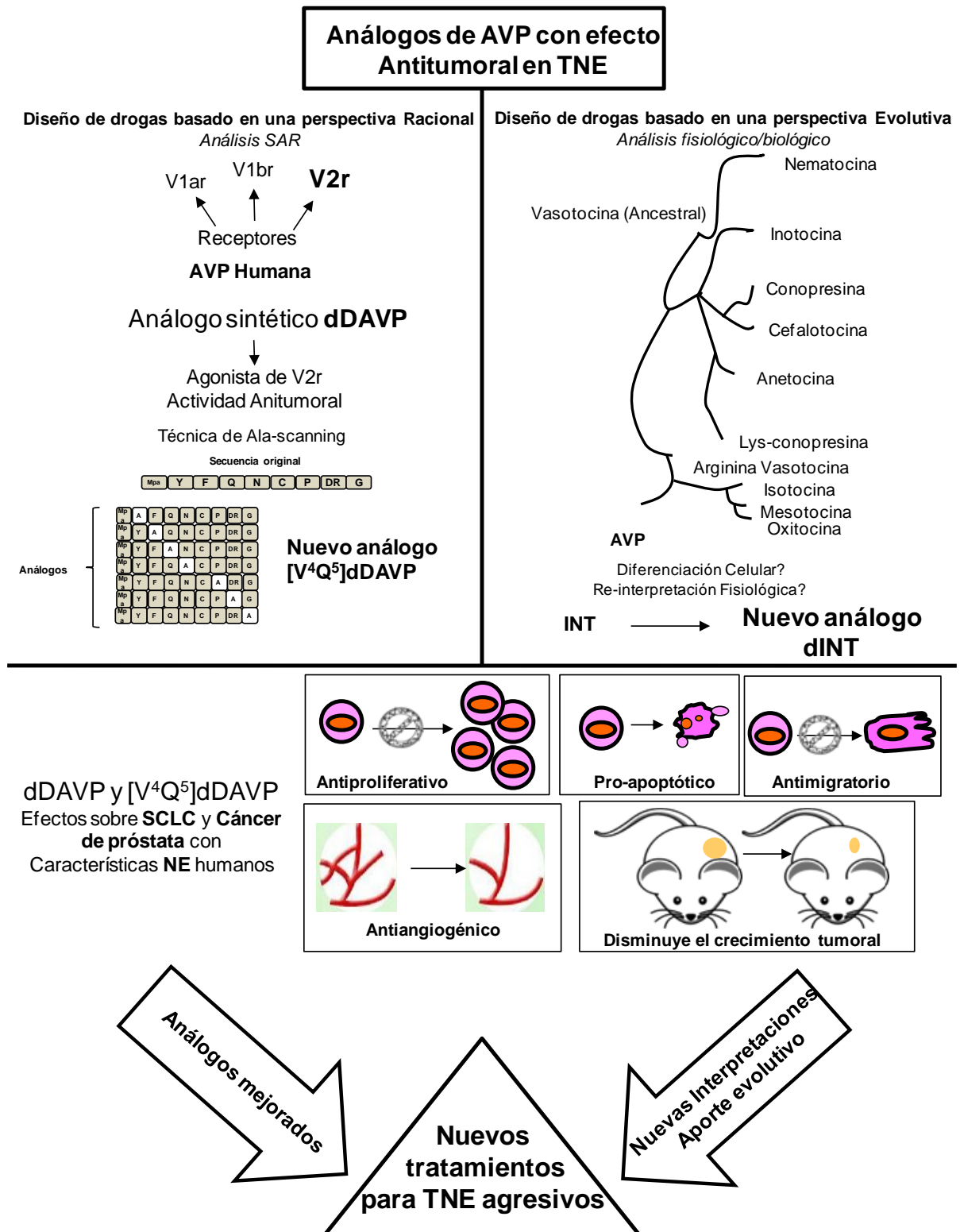
Resumen, esta tesis ha contribuido al estudio de nuevos análogos de AVP agonistas del V2r como potenciales tratamientos para TNE con poca alternativas terapéuticas:

- Se determinó la presencia del V2r y de los marcadores NE, CgA y NSE en una línea de SCLC y en una línea de adenocarcinoma de próstata agresiva humanas, encontrando de este modo dos modelos tumorales con características NE para el estudio de los análogos selectivos del V2r del neuropéptido AVP.

- Se demostró la importancia de la región cíclica del análogo selectivo de primera generación de AVP, dDAVP para su efecto citostático.

- Se desarrolló el análogo [V⁴Q⁵] dDAVP, mediante estudios de SAR del péptido de primera generación dDAVP, que mostró un efecto citoestático mejorado *in vitro* en células de SCLC.
- Se diseñó un nuevo análogo dDINT por medio de una aproximación evolutiva a partir de un péptido presente en insectos.
- Se evaluaron los análogos de AVP, dDAVP y [V⁴Q⁵]dDAVP sobre líneas de SCLC y adenocarcinoma prostático, mostrando efecto antiproliferativo, antimigratorio, pro-apóptico, modulador de la expresión de marcadores de diferenciación NE *in vitro* y un efecto antitumoral sobre el crecimiento y la angiogénesis tumoral *in vivo* en ambas líneas tumorales.
- Los resultados muestran que dDAVP y [V⁴Q⁵] dDAVP tienen potencial aplicación terapéutica en SCLC y adenocarcinoma de próstata agresivo y hormono-independiente con características NE y resistentes a las terapias.

Figura Final



Bibliografía

1. Mellitzer, G., Marjorie, J. & Gradwohl, G. (2007) Neuroendocrin Cell Biology. Learning of Lienage. "A Century of Advances in Neuroendocrin Tumor Biology and Treatment". Editor: Irving Modlin and Kjell Öberg. Editorial Felsentein, 164-171.
2. Klimstra, D.S., Beltran, H., Lilenbaum, R. & Bergsland, E. (2015). The spectrum of neuroendocrine tumors: histologic classification, unique features and areas of overlap. American Society of Clinical Oncology educational book/ASCO, American Society of Clinical Oncology, Meeting, 35: 92-103.
3. Grajeda, M.G.V., Carreón, C.A.R., Mendoza, A.D.J.M. and Borunda, A.K.D. (2015). Tumores neuroendocrinos: experiencia de 6 años en un centro de tercer nivel. Gaceta Mexicana de Oncología, 14(3), 141-149.
4. Bishop, A.E., Power, R.F., Polak, J.M. (1998). Markers for neuroendocrine differentiation. Pathol Res Pract, 183:119-128.
5. Lamberts, S.W., Hofland, L.J., Nobels, F.R. (2001) Neuroendocrine tumor markers. Front Neuroendocrinol, 22:309-39
6. Lee, C.S., Kaestner, K.H. (2004) Clinical endocrinology and metabolism. Development of gut endocrine cells. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 18:453-62
7. Portela-Gomes, G.M., Hacker, G.W., Weitgasser, R. (2004) Neuroendocrine Cell Markers for Pancreatic Islets and Tumors. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 12:183-192
8. Haesly, L. (2001). Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer. Oncogene, 20: 1563-1569.
9. Li, Z.J., Cho, C.H. (2011). Neurotransmitters, more than meets the eye—neurotransmitters and their perspectives in cancer development and therapy. Eur J Pharmacol, 667(1): 17-22.
10. Kulke, M.H., Shah, M.H., Benson, A.B., Bergsland, E., Berlin, J.D., Blaszkowsky, L.S. & Goldner, W.S. (2015). Neuroendocrine tumors, version 1.2015. Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 13(1), 78-108.
11. Petit, T., Davidson, K.K., Lawrence, R.A., D von Hoff, D., Izbicka, E. (2001). Neuropeptide receptor status in human tumor cell lines. Anti-Cancer Drugs, 12: 133-136.
12. Burgio, S.L., Conteduca, V., Menna, C., Carretta, E., Rossi, L., Bianchi, E., Kopf, B., Fabbri, F., Amadori, D., De Giorgi, U. (2014). Chromogranin A predicts outcome in prostate cancer patients treated with abiraterone. Endocr Relat Cancer, 8:21(3):487-93.
13. Conteduca, V., Burgio, S.L., Menna, C., Carretta, E., Rossi, L., Bianchi, E., Masini, C., Amadori, D., De Giorgi, U. (2014). Chromogranin A is a potential prognostic marker in prostate cancer patients treated with enzalutamide. Prostate, 74(16):1691-6.
14. Zhang, Y., Li, X.Y., Tang, Y., Xu, Y., Guo, W.H., Li, Y.C., Wei, Y.Q. (2013). Rapid increase of serum neuron specific enolase level and tachyphylaxis of EGFR-tyrosine kinase inhibitor indicate small cell lung cancer transformation from EGFR positive lung adenocarcinoma?. Lung Cancer, 81(2), 302-305. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.04.005
15. Isgrò, M.A., Bottoni, P., Scatena, R. (2015). Neuron-specific enolase as a biomarker: biochemical and clinical aspects. In: Roberto Scatena, editor. Advances in Cancer Biomarkers. Springer Netherlands, p. 125-143). doi: 10.1007/978-94-017-7215-0_9.

