

Tesis doctoral

CARACTERIZACIÓN CELULAR Y MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN CÁNCER

Autor: Carla Sabrina Capobianco

Director: Hernán Gabriel Farina

Co-Director: Mariano Rolando Gabri

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

-2017-



Parte de los resultados presentados en esta tesis fueron incluidos en la siguiente publicación:

Bragado P, Estrada Y, Parikh F, Krause S, Capobianco C, Farina HG, Schewe DM, Aguirre-Ghiso JA. "TGF- β 2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF- β -RIII and p38 α/β signaling" Nature Cell Biology. 15, 1351-1361, (2013)

Los resultados incluidos en este trabajo se presentaron en los siguientes congresos nacionales e internacionales:

Carla Sabrina Capobianco; Johanna Elena Sidabra; Yasser Perera; Silvio Perea; Daniel Fernando Alonso; Hernan Gabriel Farina. The anti-CK2 peptide CIGB-300 elicits an antitumor effect in vitro and inhibits metastatic dissemination in vivo in an aggressive murine mammary carcinoma model. 2016. LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica.

Capobianco CS; Aguirre Ghiso JA; Gomez DE; Alonso DF; Farina HG. Efectos paradójicos ante la modulación de la quinasa P38 en células tumorales de mama. 2015. LX Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica.

Carla Capobianco; Gabri M; Bragado P; Aguirre Ghiso J; Alonso DF; Gomez DE; Farina H. Rol de la quinasa p38 en la modulación de la transición quiescencia/proliferación en células de carcinoma mamario murino F3II. 2013. LVIII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica.

Capobianco CS; Gabri MR; Bragado P; Aguirre Ghiso J; Alonso DF; Gomez DE; Farina H. Inhibition of p38 MAP Kinase promotes tumor growth in a mouse mammary carcinoma model. 2012. Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular. SAIB

Paloma Bragado; Yeriel Estrada; Maria Soledad Sosa; Denis Schewe; Carla Capobianco; Kateri Moore; Hernan Farina, Julio Aguirre Ghiso. Microenvironmental signals dictate disseminated tumor cells (DTCs) fate through regulation of TGF. 2012. AACR 103rd Annual Meeting.

Capobianco CS; Gabri MR; Gomez DE; Aguirre Ghiso J; Farina HG. La inhibición de la actividad de p38 en células de carcinoma mamario murino F3II aumenta la multiplicidad de nódulos metastásicos pulmonares en ratones Balb/c. 2011. LVI Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica.

Indice

Contenido

Resumen	5
Introducción	11
Cáncer: Nociones generales. Estadísticas.....	13
Cáncer de mama	14
Metástasis	16
La cascada metastásica	16
Enfermedad mínima residual y <i>dormancy</i> : definición y descripción de los diferentes tipos de quiescencia.....	21
<i>Dormancy</i> celular y tumoral.....	22
<i>Dormancy</i> en células solitarias.....	25
<i>Dormancy</i> de masa tumoral.....	28
<i>Dormancy</i> angiogénica.....	29
<i>Dormancy</i> inducida por el sistema inmune	31
Relevancia clínica de la EMR y posibles enfoques terapéuticos.....	32
Objetivos.....	35
Formulación de los objetivos generales y particulares.....	37
Capítulo 1	39
Introducción.....	41
La familia de quinasas p38.....	41
Materiales y métodos	43
Líneas celulares y condiciones de cultivo	43
Reactivos y anticuerpos	43
Ensayo clonogénico con tratamiento con el inhibidor de p38 SB203580	44
Ensayo de proliferación en 2D y 3D	45
Ensayo de adhesión celular.....	46
Ensayo de <i>spreading</i> celular	46
Ensayo de migración en herida.....	47
Citometría de flujo	47
Western Blot	48
Resultados.....	49
La inhibición química de p38 provoca una inhibición en la proliferación en cultivos 2D de células F3II.....	49
El crecimiento de esferoides en cultivo en 3D es promovido al inhibir p38.....	50
Los procesos de adhesión y <i>spreading</i> celular son favorecidos al inhibir p38 en la línea celular F3II, sin observarse cambios para el proceso de migración.	53

La fosforilación de la proteína mitogénica ERK1/2 se ve favorecida al modular de forma negativa la quinasa p38.	58
Discusión	60
Capítulo 2	67
Introducción.....	69
Modelos de estudio de diseminación, enfermedad mínima residual y <i>dormancy</i>	69
Materiales y métodos	72
Animales.....	72
Ensayo de cirugía completa. Puesta a punto para el favorecimiento del desarrollo de metástasis pulmonares	72
Ensayos de cirugía completa e incompleta con inhibición de p38.	73
Estudio de la regulación de la latencia tumoral.....	75
Resultados.....	76
Puesta a punto del modelo de cirugía de tumores primarios heterotópicos para el favorecimiento de la diseminación metastásica y su aplicación como modelo quirúrgico <i>in vivo</i>	76
Estudio del efecto de la inhibición de p38 sobre el proceso de diseminación y recidiva.....	78
Estudio de los efectos de la inhibición química de p38 sobre la latencia tumoral. Determinación de la carga de células inicial para su aplicación como modelo de estudio <i>in vivo</i>	81
Discusión	84
Capítulo 3	89
Introducción.....	91
La quinasa CK2 y el inhibidor peptídico CIGB-300	91
Materiales y Métodos	93
Síntesis de CIGB-300	93
Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 (IC50) de CIGB-300 para la línea F3II.....	93
Western Blot	93
Ensayo de <i>spreading</i> celular	94
Ensayo de latencia tumoral.....	94
Ensayo de cirugía incompleta	95
Resultados.....	97
CIGB-300: estudio de su potencial actividad como modulador del fenotipo agresivo potenciado por la supresión de la actividad de p38.	97
Estudio del efecto del tratamiento con CIGB-300 sobre la latencia tumoral.	100
Aplicación de CIGB-300 en el modelo quirúrgico de cirugía incompleta.....	102
Discusión	104
Conclusiones	107

Bibliografía	111
Agradecimientos	121

Resumen

La principal causa de muerte entre los pacientes con cáncer es la aparición de metástasis. Es corriente observar recaídas luego de largos periodos libres de enfermedad, aún luego de la cirugía, quimioterapia y radioterapia. La fuente de estos nuevos focos de crecimiento son células que se mantuvieron “dormidas” o quiescentes, y que por razones que aún se encuentran en estudio, reanudan su crecimiento. La enfermedad diseminada que persiste luego del tratamiento y es indetectable clínicamente es lo que se conoce como enfermedad mínima residual.

Actualmente poco se sabe sobre los procesos puestos en juego durante el pasaje de estas células diseminadas desde un estado quiescente a un estado proliferativo. Una de las problemáticas más relevantes es la falta de tratamientos que resulten efectivos a la hora de atacar la enfermedad mínima. Teniendo en cuenta las características biológicas de estas células resulta lógico que no respondan de la misma manera que el tumor primario o las metástasis ya establecidas a drogas adyuvantes y tratamientos que consisten en atacar la capacidad proliferativa tumoral. Comprender este fenómeno permitiría conocer las señales claves en la transición, información que resultaría extremadamente útil a la hora del diseño de nuevas drogas, o el análisis de los efectos de las drogas ya existentes sobre las células *dormant* o quiescentes.

Para este fin, es necesario contar con modelos de estudio *in vitro* e *in vivo* propicios. Una de las principales barreras a la hora de estudiar nuevos fármacos es la poca disponibilidad de modelos de estudio que reflejen de manera fiel la situación clínica de un paciente que ha sido tratado por la aparición de una neoplasia primaria y (a pesar de no ser detectadas) presenta células diseminadas con el potencial de formar un foco secundario de crecimiento.

A partir de las problemáticas planteadas, esta tesis doctoral se desarrolla a lo largo de tres capítulos, con el objetivo de estudiar el rol de proteínas con funciones aún no determinadas en aspectos claves de la biología tumoral, en particular en el proceso de latencia, diseminación y desarrollo de recidivas. De forma paralela, se diseñaron modelos

de estudio *in vivo* para su aplicación en el estudio del efecto de nuevas drogas en los procesos nombrados.

Particularmente, dentro de las quinasas propuestas como determinantes del fenotipo quiescente se encuentra p38. Se ha reportado que esta quinasa se encuentra activa en células solitarias diseminadas quiescentes y en micrometástasis. Sin embargo, el rol de p38 en la biología tumoral resulta un tema controversial. En varias publicaciones se reportan resultados que posicionan a p38 como una proteína que favorece el crecimiento tumoral, y es por esto frecuentemente propuesta como un blanco interesante para el desarrollo de drogas antitumorales.

En este trabajo, se muestra que la inhibición química de p38 en células F3II (carcinoma de mama murino) favorece la proliferación en cultivo 3D, la activación de la quinasa mitogénica ERK1/2, la expresión de integrinas $\alpha 5$ en la membrana citoplasmática, con el consecuente aumento en la adhesión celular.

Adicionalmente, se desarrollaron modelos de estudio *in vivo* que mimetizan el proceso de diseminación de células tumorales luego de una intervención quirúrgica, así como también un modelo para el estudio de la latencia tumoral. En todos los casos, se estudió el efecto de la modulación negativa de p38 en estos modelos, observando que su inhibición le otorga a las células F3II ventajas adaptativas, lo cual se tradujo en un aumento en el desarrollo de recidivas, una marcada tendencia al aumento en el número de metástasis pulmonares, y una disminución en los tiempos de latencia tumoral.

Por último, se aplicaron los modelos desarrollados para estudiar el efecto de un novedoso péptido anti-CK2 denominado CIGB-300. Este péptido mostró una marcada tendencia a reducir la aparición de focos secundarios en pulmón luego de la remoción quirúrgica del tumor primario.

En síntesis, en este trabajo se recalca la importancia de la quinasa p38 en el control del crecimiento y la agresividad de la línea F3II, demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*. A su vez, se proponen novedosos modelos *in vivo* basados en la modulación de dicha quinasa,

como herramienta para el estudio del efecto de nuevos compuestos con potencial antitumoral.