- 16.Creutzfeldt, W. (1996). Carcinoid tumors: development of our knowledge. *World J Surg*, 20:126-13
- 17.Williams, E.D., Sandler, M. (1963). The classification of carcinoid tumours. *Lancet*, 1:238-23
- 18.Kloppel, G., Heitz, P.U., Capella, C., Solcia, E. (1996). Pathology and nomenclature of human gastrointestinal neuroendocrine (carcinoid) tumors and related lesions. *World J Surg*, 20:132-141
- 19.Solcia, E., Kloppel, G., Sobin, L.H. (2000). Histological typing of endocrine tumours. 2nd Ed. WHO International Histological Classification of Tumours. Springer. New York
- 20.Travis, W.D., Brambilla, E., Müller-Hermelink, H.K., Harris, C.C. (2004). Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. istological typing of endocrine tumours. WHO International Histological Classification of Tumours. Lyon. IARC Press.
- 21.Niederle, M. B., Hackl, M., Kaserer, K., & Niederle, B. (2010). Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: the current incidence and staging based on the WHO and European Neuroendocrine Tumour Society classification: an analysis based on prospectively collected parameters. *Endocrine-related cancer*, 17(4), 909-918.
- 22.Bosman, F. T., Carneiro, F., Hruban, R. H., & Theise, N. D. (2010). WHO classification of tumours of the digestive system (No. Ed. 4). World Health Organization.
- 23.Rindi, G., Kloppel, G., Couvelard, A., Komminoth, P., Koerner, M., Lopes, J.M., McNicol, A.M., Nilsson, O., Perren, A., Scarpa, A., Scoazec, J.Y., Wiedenmann, B. (2007). TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch*, 451: 757-762.
- 24.Garcia-Carbonero, R., Capdevila, J., Crespo-Herrero, G., Diaz-Perez, J.A., Martínez Del Prado, M.P., Alonso Orduna, V. & Marazuela, M. (2010). Incidence, patterns of care and prognostic factors for outcome of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs): results from the National Cancer Registry of Spain (RGETNE). *Annals of oncology*, 21(9), 1794-1803.
- 25.Kaltsas, G.A., Besser, G.M. & Grossman, A.B. (2004). The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors. *Endocrine reviews*, 25(3), 458-511.
- 26.Warner, R.R. (2005). Enteroendocrine tumors other than carcinoid: a review of clinically significant advances. *Gastroenterology*; 128:1668-1684.
- 27.Eriksson, B., Öberg, K. & Stridsberg, M. (2000). Tumor markers in neuroendocrine tumors. *Digestion*, 62(Suppl. 1), 33-38.
- 28.Rorstad, O. (2005). Prognostic indicators for carcinoid neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract. *Journal of surgical oncology*, 89(3), 151-160.
- 29.Taupenot, L., Harperb, K.L. & O'connor, D.T. (2003). The chromogranin–secretogranin family. *New England Journal of Medicine*, 348(12), 1134-1149.
- 30.DeLellis, R.A. & Xia, L. (2003). Paraneoplastic endocrine syndromes: a review. In *Endocrine pathology* (Vol. 14, No. 4, pp. 303-317). Humana Press.

- 31.Kaltsas, G., Dimitriadis, G.K., Androulakis, I.I. & Grossman, A. (2017). Paraneoplastic Syndromes related to Neuroendocrine Tumours. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. Endotext.
- 32.Isidori, A.M., Kaltsas, G.A. & Grossman, A.B. (2006). Ectopic ACTH syndrome. In Pituitary Today: Molecular, Physiological and Clinical Aspects (Vol. 35, pp. 143-156). Karger Publishers.
- 33.Ilias, I., Torpy, D. J., Pacak, K., Mullen, N., Wesley, R. A., & Nieman, L. K. (2005). Cushing's syndrome due to ectopic corticotropin secretion: twenty years' experience at the National Institutes of Health. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 90(8), 4955-4962.
- 34.Quigley, A. M., Buscombe, J. R., Shah, T., Gnanasegaran, G., Roberts, D., Caplin, M. E., & Hinson, A. J. (2005). Intertumoural variability in functional imaging within patients suffering from neuroendocrine tumours. Neuroendocrinology, 82(3-4), 215-220.
- 35.Öberg, K., Knigge, U., Kwekkeboom, D., Perren, A., & ESMO Guidelines Working Group. (2012). Neuroendocrine gastro-entero-pancreatic tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of oncology, 23(suppl_7), vii124-vii130.
- 36.Gustafsson, B. I., Kidd, M., Chan, A., Malfertheiner, M. V., & Modlin, I. M. (2008). Bronchopulmonary neuroendocrine tumors. Cancer, 113(1), 5-21.
- 37.Travis, W. D., Rush, W., Flieder, D. B., Falk, R., Fleming, M. V., Gal, A. A., & Koss, M. N. (1998). Survival analysis of 200 pulmonary neuroendocrine tumors with clarification of criteria for atypical carcinoid and its separation from typical carcinoid. The American journal of surgical pathology, 22(8), 934-944.
- 38.Daddi, N., Ferolla, P., Urbani, M., Semeraro, A., Avenia, N., Ribacchi, R., ... & Daddi, G. (2004). Surgical treatment of neuroendocrine tumors of the lung. European journal of cardiothoracic surgery, 26(4), 813-817.
- 39.Turner, N. C., Strauss, S. J., Sarker, D. F. A. U., Gillmore, R., Kirkwood, A., Hackshaw, A., & Grillo, F. (2010). Chemotherapy with 5-fluorouracil, cisplatin and streptozocin for neuroendocrine tumours. British journal of cancer, 102(7), 1106.
- 40.Barbieri, F., Albertelli, M., Grillo, F., Mohamed, A., Saveanu, A., Barlier, A., ... & Florio, T. (2014). Neuroendocrine tumors: insights into innovative therapeutic options and rational development of targeted therapies. Drug discovery today, 19(4), 458-468.
- 41.Keskin, O., Yalcin, S. (2013) A review of the use of somatostatin analogs in oncology. OncoTargets Ther, 6: 471.doi: 10.2147/OTT.S39987.
- 42.Reubi, J. C. (2007). Peptide receptor expression in GEP-NET. Virchows Archiv, 451(1), 47-50.
- 43.Modlin, I.M., Pavel, M., Kidd, M. (2010). Review article: Somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours. Aliment Pharmacol Ther, 31:169---88.
- 44.Rinke, A., Müller, H. H., Schade-Brittinger, C., Klose, K. J., Barth, P., Wied, M., ... & Harder, J. (2009). Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group. Journal of Clinical Oncology, 27(28), 4656-4663.

- 45.Kwekkeboom, D. J., de Herder, W. W., Kam, B. L., van Eijck, C. H., van Essen, M., Kooij, P. P., ... & Krenning, E. P. (2008). Treatment with the radiolabeled somatostatin analog [177Lu-DOTA0, Tyr3] octreotate: toxicity, efficacy, and survival. *Journal of Clinical Oncology*, 26(13), 2124-2130.
- 46.Strosberg, J., El-Haddad, G., Wolin, E., Hendifar, A., Yao, J., Chasen, B., ... & Bushnell, D. (2017). Phase 3 trial of 177Lu-Dotatate for midgut neuroendocrine tumors. *New England Journal of Medicine*, 376(2), 125-135.
- 47.Fazio, N., Granberg, D., Grossman, A., Saletan, S., Klimovsky, J., Panneerselvam, A., & Wolin, E. M. (2013). Everolimus plus octreotide long-acting repeatable in patients with advanced lung neuroendocrine tumors: analysis of the phase 3, randomized, placebo-controlled RADIANT-2 study. *CHEST Journal*, 143(4), 955-962.
- 48.Pavel, M. E., Hainsworth, J. D., Baudin, E., Peeters, M., Hörsch, D., Winkler, R. E., ... & Öberg, K. (2011). Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *The Lancet*, 378(9808), 2005-2012.
- 49.Raymond, E., Dahan, L., Raoul, J. L., Bang, Y. J., Borbath, I., Lombard-Bohas, C., ... & Chen, J. S. (2011). Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *New England Journal of Medicine*, 364(6), 501-513.
- 50.Jensen, R. T., Niederle, B., Mitry, E., Ramage, J. K., Steinmüller, T., Lewington, V., ... & O'Connor, J. M. (2006). Gastrinoma (duodenal and pancreatic). *Neuroendocrinology*, 84(3), 173-182.
- 51.Susini, C., & Buscail, L. (2006). Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents. *Annals of Oncology*, 17(12), 1733-1742.
- 52.Sorbye, H., Welin, S. F. A. U., Langer, S. W., Vestermark, L. W., Holt, N., Osterlund, P., ... & Birkemeyer, E. (2012). Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study. *Annals of oncology*, 24(1), 152-160.
- 53.Masters, G. A., Temin, S., Azzoli, C. G., Giaccone, G., Baker Jr, S., Brahmer, J. R., ... & Smith, T. J. (2015). Systemic therapy for stage IV non-small-cell lung cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Journal of Clinical Oncology*, 33(30), 3488-3515.
- 54.Bunn Jr, P. A., Minna, J. D., Augustyn, A., Gazdar, A. F., Ouadah, Y., Krasnow, M. A., ... & Niederst, M. (2016). Small cell lung cancer: can recent advances in biology and molecular biology be translated into improved outcomes?. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 11(4), 453-474.
- 55.Kawahara, M., Ushijima, S., Kamimori, T., Kodama, N., Ogawara, M., Matsui, K., ... & Furuse, K. (1998). Second primary tumours in more than 2-year disease-free survivors of small-cell lung cancer in Japan: the role of smoking cessation. *British journal of cancer*, 78(3), 409-412.
- 56.Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H., Beasley, M. B., ... & Geisinger, K. (2015). The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *Journal of thoracic oncology*, 10(9), 1243-1260.

- 57.Niederst, M. J., Sequist, L. V., Poirier, J. T., Mermel, C. H., Lockerman, E. L., Garcia, A. R., ... & Howe, E. (2015). RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer. *Nature communications*, 6.
- 58.Gazdar, A.F., Carney, D.N., Nau, M.M., Minna, J.D. (1985) Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. *Cancer Res*, 45:2924–30.
- 59.Gazdar, A. F., Bunn, P. A., & Minna, J. D. (2017). Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nature Reviews Cancer*, 17(12), 725.
- 60.Chang, K. T., Tsai, C. M., Chiou, Y. C., Chiu, C. H., Jeng, K. S., & Huang, C. Y. F. (2005). IL-6 induces neuroendocrine dedifferentiation and cell proliferation in non-small cell lung cancer cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289(3), L446-L453.
- 61.Oser, M.G., Niederst, M.J., Sequist, L.V., Engelman, J.A. (2015) Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. *Lancet Oncol*, 16(4): e165-e172.doi: 10.1016/S1470-2045(14)71180-5
- 62.Grozinsky-Glasberg, S., Shimon, I., &Rubinfeld, H. (2012). The role of cell lines in the study of neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology*, 96(3), 173-187.
- 63.Wong, Y. N. S., Jack, R. H., Mak, V., Henrik, M., & Davies, E. A. (2009). The epidemiology and survival of extrapulmonary small cell carcinoma in South East England, 1970–2004. *BMC cancer*, 9(1), 209.
- 64.Berruti, A.,Bollito, E., Cracco, C.M., Volante, M., Ciccone, G., Porpiglia, F., Papotti, M., Scarpa, R.M., Dogliotti, L. (2010) The prognostic role of immunohistochemical chromogranin a expression in prostate cancer patients is significantly modified by androgen-deprivation therapy. *Prostate*, 70 (7):718-26.doi: 10.1002/pros.21104
- 65.Tai, S., Sun, Y., Squires, J.M., Zhang, H., Oh, W.K., Liang, C.Z., Huang, J. (2011). PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate*, 71(15): 1668-1679.
- 66.Yuan, T.C., Veeramani, S., Lin, M.F. (2007). Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *EndocrRelat Cancer*, 14(3): 531-547. doi: 10.1677/ERC-07-0061.
- 67.Mavani, G.P., DeVita, M.V. andMichelis, M.F. (2015). A review of the nonpressor and nonantidiuretic actions of the hormone vasopressin. *Front Med*, 2 (19): 1-11.
- 68.Monstein, H.J., Truedsson, M., Ryberg, A., Ohlsson, B. (2008). Vasopressin receptor mRNA expression in the human gastrointestinal tract. *EurSurgRes*, 40(1): 34.
- 69.Koshimizu, T.A., Nakamura, K., Egashira, N., Hiroyama, M., Nonoguchi, H., Tanoue, A. (2012). Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *PhysiolRev*, 92(4): 1813-1864.
- 70.Bockaert, J., Pin, J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO journal*, 18(7):1723-1729.
- 71.Kaufmann, J.E.,Vischer, U.M. (2003). Cellular mechanisms of the hemostatic effects of demopressin (DDAVP). *J ThrombHaemos*, 1: 6682-689.

- 72.Manning, M., Misicka, A., Olma, A., Bankowski, K., Stoev, S., Chini, B., Durroux, T., Mouillac, B., Corbani, M., Guillon, G. (2012) Oxytocin and vasopressin agonists and antagonists as research tools and potential therapeutics. *J Neuroendocrinol*, 24(4), 609-628
- 73.Yamazaki, T., Suzuki, H., Tobe, T.,Sekita, N., Kito, H., Ichikawa, T., Akakura, K., Igarashi, T., Ito, H. (2001). Prostate adenocarcinoma producing syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. *Int J Urol*, 8(9): 513-516.
- 74.Jaal, J., Jögi,T., Altraja, A.(2015) Small Cell Lung Cancer Patient with Profound Hyponatremia and Acute Neurological Symptoms: An Effective Treatment with Fludrocortisone. *Case Rep OncolMed*, 286029 :1-4.
- 75.North, W.G. (2000) Gene regulation of vasopressin and vasopressin receptors in cancer. *Exp Physiol*, 85: 27S-40S
- 76.North, W.G., Maurer, L.H., O'Donnell, J.F. (1983) The neurophysins and small cell lung cancer. In: Greco FA, editor.Biology and management of lungcancer. Springer US, p. 143-169.
- 77.North, W.G., Fay, M.J., Longo, K.A, Du, J. (1998) Expression of All Known Vasopressin Receptor Subtypes by Small Cell Tumors Implies a Multifaceted Role for this Neuropeptide. *Cancer Res*, 58: 1866-1871.
- 78.North, W.G., Fay, M.J., Du, J. (1999). MCF-7 breast cancer cells express normal forms of all vasopressin receptors plus an abnormal V2R. *Peptides*, 20(7): 837-842.
- 79.Keegan, B.P., Akerman, B.L., Péqueux, C., North, W.G. (2006). Provasopressin expression by breast cancer cells: implications for growth and novel treatment strategies. *Breast Cancer Res Treat*, 95(3): 265-277. doi: 10.1007/s10549-005-9024-8.
- 80.Taylor, A.H., Ang, V.T., Jenkins, J.S., Silverlight, J.J., Coombes, R.C., Luqmani, Y.A. (1990) Interaction of vasopressin and oxytocin with human breast carcinoma cells. *Cancer Res*, 50(24):7882–7886
- 81.Laycock, J.F. (2009) Perspectives on Vasopressin. London: Imperial College Press.
- 82.Levi, M., de Boer, J.P., Roem, D., ten Cate, J.H., Hack, C.E. (1992). Plasminogen activation in vivo upon intravenous infusion of DDAVP .Quantitative assessment of plasmin-alpha2-antiplasmin complex with a novel monoclonal antibody based radioimmunoassay. *Thromb Haemost*, 67:111.
- 83.Emeis, J.J., van den Eijn den-Schrauwen, Y., van den Hoogen, C.M., de Priester, W., Westmuckett, A., Lupu, F: (1997). An endothelial storage granule for tissue-type plasminogen activator. *The Journal of cell biology*, 139(1):245-256.
- 84.Kanwar, S., Woodman, R.C., Poon, M.C., Murohara, T., Lefer, A.M., Davenpeck, K.L., Kubes, P. (1995). Desmopressin induces endothelial P-selectin expression and leukocyte rolling in postcapillary venules. *Blood*, 86(7):2760-2766.
- 85.Pereira, A., del Valle Onorato, M., Sanz, C. (2003). DDAVP enhances the ability of blood monocytes to form rosettes with activated platelets by increasing the expression of P-selectin sialylated ligands on the monocyte surface. *British journal of haematology*, 120(5):814-820.
- 86.Mannucci, P.M. (1997). Desmopressin (DDAVP) in the treatment of bleeding disorders: the first 20 years. *Blood*, 90(7):2515-2521.