Introducción

Cáncer: Nociones generales. Estadísticas.

Se define al cáncer como un conjunto de enfermedades relacionadas, con características compartidas que las atraviesan. Su disparador es la transformación de células normales del cuerpo, mediante la cual sufren una serie de cambios que le otorgan la capacidad de replicarse de forma desmedida, evadiendo los sistemas de control del crecimiento impuestos por el organismo.

Es importante diferenciar el término neoplasia (“nueva formación”) del término cáncer, debido a que la formación de un tumor *per se* no implica una enfermedad oncológica. Un tumor que se encuentra perfectamente delimitado, y que no afecta las estructuras tisulares que lo rodean es un tumor benigno. En general estos tumores se remueven por razones preventivas, pero no representan una amenaza para la salud del paciente, a excepción de los tumores benignos que se encuentran alojados en el cerebro, que pueden comprometer funciones básicas del sistema nervioso sólo por el hecho de alojarse en esa zona en particular. Las neoplasias malignas, en cambio, no se encuentran delimitadas espacialmente, y afectan los tejidos que las rodean, a partir de la adquisición de la capacidad invasiva. Estas células eventualmente pueden alcanzar el sistema circulatorio o linfático, diseminarse y formar focos de crecimiento en órganos distantes al tumor primario. Estos focos secundarios de crecimiento se denominan “metástasis”.

Un compendio de más de 100 enfermedades conforman el conjunto de patologías que se engloban dentro del término “cáncer”. A pesar de esto, el origen siempre es del mismo tipo: un cambio o daño genético, generalmente en genes que controlan la replicación celular. Estos daños pueden ser heredados, pero también pueden ser adquiridos a lo largo del tiempo. A medida que transcurre la enfermedad es corriente la aparición de nuevas mutaciones, deleciones, o amplificaciones génicas. La inestabilidad génica es una de las características de las células que sufrieron transformaciones malignas, y la causa de la enorme variedad observada durante el desarrollo de cada una de las enfermedades oncológicas.

Nuestro país se encuentra dentro de los países con un rango de incidencia de cáncer media-alta, según datos provistos por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC, año 2012), con 217 nuevos casos cada 100.000 habitantes. Con respecto a la mortalidad, un 20% de las defunciones registradas en el país se deben a tumores, lo cual en números absolutos representa 60.000 muertes totales por año.

En particular, el trabajo en esta tesis doctoral se centró en el cáncer mamario. Esta patología es la primera en magnitud entre los diferentes tipos de tumores, representando un 32% de la totalidad de casos en mujeres, y un 16,8% de la totalidad de los casos de cáncer en el país. Su incidencia es de 71 casos nuevos cada 100.000 mujeres anualmente, según datos proporcionados por la IARC en el 2012. Esta patología constituye la tercer causa de muertes por cáncer en el país, representando un 9% de las defunciones totales por este tipo de enfermedad, por detrás del cáncer de pulmón (15%) y el cáncer colorrectal (11%), en base a los datos recopilados durante el 2014 por la Dirección de Estadísticas e Información de Salud, dependiente del Ministerio de Salud de la República Argentina. Si nos centramos sólo en la población femenina, en el mismo periodo citado previamente, el cáncer mamario fue el primer causal de defunciones por cáncer, representando un 19,4% del total de muertes registradas.

Cáncer de mama

El cáncer de mama es una de las patologías más heterogéneas dentro de la totalidad de los tumores. Este tipo tumoral comprende una gran variedad de perfiles fenotípicos y morfológicos, presentando de esta manera comportamientos muy diversos en el aspecto clínico¹. Para su clasificación clínica se recurre a las propiedades inmunohistoquímicas, que definen el estatus hormonal. De esta forma, se pueden clasificar en positivos para receptores hormonales, HER2 positivos y triple negativos. La primer clasificación comprende el porcentaje mayoritario de los tumores mamarios, y representa a aquellos que expresan receptores de estrógeno y/o progesterona, y pueden a su vez

clasificarse en dos subtipos: Luminal A y Luminal B. Estos a su vez pueden ser HER2 positivos o negativos, con una marcada tendencia de los Luminal B a ser positivos y los Luminal A a ser negativos. Aquellos tumores que expresan HER2 pero que no expresan receptores hormonales son los denominados HER2+. Se estima que cerca del 20% de los tumores de mama expresan HER2. Por último, se encuentran los tumores de mama triple negativos, que no expresan ni receptores hormonales ni el receptor HER2. Estos tumores son conocidos también como tumores del subtipo basal, y se ven representados en aproximadamente un 15% de los pacientes con cáncer mamario. Estos tres grupos son los principales, sin embargo, existen otras clasificaciones que no han sido completamente caracterizadas, y que representan una pequeña proporción de los casos².