87. Mannucci, P.M., Ghirardini, A. (1997). Desmopressin: twenty years after. *Thrombosis and haemostasis*, 78(2):958.
88. Ripoll, G. V., Giron, S., Krzymuski, M. J., Hermo, G. A., Gomez, D. E., & Alonso, D. F. (2008). Antitumor effects of desmopressin in combination with chemotherapeutic agents in a mouse model of breast cancer. *Anticancer research*, 28(5A), 2607-2611.
89. Ripoll, G. V., Garona, J., Pifano, M., Farina, H. G., Gomez, D. E., & Alonso, D. F. (2013). Reduction of tumor angiogenesis induced by desmopressin in a breast cancer model. *Breast cancer research and treatment*, 142(1), 9-18.
90. Ripoll, G. V., Garona, J., Hermo, G. A., Gomez, D. E., & Alonso, D. F. (2010). Effects of the synthetic vasopressin analog desmopressin in a mouse model of colon cancer. *Anticancer research*, 30(12), 5049-5054.
91. Giron, S., Tejera, A. M., Ripoll, G. V., Gomez, D. E., & Alonso, D. F. (2002). Desmopressin inhibits lung and lymph node metastasis in a mouse mammary carcinoma model of surgical manipulation. *Journal of surgical oncology*, 81(1), 38-44.
92. Iannucci, N.B., Ripoll, G.V., Garona, J., Cascone, O., Ciccia, G.N., Gomez, D.E., Alonso, D.F. (2011). Antiproliferative effect of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin analogs on human breast cancer cells. *Future Med Chem*, 3(16): 1987-1993.
93. Alonso, D.F., Skilton, G., Farias, E.F., Bal de Kier Joffe, E., Gomez, D.E. (1999). Antimetastatic effect of desmopressin in a mouse mammary tumor model. *Breast cancer research and treatment*, 57(3):271-275.
94. Terraube, V., Pendu, R., Baruch, D., Gebbink, M. F. B. G., Meyer, D., Lenting, P. J., & Denis, C. V. (2006). Increased metastatic potential of tumor cells in von Willebrand factor-deficient mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(3), 519-526.
95. Westphal, J. R., Van't Hullenaar, R., Geurts-Moespot, A., Sweep, F. C., Verheijen, J. H., Bussemakers, M. M., ... & De Waal, R. M. (2000). Angiostatin generation by human tumor cell lines: involvement of plasminogen activators. *International journal of cancer*, 86(6), 760-767.
96. Garona, J. & Alonso, D.F. (2014). Reciprocal interactions between tumor and endothelial cells: effects of selective vasopressin V2 receptor peptide agonists. *Cancer Cell & Microenvironment*, 1(1).
97. Cassoni, P., Sapino, A., Fortunati, N., Munaron, L., Chini, B., & Bussolati, G. (1997). Oxytocin inhibits the proliferation of MDA-MB231 human breast-cancer cells via cyclic adenosine monophosphate and protein kinase A. *International journal of cancer*, 72(2), 340-344.
98. Cassoni, P., Sapino, A., Negro, F., & Bussolati, G. (1994). Oxytocin inhibits proliferation of human breast cancer cell lines. *Virchows Archiv*, 425(5), 467-472.
99. Insel, P.A., Zhang, L., Murray, F., Yokouchi, H., Zambon, A.C. (2012). Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger. *Acta Physiol (Oxf)*, 204(2):277-287.
100. Naviglio, S., Di Gesto, D., Sorrentino, A., Illiano, F., Sorvillo, L., Abbruzzese, A., ... & Illiano, G. (2009). Leptin enhances growth inhibition by cAMP elevating agents through apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer biology & therapy*, 8(12), 1183-1190.

- 101.Castoria, G., Migliaccio, A., D'Amato, L., Di Stasio, R., Ciociola, A., Lombardi, M., ... & Auricchio, F. (2008). Integrating signals between cAMP and MAPK pathways in breast cancer. *Front Biosci*, 13(1318), 27.
- 102.Pastrian, M. B., Guzmán, F., Garona, J., Pifano, M., Ripoll, G. V., Cascone, O., ... & Iannucci, N. B. (2014). Structure-activity relationship of 1-desamino-8-D-arginine vasopressin as an antiproliferative agent on human vasopressin V2 receptor-expressing cancer cells. *Molecular medicine reports*, 9(6), 2568-2572.
- 103.Grimmelikhuijzen, C. J.and Hauser, F. (2012). Mini-review: the evolution of neuropeptide signaling.*Regulpept*, 177, S6-S9.
- 104.Gruber, C.W., Muttenthaler, M. and Freissmuth, M. (2010). Ligand-based peptide design and combinatorial peptide libraries to target G protein-coupled receptors. *Curr. Pharm. Des*, 16:3071–3088.
- 105.Newman, D.J. andCragg, G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*, 70:461–77.
- 106.McKinney, J. D., Richard, A., Waller, C., Newman, M. C. and Gerberick, F. (2000). The practice of structure activity relationships (SAR). *Toxicol Sci*, 56(1), 8-17.
- 107.Weiss, G.A., Watanabe, C.K., Zhong, A., Goddard, A., Sidhu, S.S. (2000). Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97 (16): 8950–4.
- 108.Cunningham, B.C. and Wells, J.A. (1989). High-resolution epitope mapping of hGH receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science*, 244: 1081-1085.
- 109.Nam, J., Shin, D., Rew, Y. and Boger, D.L. (2007). Alanine scan of [L-Dap(2)] ramoplanin A2 aglycon: assessment of the importance of each residue. *J Am ChemSoc*, 129: 8747-8755.
- 110.Morrison, K.L., Weiss, G.A (2001). Combinatorial alanine-scanning. *Curr Opin Chem Biol.*, 5 (3): 302–7.
- 111.Edelheit, .O, Hanukoglu, I., Dascal, N., Hanukoglu, A. (2011). Identification of the roles of conserved charged residues in the extracellular domain of an epithelial sodium channel (ENaC) subunit by alanine mutagenesis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 300 (4): F887–97.
- 112.Goodson, J. L. (2008). Nonapeptides and the evolutionary patterning of sociality. *Prog. Brain Res*, 170, 3–15.
- 113.Donaldson, Z. R. and Young, L. J. (2008). Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science*, 322, 900–904.
- 114.Gruber, C. W. (2014). Physiology of invertebrate oxytocin and vasopressin neuropeptides.*ExpPhysiol*, 99(1), 55-61
- 115.Gruber, C. W., Koehbach, J. and Muttenthaler, M. (2012). Exploring bioactive peptides from natural sources for oxytocin and vasopressin drug discovery. *Future Med Chem*, 4(14), 1791-1798.
- 116.Marinissen, M.J. and Gutkind, J.S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends PharmacolSci*, 22(7):368–376.

- 117.Czaplewski, C., Kaźmierkiewicz, R. and Ciarkowski, J. (1998). Molecular modeling of the human vasopressin V2 receptor/agonist complex. *J Comput Aided Mol Des*, 12: 275-287, 20.
- 118.Ring, A.E., Zabaglo, L., Ormerod, M.G., Smith, I.E., Dowsett, M. (2005). Detection of circulating epithelial 550 cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br J Cancer*, 551 92(5): 906-912.
- 119.Garona, J., Pifano, M., Scursoni, A.M., Gomez, D.E., Alonso, D.F., Ripoll, G.V. (2014). Insight into the effect of the vasopressin analog desmopressin on lung colonization by mammary carcinoma cells in BALB/c mice. *Anticancer Res*, 34:4761–4765
- 120.Wildey, G., Chen, Y., Lent, I., Stetson, L., Pink, J., Barnholtz-Sloan, J. S. and Dowlati, A. (2014). Pharmacogenomic approach to identify drug sensitivity in small-cell lung cancer. *PLoSone*, 9(9) e106784.
- 121.Douzery, E.J., Snell, E.A., Baptiste, E., Delsuc, F and Philippe, H. (2004). The timing of eukaryotic evolution: does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils? *Proc Natl AcadSci USA*, 101:15386 –15391..
- 122.Mayasich, S. A. and Clarke, B. L. (2016). The emergence of the vasopressin and oxytocin hormone receptor gene family lineage: Clues from the characterization of vasotocin receptors in the sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *Gen Comp Endocrinol*, 226, 88-101.
- 123.Koehbach, J., Stockner, T., Bergmayr, C., Muttenthaler, M. and Gruber, C. W. (2013). Insights into the molecular evolution of oxytocin receptor ligand binding. *BiochemSoc Trans*, 41(1):197-204.
- 124.Kiss, A. and Mikkelsen, J. D. (2005). Oxytocin--anatomy and functional assignments: a minireview. *EndocrRegul*, 39(3), 97-105.
- 125.Salzt, M., Bulet, P., Dorsselaer, A. and Malecha, J. (1993). Isolation, structural characterization and biological function of a lysine-conopressin in the central nervous system of the Pharyngobdellid leech *Erpobdella octoculata*. *The FEBS Journal*, 217(3), 897-903.
- 126.Oumi, T., Ukena, K., Matsushima, O., Ikeda, T., Fujita, T., Minakata, H. and Nomoto, K. (1994). Anetocin: an oxytocin-related peptide isolated from the earthworm, *Eisenia foetida*. *BiochemBiophys Res Commun*, 198, 393-399.
- 127.Beets, I., Temmerman, L., Janssen, T. and Schoofs, L. (2013). Ancient neuromodulation by vasopressin/oxytocin-related peptides. In *Worm*. Ed Taylor & Francis, 2(2): pp e24246.
- 128.Nielsen, D. B., Dykert, J., Rivier, J. E. and McIntosh, J. M. (1994). Isolation of Lys-conopressin-G from the venom of the worm-hunting snail, *Conus imperialis*. *Toxicon*, 32(7), 845-848.
- 129.Henry, J., Cornet, V., Bernay, B. and Zatylny-Gaudin, C. (2013). Identification and expression of two oxytocin/vasopressin-related peptides in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Peptides*, 46, 159-166.
- 130.Gruber, C. W. and Muttenthaler, M. (2012). Discovery of defense-and neuropeptides in social ants by genome-mining. *PLoSone*, 7(3), e32559.
- 131.Stafflinger, E., Hansen, K. K., Hauser, F., Schneider, M., Cazzamali, G., Williamson, M. and Grimmeliikhuijzen, C. J. (2008). Cloning and identification of an oxytocin/vasopressin-like receptor and its ligand from insects. *ProcNatlAcadSci USA*, 105(9), 3262-3267.

- 132.Li, B., Predel, R., Neupert, S., Hauser, F., Tanaka, Y., Cazzamali, G. and Schachtner, J. (2008). Genomics, transcriptomics, and peptidomics of neuropeptides and protein hormones in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Genome Res*, 18(1), 113-122.
- 133.Bankir, L. (2001). Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovasc Res*, 51:372–390.
- 134.Aikins, M. J., Schooley, D. A., Begum, K., Detheux, M., Beeman, R. W. and Park, Y. (2008). Vasopressin-like peptide and its receptor function in an indirect diuretic signaling pathway in the red flour beetle. *Insect Biochem Mol Biol*, 38(7), 740-748.
- 135.Koshimizu, T.A., Nakamura, K., Egashira, N., Hiroyama, M., Nonoguchi, H. and Tanoue, A. (2012). Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol Rev*, 92(4): 1813-1864.
- 136.Sethi, T., Langdon, S., Smyth, J. and Rozengurt, E. (1992). Growth of small cell lung cancer cells: stimulation by multiple neuropeptides and inhibition by broad spectrum antagonists in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 52(9 Supplement) 2737s-2742s.
- 137.Mochizuki, S., Soejima, K., Shimoda, M., Abe, H., Sasaki, A., Okano H.J., Okano, H. and Okada, Y. (2012). Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand factor. *J Natl Cancer Inst*, 104:906-922.
- 138.Manning, M., Stoev, S., Chini, B., Durroux, T., Mouillac, B. & Guillon, G. (2008). Peptide and non-peptide agonists and antagonists for the vasopressin and oxytocin V 1a, V 1b, V 2 and OT receptors: research tools and potential therapeutic agents. *Prog. Brain. Res.*, 170, 473-512.
- 139.Manning, M., Balaspiri, L., Acosta, M. & Sawyer, W.H. (1973). Solid phase synthesis of [1-deamino, 4-valine]-8-D-arginine-vasopressin (DVGAVP), a highly potent and specific antidiuretic agent possessing protracted effects. *J. Med. Chem.*, 16(9), 975-978.
- 140.Liu, H., Gaza-Bulseco, G. & Chumsae, C. (2008). Glutamine deamidation of a recombinant monoclonal antibody. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22: 4081-4088.
- 141.Robinson, A.B. & Rudd, C.J. (1974). Deamidation of glutaminyl and asparaginyl residues in peptides and proteins. *Curr Top Cell Regul*, 8: 247-295.
- 142.Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-674.
- 143.Fidler, I. J. (1990). Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth GHA Clowes memorial award lecture. *Cancer research*, 50(19), 6130-6138.
- 144.Wong, S.Y. & Hynes, R.O. (2006). Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide?. *Cell Cycle*, 5(8):812-817
- 145.Quail, D.F. & Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*, 19(11):1423- 1437.
- 146.Gupta, G.P. & Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4):679-695.

- 147.Certo, M., Moore, V. D. G., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. A., & Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer cell*, 9(5), 351-365.
- 148.Kelly, P. N., & Strasser, A. (2011). The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell Death & Differentiation*, 18(9), 1414-1424.
- 149.Tait, S.W. & Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 11: 621-632.
- 150.Hay, E. D. (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Cells Tissues Organs*, 154(1), 8-20.
- 151.Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nature Reviews Cancer*, 7(6), 415-428.
- 152.Boyer, B., Vallés, A. M., & Edme, N. (2000). Induction and regulation of epithelial–mesenchymal transitions. *Biochemical pharmacology*, 60(8), 1091-1099.
- 153.Thiery, J. P. (2003). Epithelial–mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current opinion in cell biology*, 15(6), 740-746.
- 154.Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.*Cell*, 139(5), 871-890.
- 155.Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442-454.
- 156.Abrahamsson, P.A. (1999). Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Prostate*, 39: 135–148.
- 157.Zekioglu, O., Erhan, Y., Ciris, M. & Bayramoglu, H. (2003). Neuroendocrine differentiated carcinomas of the breast: a distinct entity. *Breast* 12: 251–257.
- 158.Kloppel, G. (2003). Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract]. *Pathologe*, 24: 287–296.
- 159.Ferrigno, D., Buccheri, G. & Giordano, C. (2003). Neuron-specific enolase is an effective tumour marker in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*, 41: 311–320.
- 160.Marangos, P.J. & Schmechel, D.E. (1987). Neuron specific enolase, a clinically useful marker for neurons and neuroendocrine cells. *Annu Rev Neurosci*, 10: 269 –295.
- 161.Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell*, 14(6), 818-829.
- 162.Visse, R. & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*, 92(8):827-839.
- 163.Chrenek, M.A., Wong, P., Weaver, V.M. (2001). Tumour-stromal interactions. Integrins and cell adhesions as modulators of mammary cell survival and transformation. *Breast cancer research*, 3(4):224-229

- 164.Zhang, J., Wang, Y., Li, G., Yu, H., & Xie, X. (2014). Down-regulation of nicotinamide N-methyltransferase induces apoptosis in human breast cancer cells via the mitochondria-mediated pathway. *PloSone*, 9(2), e89202.
- 165.Cabrera, M., Echeverria, E., Lenicov, F. R., Cardama, G., Gonzalez, N., Davio, C & Menna, P. L. (2017). Pharmacological Rac1 inhibitors with selective apoptotic activity in human acute leukemic cell lines. *Oncotarget*, 8(58), 98509.
- 166.Fahy, B. N., Schlieman, M. G., Mortenson, M. M., Virudachalam, S., & Bold, R. J. (2005). Targeting BCL-2 overexpression in various human malignancies through NF- κ B inhibition by the proteasome inhibitor bortezomib. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 56(1), 46-54.
- 167.Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Poatema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G., and Thompson, C. B. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, 74: 597-608, 1993
- 168.Yamamura, Y., Nakamura, S., Itoh, S., Hirano, T., Onogawa, T., Yamashita, T., ... & Ogawa, H. (1998). OPC-41061, a highly potent human vasopressin V2-receptor antagonist: pharmacological profile and aquaretic effect by single and multiple oral dosing in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 287(3), 860-867.
- 169.Carie, A.E. & Sebti, S.M. (2007). A chemical biology approach identifies a beta-2 adrenergic receptor agonist that causes human tumor regression by blocking the Raf-1/Mek-1/Erk1/2 pathway. *Oncogene*, 26(26):3777-3788.
- 170.Insel, P.A., Zhang, L., Murray, F., Yokouchi, H., Zambon, A.C. (2012). Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger. *Acta Physiol (Oxf)*, 204(2):277-287.
- 171.Cook, S.J. & McCormick, F. (1993). Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science*, 262(5136):1069-1072.
- 172.Garona, J., Pifano, M., Orlando, U. D., PAsTRIAN, M. B., Iannucci, N. B., Ortega, H. H., ... & ALONsO, D. F. (2015). The novel desmopressin analogue [V4Q5] dDAVP inhibits angiogenesis, tumour growth and metastases in vasopressin type 2 receptor-expressing breast cancer models. *International journal of oncology*, 46(6), 2335-2345.
- 173.Dong, H., Claffey, K.P., Brocke, S., Epstein, P.M. (2015). Inhibition of breast cancer cell migration by activation of cAMP signaling. *Breast Cancer Res Treat.*, 152(1):17-28. doi: 10.1007/s10549-015-3445-9
- 174.Ou, Y., Zheng, X., Gao, Y., Shu, M., Leng, T., Li, Y., ... & Tang, J. (2014, January). Activation of cyclic AMP/PKA pathway inhibits bladder cancer cell invasion by targeting MAP4-dependent microtubule dynamics. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 32, No. 1, pp. 47-e21). Elsevier.
- 175.Razzore, P., & Arnaldi, G. (2016). Circulating neuroendocrine tumors biomarkers. Why? When? How? Suggestions for clinical practice from guidelines and consensus. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment.*, 2, 349.
- 176.Sasaki, H., Klotz, L. H., Sugar, L. M., Kiss, A., & Venkateswaran, V. (2015). A combination of desmopressin and docetaxel inhibit cell proliferation and invasion mediated by urokinase-type plasminogen activator (uPA) in human prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 464(3), 848-854.