Esta clasificación es de suma importancia debido a que es determinante del tipo de terapia a utilizar con cada paciente en particular, de acuerdo al subtipo que lo represente. En el caso de los pacientes que expresan receptores hormonales, pueden ser tratados con terapias hormonales, como tamoxifeno o inhibidores de aromatasas. Por otra parte, aquellos pacientes con expresión del receptor HER2 pueden ser tratados con terapias anti-HER2, como es el caso del anticuerpo monoclonal trastuzumab. Las terapias para los pacientes triple negativo, en cambio, son mucho más acotadas, dado que no presentan expresión de ninguno de los blancos terapéuticos nombrados previamente. Para este tipo de pacientes se utiliza terapia clásica de rayos, quimioterapia, y cirugía³.

El cáncer de mama se caracteriza por ser una de las patologías en las cuales luego de largos períodos libres de enfermedad, después de las cirugías y los tratamientos adyuvantes, se observan recaídas. Se ha reportado que los lapsos en los cuales ocurren estas recaídas guardan estrecha relación con el tipo tumoral del que se trate, siendo los pacientes que presentan tumores sin expresión de receptores estrogénicos los que en general recaen de forma temprana, y aquellos positivos los que presentan periodos libres de enfermedad más prolongados, habiéndose reportado recaídas luego de más de 20 años⁴.

Metástasis

La característica principal que diferencia a un tumor benigno de un tumor maligno es, como se explicó previamente, la capacidad de invasión de las células malignas. Esta capacidad de invadir tejidos circundantes constituye el primer paso necesario para el proceso de metástasis. Dicho proceso comprende varios pasos, y todos estos pasos se encuentran controlados por diferentes señales, celulares y del ambiente. Es importante la comprensión de este proceso debido a que la mortalidad asociada al cáncer es en gran parte producto del desarrollo de metástasis y no una consecuencia del crecimiento del tumor primario. La comprensión de este proceso permite la detección de aquellos actores claves con potencial de ser blancos terapéuticos en la búsqueda de terapias antitumorales.

Los pasos que dan lugar a las metástasis se pueden resumir en pocos eventos que son conocidos como “cascada metastásica” (Figura 1). Estos son la invasión local, la intravasación, la supervivencia durante su pasaje por el sistema circulatorio, el anclaje en órganos distantes, la extravasación y por último, el crecimiento que dará lugar primero a micrometástasis y luego a metástasis consolidadas. Dentro de esta cascada, las células tumorales pueden pasar por una etapa de arresto del crecimiento, y mantenerse como células solitarias o pequeñas masas tumorales quiescentes. Este tema se tocará con mucho más detalle en las próximas secciones, sin embargo, cabe poner en evidencia la existencia de este fenómeno en este contexto para un abordaje más comprensivo de la temática.

La cascada metastásica

El primer paso para dar origen a una metástasis es la invasión local, a partir de un frente invasivo que se genera en el tumor primario. Para que esto suceda, las células sufren una alteración de su movilidad, signada por la reorganización de su citoesqueleto y la secreción de enzimas remodeladoras de la matriz extracelular (MEC), como lo son las proteasas^{5, 6}. A su vez, el estroma tumoral (compuesto por un conjunto de células como

fibroblastos asociados a tumor, y células del sistema inmune, como los macrófagos) también secreta factores pro-migratorios, facilitando la invasión y la posterior diseminación⁷. Por último, la transición epitelio-mesenquimal (o EMT, del inglés *epithelial to mesenchymal transition*) es parte de los procesos que contribuyen a la diseminación metastásica, debido a que la pérdida de características epiteliales de las células, como la polarización, o su capacidad de adhesión (a través de la regulación negativa en la expresión de proteínas de unión, como la E-cadherina, propia del fenotipo epitelial), le otorgan la movilidad necesaria para “desprenderse” de la masa tumoral e invadir⁸.

Para acceder al sistema circulatorio, a través del proceso de intravasación, la irrigación del tumor primario con nuevos vasos sanguíneos es un punto crucial. Esta nueva formación se denomina “angiogénesis”. También resulta determinante la secreción de factores que aumentan la permeabilidad de dichos vasos, secretados tanto por las células tumorales como por el estroma. Ejemplos de estos factores son el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF β) o el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF)⁹.

El pasaje por el torrente sanguíneo es uno de los puntos de selección clave para las células diseminadas. En este punto, las células deben sortear dos amenazas: por un lado, la presencia de células propias de la inmunidad innata, como las *Natural Killer cells* (células NK), y por el otro, el daño mecánico propio de atravesar la circulación¹⁰. En este punto, es común la asociación de las células tumorales con células propias de la sangre, como las plaquetas, conformando un émbolo tumoral. Esta asociación promueve la supervivencia a través del pasaje por el sistema circulatorio. La adhesión al endotelio en los órganos que serán de locación secundaria también es una de las estrategias de supervivencia de las células circulantes^{11, 12}. A continuación, estas células arrestadas en la microvasculatura del órgano blanco, deben extravasar. Para que esto suceda, una vez más se observa la secreción de factores que remodelan la vasculatura y aumentan la permeabilidad de los vasos, con el objetivo de establecerse como células tumorales diseminadas (DTCs, del inglés *Disseminated Tumor Cells*).

Una vez que las DTCs se establecieron en el órgano secundario deben una vez más enfrentarse a un ambiente hostil. Las condiciones para el crecimiento en el sitio blanco no son en general favorables, teniendo que adaptarse a un microambiente nuevo, en presencia de factores extrínsecos específicos del órgano, células del estroma, citoquinas y factores de crecimiento que amenazan la supervivencia celular. En este punto, las células tumorales alteran la activación de diferentes vías de señalización que promueven su supervivencia y correcto hospedaje. Ejemplos de estas vías son las que incluyen a la tirosin-quinasa Src, o a las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, del inglés *Mitogen Activated Protein Kinases*) ERK1/2 o p38^{13, 14}. Se observó que durante este proceso también se favorece al fenotipo del tipo *Stem-Cell*, reprimiendo genes supresores de metástasis, y expresando algunos factores transcripcionales propios de este fenotipo celular, como SOX2 o SOX9¹⁵.

A partir de lo expuesto, queda claro que en la regulación de los pasos de la cascada metastásica, tan importantes como las señales dentro de la célula son las interacciones con los componentes de la matriz extracelular, las células estromales, células del sistema inmune, los fibroblastos asociados al tumor, y demás tipos celulares. Estas interacciones se dan tanto de forma local, como a distancia. Un ejemplo de este último fenómeno es la observación de la creación de un nicho pre-metastásico por parte del tumor primario, a partir de la secreción de factores sistémicos que preparan al tejido de los sitios secundarios de crecimiento para una recepción más amena de las células diseminadas, generando condiciones de crecimiento más permisivas para los pequeños focos metastásicos. En tumores mamarios, por ejemplo, se describió la secreción por parte de la MEC tumoral de una proteína conocida como Tenascina C, para la creación de un entorno permisivo de crecimiento en el pulmón¹⁶.

En este punto, resta abordar el último paso en la cascada metastásica, que es la duplicación y expansión de estas lesiones para dar a lugar a metástasis ya establecidas, clínicamente detectables y sintomáticas. Son estos focos de crecimiento los que ponen en jaque el correcto funcionamiento de los órganos, generando fallas fisiológicas que son, como se nombró previamente, las principales causas de mortalidad por cáncer.

Como se puede observar, el desarrollo de focos metastásicos es un proceso poco eficiente, durante el cual las células deben atravesar por rondas de selección clonal, siendo sólo una pequeña proporción de las células que comienzan la diseminación desde el tumor primario las que logran establecerse en el órgano secundario. Sumado a esto, no todas las células que logran sortear todos los pasos de selección pueden reanudar su crecimiento una vez que arriban al órgano blanco, sino que se establecen como micrometástasis o DTCs “dormidas”, que pasan por un proceso de quiescencia reversible, conocido también como *dormancy*, propiciado por diferentes factores en los que se profundizará a lo largo de este trabajo. Es por esto que en la actualidad no es suficiente el abordaje del proceso de metástasis sólo desde la perspectiva clásica de la cascada metastásica, como una serie de pasos ordenados y consecutivos, sino que se debe también comprender procesos anexos, claves para un entendimiento más completo de la enfermedad oncológica, y por ende, para la evaluación de nuevas terapias contra esta patología.