177. Marcu, M. Ȃ. D. Ȃ. L. I. N. A., Radu, E., & Sajin, M. A. R. I. A. (2010). Neuroendocrine transdifferentiation of prostate carcinoma cells and its prognostic significance. *Rom J Morphol Embryol*, 51(1), 7-12.
178. Zips, D., Thames, H.D., Baumann, M. (2005). New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation. *In Vivo*, 19(1): 1-7.
179. Youle, R. J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(1), 47-59.
180. Reed, J.C. (1995). Bcl-2: Prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematol Oncol Clin North Am*, 9:451-473.
181. Kirkin, V., Joos, S., Zornig, M. (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biochim Biophys Acta*, 1644:229-249.
182. Calin, G. A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S. E., ... & Iuliano, R. (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 353(17), 1793-1801.
183. Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., ... & Rassenti, L. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13944-13949.
184. Bissonnette, R., Echeverri, F., Mahboubi, A., and Green, D. R. (1992). Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature (Lond.)*, 359: 552-554.
185. Fanidi, A., Harrington, E. A., and Evan, G. I. (1992). Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogene. *Nature (Lond.)*, 359: 554-556.
186. Cheung, W. C., Kim, J. S., Linden, M., Peng, L., Van Ness, B., Polakiewicz, R. D., & Janz, S. (2004). Novel targeted deregulation of c-Myc cooperates with Bcl-X L to cause plasma cell neoplasms in mice. *The Journal of clinical investigation*, 113(12), 1763-1773.
187. Terry, S. & Beltran, H. (2014). The many faces of neuroendocrine differentiation in prostate cancer progression. *Front Oncol*, 4(60): 1-9.
188. Vashchenko, N. & Abrahamsson, P.A. (2005). Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities. *EurUrol*, 47(2): 147-155. doi: 10.1016/j.eururo.2004.09.007
189. Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. (2013). Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 63:11-30, 2013
190. Mosquera, J. M., Beltran, H., Park, K., MacDonald, T. Y., Robinson, B. D., Tagawa, S. T., ... & Nelson, J. B. (2013). Concurrent AURKA and MYCN gene amplifications are harbingers of lethal treatment-related neuroendocrine prostate cancer. *Neoplasia*, 15(1), IN1-IN4.
191. Wang, H. T., Yao, Y. H., Li, B. G., Tang, Y., Chang, J. W., & Zhang, J. (2014). Neuroendocrine Prostate Cancer (NEPC) progressing from conventional prostatic adenocarcinoma: factors associated with time to development of NEPC and survival from NEPC diagnosis—a systematic review and pooled analysis. *Journal of Clinical Oncology*, 32(30), 3383-3390.

192. Ismail, A., Hazem, R., Landry, F., Aprikian, A. G., & Chevalier, S. (2002). Androgen ablation promotes neuroendocrine cell differentiation in dog and human prostate. *The prostate*, 51(2), 117-125.
193. Ito, T., Yamamoto, S., Ohno, Y., Namiki, K., Aizawa, T., Akiyama, A., & Tachibana, M. (2001). Up-regulation of neuroendocrine differentiation in prostate cancer after androgen deprivation therapy, degree and androgen independence. *Oncology reports*, 8(6), 1221-1224.
194. Wright, M.E., Tsai, M.J., Aebbersold, R. (2003). Androgen receptor represses the neuroendocrine transdifferentiation process in prostate cancer cells. *Mol Endocrinol*, 17:1726-1737.
195. Sun, S., Sprenger, C. C., Vessella, R. L., Haugk, K., Soriano, K., Mostaghel, E. A., ... & Nelson, P. S. (2010). Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *The Journal of clinical investigation*, 120(8), 2715-2730.
196. Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews. Cancer*, 3(6), 401.
197. Pepper, M.S. (2001). Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 21(7):1104-1117.
198. Hammerling, G.J. & Ganss, R. (2006). Vascular integration of endothelial progenitors during multistep tumor progression. *Cell Cycle*, 5(5):509-511.
199. De Palma, M. & Naldini, L. (2006). Role of haematopoietic cells and endothelial progenitors in tumour angiogenesis. *Biochimica et biophysica acta*, 1766(1):159-166
200. Aghi, M., Cohen, K.S., Klein, R.J., Scadden, D.T., Chiocca, E.A. (2006). Tumor stromal-derived factor-1 recruits vascular progenitors to mitotic neovasculature, where microenvironment influences their differentiated phenotypes. *Cancer research*, 66(18):9054-9064.
201. Hammerling, G.J. & Ganss, R. (2006). Vascular integration of endothelial progenitors during multistep tumor progression. *Cell Cycle*, 5(5):509-511.
202. Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407(6801):242-248.
203. Jain, R.K. & Carmeliet, P. (2012). "SnapShot: Tumor angiogenesis." *Cell*, 149(6): 1408-1408 e1401.
204. Huss, W.J., Hanrahan, C.F., Barrios, R.J., Simons, J.W., Greenberg, N.M. (2001). Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch. *Cancer Res*, 61(6): 2736-2743.
205. Bishop-Bailey, D. (2009). Tumour vascularisation: a druggable target. *Curr Opin Pharmacol*, 9:96-101. 23.
206. Schneider, B.J. & Kalemkerian, G.P. (2016). Personalized Therapy of Small Cell Lung Cancer. *Adv Exp Med Biol*, 890:149-74.

- 207.Lund, E. L., Thorsen, C., Pedersen, M. W., Junker, N., & Kristjansen, P. E. (2000). Relationship between vessel density and expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in small cell lung cancer in vivo and in vitro. *Clinical cancer research*, 6(11), 4287-4291.
- 208.Zhang, J., Jia, Z., Li, Q., Wang, L., Rashid, A., Zhu, Z., ... & Yao, J. C. (2007). Elevated expression of vascular endothelial growth factor correlates with increased angiogenesis and decreased progression-free survival among patients with low-grade neuroendocrine tumors. *Cancer*, 109(8), 1478-1486.
- 209.Lucchi, M., Mussi, A., Fontanini, G., Faviana, P., Ribechini, A., & Angeletti, C. A. (2002). Small cell lung carcinoma (SCLC): the angiogenic phenomenon. *European journal of cardiothoracic surgery*, 21(6), 1105-1110.
- 210.Geiger, J.H. & Cnudde, S.E. (2004). What the structure of angiostatin may tell us about its mechanism of action. *Journal of thrombosis and haemostasis*, 2(1):23-34.
- 211.Vande Walle, J., Stockner, M., Raes, A., Norgaard, J.P. (2007). Desmopressin 30 years in clinical use: a safety review. *Current drug safety*, 2(3):232-238.
- 212.Svensson, P.J., Bergqvist, P.B., Juul, K.V., Berntorp, E. (2014). Desmopressin in treatment of haematological disorders and in prevention of surgical bleeding. *Blood Rev*, 28:95–102.
- 213.Lethagen, S., Frick, K., Sterner, G. (1998). Antidiuretic effect of desmopressin given in hemostatic dosages to healthy volunteers. *Am J Hematol*, 57:153–159.
- 214.Hermo, G.A., Torres, P., Ripoll, G.V., Scursoni, A.M., Gomez, D.E., Alonso, D.F., Gobello, C. (2008). Perioperative desmopressin prolongs survival in surgically treated bitches with mammary gland tumours: a pilot study. *Vet J*, 178(1):103-108.
- 215.Hermo, G.A., Turic, E., Angelico, D., Scursoni, A.M., Gomez, D.E., Gobello, C., Alonso D.F. (2011). Effect of adjuvant perioperative desmopressin in locally advanced canine mammary carcinoma and its relation to histologic grade. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47(1):21-27.
216. Albini A, Tosetti F, Li VW, Noonan DM, Li WW: Cancer prevention by targeting angiogenesis. *Nature reviews Clinical oncology* 2012, 9(9):498-509.
217. Kaufmann, J. E., Oksche, A., Wollheim, C. B., Günther, G., Rosenthal, W., & Vischer, U. M. (2000). Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. *The Journal of clinical investigation*, 106(1), 107-116.
- 218.Tartarone, A., Giordano, P., Lerosé, R., Rodriquez, M. G., Conca, R. and Aieta, M. (2017). Progress and challenges in the treatment of small cell lung cancer. *Med Oncol*, 34(6), 110.
- 219.Carney, D. N., Mitchell, J. B., Kinsella, T. J. (1983). In vitro radiation and chemotherapy sensitivity of established cell lines of human small cell lung cancer and its large cell morphological variants. *Cancer Res.* 43, 2806–2811.
- 220.Calbo, J., van Montfort, E., Proost, N., van Druenen, E., Beverloo, H. B., Meuwissen, R., & Berns, A. (2011). A functional role for tumor cell heterogeneity in a mouse model of small cell lung cancer. *Cancer cell*, 19(2), 244-256.