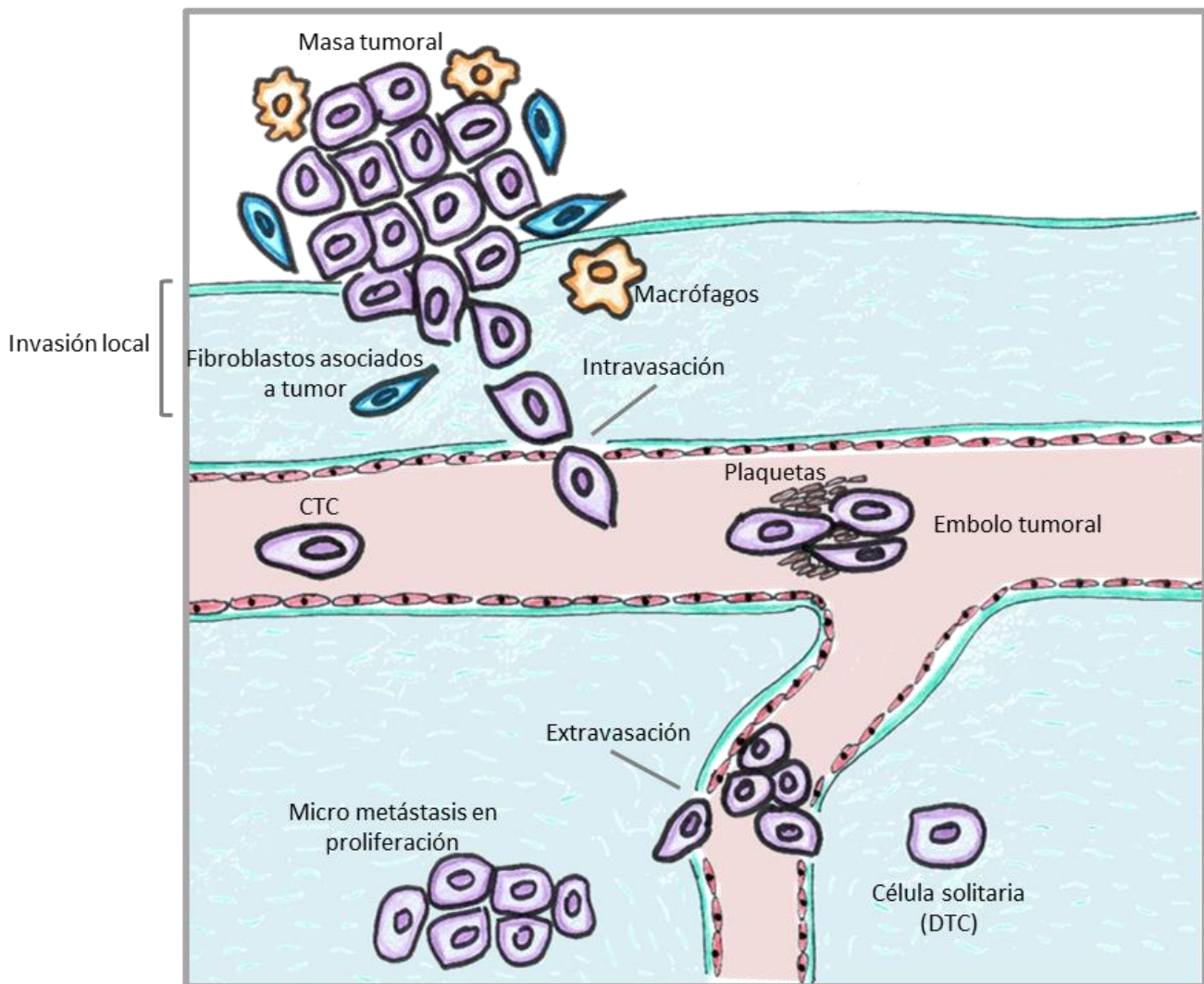


Figura 1. Representación gráfica de la cascada metastásica. El primer paso dentro del proceso de metástasis ocurre cuando las células tumorales reorganizan su citoesqueleto y comienzan a secretar factores que favorecen la movilidad y la invasión de los tejidos circundantes. El estroma tumoral (ejemplificado en este caso por macrófagos y fibroblastos asociados a tumor) ayuda en el proceso de diseminación, a partir de la secreción de factores pro-migratorios y permeabilización de vasos sanguíneos. De esta manera, las células tumorales ven facilitado el proceso de intravasación. Una vez que alcanzan el torrente sanguíneo pueden mantenerse como células circulantes (CTC) o conformar un émbolo que promueve la supervivencia en sangre, impidiendo el daño mecánico. Cuando se adhieren al endotelio en el órgano blanco, estas células se arrestan en la microvasculatura para dar a lugar al proceso de extravasación. Si la célula encuentra un ambiente apto o se encuentra fenotípicamente preparada, entabla el proceso de duplicación y se establece como una micrometástasis. Caso contrario esta célula puede tener otro destino, y establecerse como célula solitaria en quiescencia o como una masa tumoral quiescente.

Enfermedad mínima residual y *dormancy*: definición y descripción de los diferentes tipos de quiescencia.

La simplificación clásica del proceso metastásico, como una cascada de sucesos que se dan de forma ordenada, ayudó a comprender el complejo conjunto de propiedades biológicas que son necesarias para la progresión de la enfermedad metastásica¹⁷. En el último tiempo, se llegó a profundizar en el conocimiento sobre este proceso, y en particular se comenzó a estudiar el fenómeno conocido como quiescencia o *dormancy* del cáncer como un paso fundamental dentro de la progresión de la enfermedad.

Con frecuencia se registran recaídas de pacientes con la aparición de metástasis en órganos secundarios un tiempo considerable después de la remoción quirúrgica del tumor primario y los tratamientos habituales. Como se apuntó previamente, en el cáncer de mama este hecho es muy común, observándose períodos libres de enfermedad que pueden abarcar años o décadas, con posterior aparición de metástasis. Estas metástasis se originan invariablemente a partir de células que diseminaron a partir del tumor primario, pero que permanecieron dormidas, ya sea en la circulación (CTCs, de “Células Tumorales Circulantes”) o en el órgano blanco (DTCs). Esta enfermedad que permanece en el paciente luego del tratamiento es lo que se conoce como Enfermedad Mínima Residual (EMR) y representa un desafío clínico por dos motivos: por un lado, esta enfermedad es asintomática y no se puede detectar a través del uso de los sistemas de detección disponibles para los chequeos de rutina. Por otro lado, las células que se encuentran dormidas son refractarias a los tratamientos clásicos que se utilizan en pacientes oncológicos, debido a que en general, las terapias apuntan a células que tienen exacerbada su capacidad de replicación y, como se mencionó, estas células no se encuentran en replicación activa. Es importante aclarar que esta explicación actualmente está bajo revisión, y otro tipo de mecanismos de resistencia han sido propuestos, los cuales se explicarán en los apartados que se desarrollarán a lo largo de la introducción.

En las siguientes secciones se procederá a explicar en profundidad los diferentes aspectos relacionados con la quiescencia tumoral, el estado del arte en lo que respecta a las señales que se ponen en juego a la hora de determinar el pasaje del fenotipo *dormant* hacia un fenotipo proliferativo, los modelos de estudio actuales, entre otros temas.

Dormancy celular y tumoral

El proceso de quiescencia en cáncer se puede dar tanto a nivel celular como a nivel tumoral. En el primer caso, se habla de *dormancy* celular, y en el segundo caso de *dormancy* de masa tumoral (Figura 2). A pesar que son sucesos que se encuentran relacionados, y cuya consecuencia es el cese temporal del crecimiento, para cada uno de los casos hay diferentes mecanismos que se ponen en juego para promover ese estado. Resulta importante destacar que aunque hasta el momento se hizo referencia al proceso de quiescencia en el marco de la diseminación metastásica, las recaídas pueden darse también a nivel local, o sea, en el mismo lugar donde se encontraba situado el tumor primario. Su origen en este caso son células residuales que permanecen como remanente luego de la extirpación y el tratamiento primario. Las recaídas locales se denominan recidivas.

La quiescencia o *dormancy* celular es el resultado de la activación de mecanismos internos celulares, en general como respuesta a una presión externa dada por condiciones no favorables para el crecimiento, que llevan a un estado de arresto del crecimiento. Estas células detienen su replicación a través del bloqueo del ciclo celular en el estadio G0/G1, y permanecen de esta manera hasta reanudar la proliferación. Las señales que se prenden y apagan durante la transición proliferación-quiescencia-proliferación es uno de los principales interrogantes de aquellos que estudian este tema. Es claro que la información que se obtiene a partir de estas investigaciones resulta invaluable a la hora de detectar nuevos blancos terapéuticos para evitar la reactivación de las señales proliferativas, y de esta manera, las posteriores recaídas.

Durante el estado de *dormancy* de una masa tumoral, al contrario que en el caso que se explicó previamente, las células se encuentran en proliferación activa, sin embargo, su entorno no es el propicio para que estas microlesiones puedan entablar su crecimiento para conformarse como una metástasis consolidada, o una recidiva local. En este caso, el balance entre células en división y células que entran en apoptosis se encuentra en equilibrio, por lo cual el resultado de esta ecuación es una lesión que no crece. Existen dos atenuantes para el crecimiento, que son los más comunes y estudiados. Por un lado, la respuesta inmune del paciente, y por el otro, el impedimento para la formación de nuevos vasos sanguíneos, como consecuencia de un exceso de señales anti-angiogénicas por sobre las señales pro-angiogénicas.