- 221.Gardner, E. E., Lok, B. H., Schneeberger, V. E., Desmeules, P., Miles, L. A., Arnold, P. K., ... & Sage, J. (2017). Chemosensitive relapse in small cell lung cancer proceeds through an EZH2-SLFN11 axis. *Cancer Cell*, 31(2), 286-299.
- 222.Carter, L., Rothwell, D. G., Mesquita, B., Smowton, C., Leong, H. S., Fernandez-Gutierrez, F., ... & Hodgkinson, C. L. (2017). Molecular analysis of circulating tumor cells identifies distinct copy-number profiles in patients with chemosensitive and chemorefractory small-cell lung cancer. *Nature medicine*, 23(1), 114.
- 223.National Cancer Institute. Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®)–Health Professional Version [online] 2017. <https://www.cancer.gov/types/lung/hp/small-cell-lung-treatment-pdq/>
- 224.Weinberg, R. S., Grecco, M. O., Ferro, G. S., Seigelshifer, D. J., Perroni, N. V., Terrier, F. J., ... & Guthmann, M. D. (2015). A phase II dose-escalation trial of perioperative desmopressin (1-desamino-8-d-arginine vasopressin) in breast cancer patients. *Springerplus*, 4(1), 428.
- 225.Cotte, N., Balestre, M.N., Phalipou, S., Hibert, M., Manning, M., Barberis, C., Mouillac, B. (1998). Identification of residues responsible for the selective binding of peptide antagonists and agonists in the V2 vasopressin receptor. *J BiolChem*, 273(45):29462-29468.
- 226.Takahashi, K., Makita, N., Manaka, K., Hisano, M., Akioka, Y., Miura, K., Fujita, T. (2012). V2 vasopressin receptor (V2R) mutations in partial nephrogenic diabetes insipidus highlight protean agonism of V2R antagonists. *J BiolChem*, 287(3): 2099-2106. doi: 10.1074/jbc.M111.268797

Agradecimientos

Llegó la parte más sublime y sentida de ésta tesis, y como no podía ser de otra manera dividiré ésta sección en bloques y dentro de los bloques el orden de quién recibe su agradecimiento será completamente aleatorio, un típico diseño en bloques completamente aleatorizado...

Naaaaahhhh mentira...

Imposible usar diseño estadístico en esta sección.

Imposible que el azar agrupe los vínculos que me acompañan y que construyo día a día.

Imposible que el azar ordene a las personas que elijo y que son parte fundamental de esta tesis... a las que les debo un GRACIAS ETERNO...

Acá no hay azar... hay causas, hay elecciones, hay, como bien dijo Einstein en el inicio de ésta tesis, AMOR, esa fuerza que lo gobierna todo y que no tiene aún una explicación formal. Así que acá empiezo a agradecer, seguramente me quedará corta expresando con palabras todo lo que quiero transmitirle a cada uno de ustedes...

En primer lugar voy a agradecer al núcleo duro de desmo o mejor de AVPs como alguna vez empezó a denominarnos Daniel en su agenda cuando pactábamos una reunión...

A Daniel Alonso, gracias por esa confianza que me tuviste cuando en la entrevista te dije: no tengo experiencia en todo eso, pero aprendo y tengo ganas; y por la confianza que me tuviste después a lo largo de todo éste recorrido. Gracias por apostar al intercambio de saberes y al trabajo interdisciplinario con la mirada que cada disciplina venía a traer a nuestra línea de investigación... estoy enormemente agradecida por la formación científica que me has dado en éstos años.

A Gi, mi flamante directora de posdoc, por tanta paciencia y tanto cariño, por preocuparte siempre por mí incluso más allá del plano laboral. Por la confianza en aquella entrevista y la confianza en éstos años; por hacerme sentir valorada y por la formación científica, por supuesto; pero muy sobre todo, por el trabajo en equipo desde el comienzo y por construir siempre desde el amor.

A Juan, por todo lo que me enseñaste!, admiro tu capacidad científica y estoy orgullosa de haber sido tu aprendiz...por hacerme reír sin parar, por tantas charlas graciosas y de las serias también, por tantos abrazos fuertes, y sobre todo por ese entusiasmo cada vez que caía con mis posters naranjas, azules, violetas, verdes o rosas que te ENCANTABAN taaaanto.... Y bueh... DEMO para vos!!!.

A Nani, la más pequeña del grupo, por las ganas de aprender que hacen que uno se sienta útil. Hemos compartido poco, pero nos quedan varios años para conocernos un poco más.

A Daniel Gomez, por haberme salvado la mano de jamón, jaja, cuando mi vida estaba un poco alterada y me pasaba de todo, por tu preocupación constante por los

becarios...por tantas charlas de política y por el cariño, el respeto y los consejos a pesar de las diferencias, aunque quizá hoy son más las coincidencias...

A Mariano y a Hernán, por esas marchas y charlas de catarsis y contención política en tiempos complejos y angustiantes. A Mariano por cada una de esas mañanas en las que un ¿cómo andás flaquita?, desencadenó una larga conversación. A Hernán por haberme tenido en cuenta para aquel acto de CFK de Ciencia y Tecnología y haber hecho posible que esté parada ahí entre los científicos que la acompañaban, nunca lo voy a olvidar, Gracias!.

A Pablo LM por esas charlas filosóficas con consejos entreverados que trataban de mostrarme que podía, a pesar que la oscuridad me tapara un poco, por ese cariño sincero y tan necesario a veces, sobre todo cuando me tenías que decir crudamente algunas cosas.

A Naza, una de las mejores personas que conozco, y que conocí gracias a LOM. MI AMIGO INCONDICIONAL. Se me hace imposible ser justa con palabras con tanto para agradecer, mi compañero de tren, mi compañero de bondi-tren, mi compañero de GOT, mi compañero "platense", mi compañero de las alegrías más profundas y las tristezas más sentidas. Es tanto tanto lo que hemos compartido y tan hermosa la amistad que hemos construido en estos años que no puedo sintetizarlo, gracias por ser un compañero científico de lujo, con tus fundamentales aportes y tu criticidad profesional, y por ser un amigo de esos que te llenan el corazón, gracias por sacarme una sonrisa en esos momentos en los que parecía que nada bueno podía pasar y por tu compañía eterna.

A Vale, por su maravillosa y profunda amistad. Por esos abrazos llenos de amor; por compartir tantos valores; por tu escucha permanente y por compartir tus conocimientos científicos que me hacen mejor cada día. Pero sobre todo, gracias por permitirme encontrar siempre un oasis de paz y amor en vos, que hace que me quiera un poco más cuando te tengo cerca. Acá tengo que agradecer a Nico también, por escucharme en silencio y cada tanto tirarme un análisis y/o frase que me deja pensando y que automáticamente me hace mirar desde otro lugar, y sobre todo por hospedarme tantas veces (esto también es para vos Vale y para Benicio, claro).

A Carli, mi amiga con la que comparto tantísimas cosas, desde el signo del zodiaco hasta la pasión por los chizitos, la tónica y nuestro amor adolescente por Leonardo Di Caprio, y ahora compartimos además, profundos valores y sobre todo una hermosa e intensa amistad. Gracias por esa autenticidad que me llena de alegría, por tanto apoyo siempre, por escucharme y acompañarme. Por hacerme reír hasta que me duele la panza y hacer mis días más lindos.

A Maru, por esa locura hermosa. Por ese pensamiento lateral que siempre me deja reflexionando. Gracias por tu infinita ayuda, tu hospitalidad cuando tengo que quedarme en

Bernal, tu comprensión, tu compañía, tu preocupación y tu gran cariño. Y por supuesto gracias por corregirme siempre el inglés!!.

A Romi y a Diego, disculpen pero no puedo separarlos, jaja, gracias por haberme confiado su amor desde el principio. Por esas charlas en PRAMIN, que ojalá sean eternas, así las podemos retomar cada vez que las necesitemos. Por el afecto sincero, el hospedaje, la ayuda con las real time, pero sobre todo por el acompañamiento de siempre, los bailes de Romy que le roban una sonrisa a cualquiera y los abrazos y palabras contenedoras de Die.

A Hec, por esas charlas con tanta atención reflejada en esa hermosa mirada llena de emoción que hace sentir que lo que uno esta transmitiendo es importante y que demuestra que se está compartiendo algo muy sincero, por los abrazos, por esas comidas riquísimas que ponen feliz a cualquiera, por el cariño ,por supuesto, y también por los primers.

A Cyn, por tu ayuda infinita en todo!, por ser una gran compañera de trabajo y amiga, siempre pendiente resolviendo los problemas de todos, por tu preocupación constante, por tu acompañamiento laboral y sobre todo por tu acompañamiento emocional.

A Joy, gracias por poner la oreja tantas veces, gracias por esa frescura que llena de energía, por la espontaneidad que llena de chispas el laboratorio, pero sobre todo por la compañía, la confianza y el cariño.

A Georgi, por valorar siempre lo que tengo para aportar, por saber cuándo preguntar como estaba, leer mi carita de perro mojado y acompañarme con esas charlas en la cucha y esos abrazos.

A Ro, por esas charlas confidentes y cómplices en PRIETEC entre repique y repique y lectura de placas. Por confiar en mí y escucharme y por el cariño sobre todo.

A los demás fito, el grupo inseparable, (Humber, Nori y Lore), por el interés por mis cuentos y la predisposición para ayudar siempre. Por esa alegría contagiosa que tanto necesitamos para seguir adelante cada día.

A Juli, por ser el conductor asignado de ese maravilloso viaje a Trenque donde pude conocerte un poco más, donde compartimos tantas risas y anécdotas.

A Flor a quien no he tenido mucha oportunidad de conocer profundamente, pero que desde el primer día mostró que está hecha de buena madera y eso ya es suficiente para saber que puedo contar con ella.

A quienes pasaron por el labo y dejaron su marca en mí: a Ana T. por ser mi aliada en las charlas k del inicio del labo, por su linda y graciosa locura que tanto me hacían reir. A Silvi, una gran compañera que me dió mucho cariño e hizo con sus ocurrencias y tópicos de charla que los días con ella en LOM sean tan divertidos.

A Toti, por tantos viajes en el totibus, tantas risas y enojos compartidos. Por acompañarme en ese 2014 de la muerte jaja.

A mis compañeros de la cátedra de estadística, que son mucho más que compañeros, son amigos. Por enseñarme que ser un *outlier* no es malo, que si somos varios *outliers* podemos convertirnos en otra distribución y es así como se puede empezar a modificar algo. Por enseñarme que a veces, también en la vida cuando $e \neq o$, podemos tener un gran comienzo... A Rodri por bancarme siempre en todo, por hacer de mí la docente que soy hoy, por buscar soluciones y pensar siempre en mí para que mi experiencia laboral crezca. A Noe, Vir y Gigia, por hacerme mejor docente al aprender de ellas y mejor persona también y por tantas alegrías y tristezas compartidas.

A Nadia D. mi cumpamiga del alma, mi amiga bióloga militante con la que tengo la suerte de compartir la militancia en Construcción y también los avatares del doctorado. Por su PERFECTA AMISTAD, por ser la única que puede llegar a mi cuando me nublo, por tantos consejos, por escucharme, por estar ahí siempre siempre, por enseñarme que las verdades no tienen complejos...gracias amiga por tanto tanto amor, no existen palabras capaces de transmitir mi agradecimiento y amor.

A mis amigas zoólogas, Bel, Caro y Nadia B. con quienes transité la odisea de ser Biólogas, por acompañar a esa adolescente que se mudó a La Plata para estudiar y seguir acompañando a esta mujer que soy hoy, muy diferente de aquella que fui. A Nadia B. por tantas catarsis científicas, doctorales y de las otras, por tanta comida vegetariana y por seguir eligiéndonos y queriéndonos a pesar de ya no reconocer a esas niñas que se conocieron en el curso de ingreso. A Caro por empujarme siempre a terminar mis etapas y hacerme sentir capaz de enfrentar las situaciones, por tu acompañamiento y ayuda en cada momento importante y por el enorme cariño. A Bel por tantos “cuentos” y “bolazos”, por tantos ojos chinos de risa y de llanto. Por todo ese amor que creció con nosotras, pero sobretodo por esa conexión de alma a alma que logramos construir.

A Lucre, mi amiga de siempre, desde los 4 años, por tantos años compartidos incluida esta etapa. Por el amor intacto y cada vez más profundo.

A Clari, mi otra amiga de toda la vida, por estar siempre a pesar de la distancia. Por sus visitas que me alegran la vida. Y por ese cariño que resiste los desafíos del tiempo y el espacio.

A mis compañeros de Construcción, especialmente al Chino, Dani, María y Doffo (acá también va Nadia D.), por haberme permitido crecer políticamente al fragor del conflicto de Ciencia y Tecnología, por darme la confianza y la seguridad que necesitaba, por elegirme para representarlos en momentos importantes.

A mis amigas artistas y de las ciencias sociales peronchas, Pía, Mariana, Mechi B, Nati, Rocío, Meme, Meli y Gigi (acá también va Ana pero ella tendrá un apartado especial), esas que hicieron que quiera y conozca de memoria a la Facultad de Bellas Artes sin ser parte de ella, con quienes di mis primeros pasos en la militancia y me enseñaron tanto en el

Centro Cultural Héctor Oesterheld, porque la política y el trabajo territorial nos unieron y nunca más pudimos separarnos, Nunca Menos... A Pi, otra amiga a la que fue dedicado el agradecimiento anterior pero también gracias por ser mi COMPAÑERA ESPECIAL en los momentos más tristes y más felices de éstos años, por ser mi amiga viajera, por quererme tanto.

Mariana, además, muchísimas gracias por el maravilloso diseño de la tapa!!!

A mis compañeros de la JPV, por devolverme la alegría militante cuando todo estaba tan difícil.

A la persona que me ha dado el amor y el desamor más grande de éstos años, y de mi vida. Quien supo ser un gran compañero pero hoy está lejos. Con quien comencé a transitar este camino y hoy ya no es parte de mi recorrido pero estuvo ahí de la manera que pudo y me es imposible no agradecer por esos momentos de alegría que pueden hoy dejar de lado tanto dolor.

A mis primas (Xime, Mechi, Mica y Sonia) con quienes he compartido y transitado esta etapa, por el aguante y la compañía.

A mi tía Marina por ayudarme cada vez que necesitaba algo de la ANPCyT.

Al tío Rudy, mi pseudopadrino del corazón, porque este logro es en gran parte gracias a él (y a Graciela). Por estar siempre que necesité un consejo laboral, científico, una ayuda, un apoyo emocional o un empujón.

A Estela, por el hermoso dibujo de la tapa. Un dibujo hecho con el cuerpo, la cabeza y el corazón. Y por supuesto también al tío Nicolás, su Numen inspirador!.

A Juli, mi cuñada, por tantos fines de semana compartidos, por la buena onda y por acompañarme a la par de Pabli.

A Mariano, mi cuñado-amigo-compañero-casi hermano, por tanta paciencia, tanto aguante, tantas risas, tantas charlas de CyT y, por supuesto, por todo el cariño. Sos un hermano mayor para mí aunque seas un poco falso, jajajaja.

A la abuela Cata, por tu compañía, tu preocupación e interés constante, por esas llamadas llenas de amor pidiéndome siempre que me cuide mucho. Por esos 91 años de experiencia y vitalidad, por ser un ejemplo de lucha y de superación.

Y para el final voy a dejar a los grandes pilares de mi existencia y, por tanto, pilares de mi parte profesional también, los amores más profundos de mi vida: mis papás y mis hermanos.

A Ana y a Pablo, mis COMPAÑEROS COTIDIANOS en éste recorrido y en el de toda mi vida (bueno Pablo se perdió 5 años de mi vida, pero lo voy a perdonar jaja). Por ser mis sostenes siempre. Porque compartir mi vida con ustedes es lo más hermoso que me pasó. Porque los admiro profundamente, porque compartimos nuestra visión de la vida y me hacen mejor persona cada día, porque han padecido mis tristezas y han disfrutado cada uno

de mis logros, porque son mis compañeros desde siempre y para siempre y porque han estado ahí, en las buenas y en las malas mucho más, amarlos es poco.

A Mamá y Papá, por absolutamente TODO. Por hacer de mí esta que soy, por transmitirme los valores más profundos: el AMOR, la SOLIDARIDAD y la RESPONSABILIDAD. Por enseñarme que hay que luchar siempre por lo que uno sueña y por transformar la realidad para que sea más justa; por enseñarme que es fundamental el trabajo en equipo y que con trabajo, constancia y lucha se puede empezar a construir algo mejor. Mi orgullo y admiración por su ejemplo no pueden expresarse con palabras. Los amo infinitamente.

Esta tesis es de todos ustedes, de cada uno de ustedes, y es sólo UN resultado más de éste largo camino que emprendí hace unos años.

Esta tesis también es del Pueblo Argentino, el que con sus impuestos hizo posible que yo sea una privilegiada que pueda vivir con las becas y seguir formándome. También es de quienes tuvieron la decisión política de poner a la Ciencia y la Tecnología en un lugar fundamental para el desarrollo económico y social del país, quienes aumentaron el presupuesto, crearon el ministerio de Ciencia y Tecnología (que espero siga existiendo) y crearon programas de subsidios y de infraestructura. Mi más sentido agradecimiento entonces para NÉSTOR y CRISTINA, quienes permitieron que yo acceda a becas de la ANPCyT, de CONICET y del INC; y por supuesto para quién hizo que la educación universitaria sea pública y gratuita, gracias MI GENERAL.


Y también es de esa mujer que nos mostró la diferencia entre decir YO y sentir NOSOTROS y que paradójicamente se la llevó muy joven el maldito cáncer. Gracias EVITA por enseñarnos tanto y acá también debo volver a agradecer a mis papás por la formación política y por mi peronismo que conforma mi identidad pero también explica cómo concibo el trabajo y cómo me vinculo con los otros.

Y como no puede ser de otra forma, voy a terminar esta parte, que representa mis emociones más profundas y el final de éste camino que tiene como resultado visible una tesis doctoral, con 6 palabras, porque como digo siempre todo tiene que ver con todo...

GRACIAS!

VIVA PERÓN!!!

VIVA LA PATRIA!!!



Universidad Nacional de Quilmes
Departamento de Ciencia y Tecnología
Laboratorio de Oncología Molecular