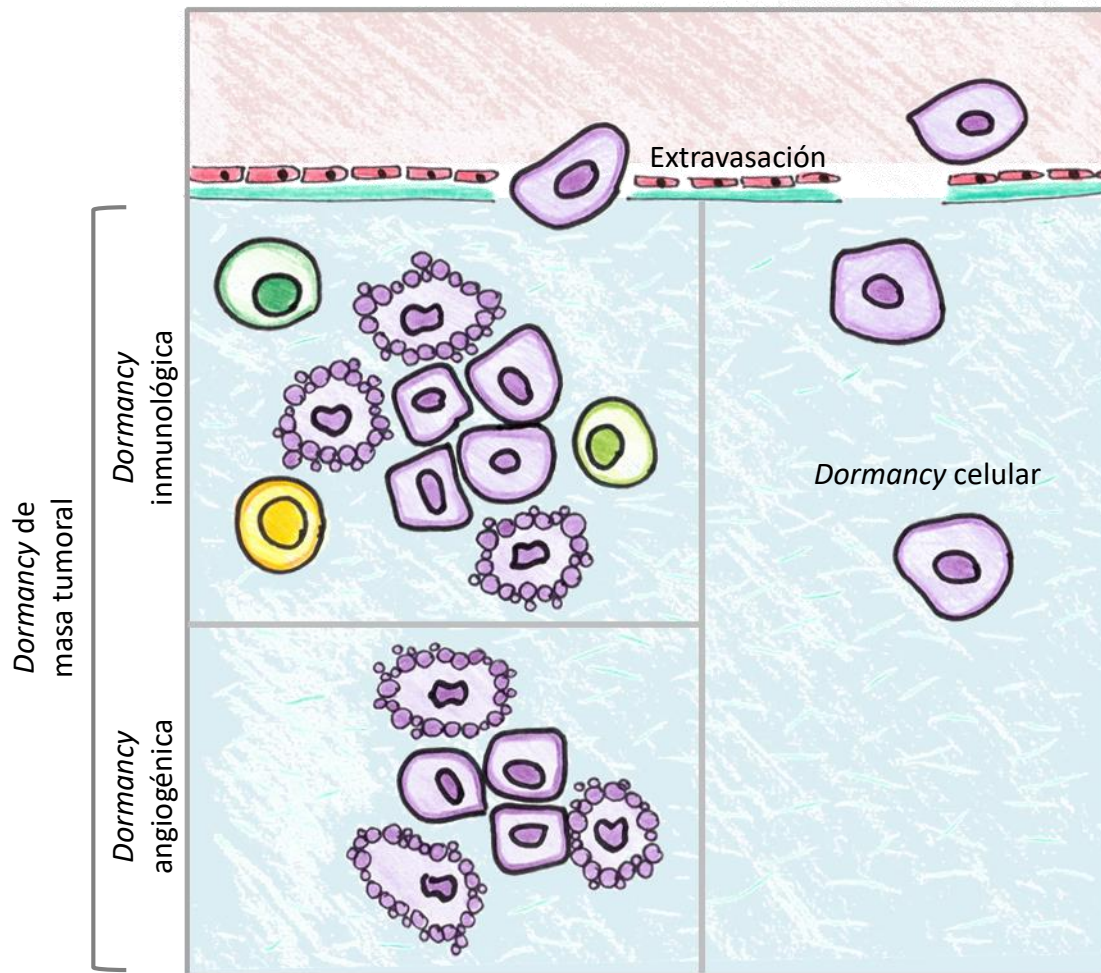


Figura 2. Dormancy celular y de masa tumoral. El fenómeno de *dormancy* o quiescencia de masa tumoral se da por un equilibrio entre el número de células que proliferan y aquellas que entran en apoptosis. La consecuencia de esto es que la masa tumoral no agrande su tamaño. Este fenómeno se puede producir tanto por la acción del sistema inmune (células NK, linfocitos T CD 4+ y T CD8+, mayoritariamente), como por la ausencia de una vasculatura que pueda sostener la expansión de la nueva lesión (producto de un balance negativo de factores pro-angiogénicos en relación a los anti-angiogénicos). Esto se define como *dormancy* inmunológica y *dormancy* angiogénica, respectivamente. Por otra parte, el fenómeno de *dormancy* celular se da por el arresto del crecimiento de una célula diseminada solitaria. En este caso, existen varios factores determinantes, pudiendo listarse entre ellos: fallas intrínsecas en las células, presencia de señales inhibitorias del microambiente, o selección de células quiescentes en tumor primario, como respuesta, por ejemplo, a bajas concentraciones de oxígeno.

Dormancy en células solitarias

Existe un importante número de evidencias que apoyan el concepto de que las DTCs que no son capaces de proliferar cuando llegan a un órgano secundario son aquellas que no están totalmente preparadas a nivel genético y epigenético para encarar el crecimiento en el nuevo órgano blanco, y por lo tanto entran en quiescencia hasta lograr su completa adaptación. Se piensa que el primer punto clave es una falla en la capacidad de adhesión de estas células, y la falta de señales que propicien la replicación¹⁸⁻²⁰.

Respaldando esta idea se encuentra por ejemplo un compendio de trabajos realizados en un modelo de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, donde se ha demostrado que para la proliferación de estas células de manera heterotópica se necesita la presencia de ciertos receptores y sustratos de dichos receptores, y que una vez que estas interacciones se establecen se da a lugar a la cascada de señales mitogénicas necesarias para la colonización metastásica. Dentro de los receptores celulares se encuentran el receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR), que a su vez recluta y activa a la integrina $\alpha 5\beta 1$. La actividad de esta integrina depende de la unión a su sustrato natural, las fibrillas de Fibronectina (FN). Se ha establecido también que este *cluster* de membrana contiene al receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) en su conformación dimérica activa. Este conglomerado de receptores recluta a la quinasa de adhesión focal (FAK) y comienza un influjo de señales mitogénicas a través de la vía Ras-ERK. Pero cuando las condiciones no están dadas para el crecimiento o no se expresan los receptores adecuados, se observa un comportamiento antagónico, que lleva a un estado de *dormancy* y la activación de vías de supervivencia. La quinasa p38 se activa, como eje de esta respuesta, lo cual, llamativamente, lleva a la inhibición de la actividad de ERK. Es así como se establece una tasa de actividad ERK:p38, que se propone como determinante del fenotipo y el estado de crecimiento. Cuando esta proporción de señales es alta, las células están volcadas hacia el fenotipo proliferativo. Por el contrario, cuando es baja, la célula es proclive a la entrada en un estado de arresto del crecimiento²¹⁻²⁴.

En otros tipos tumorales se ha estudiado la importancia de otras vías de señalización como determinantes del destino de las DTCs. En células diseminadas derivadas de pacientes con cáncer de mama se ha determinado que la inhibición de la vía de PI3K y Akt provoca la aparición del fenotipo quiescente²⁵. Dicha observación también se pudo replicar en el modelo de carcinoma de cabeza y cuello referenciado en el párrafo anterior²⁶. En líneas tumorales de ovario y páncreas, por otra parte, se comprobó que la actividad de una quinasa denominada DYRK1B (del inglés *Dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1B*) es la responsable del bloqueo de la maquinaria proteica involucrada en la transición de las diferentes etapas del ciclo celular, promoviendo por lo tanto el estado de *dormancy* celular²⁷.

Estos son sólo algunos ejemplos de las vías que han sido reportadas como moduladoras del fenotipo de las DTCs en el proceso de colonización del órgano blanco. De todas formas, algunos estudios recalcan que existe otro factor involucrado en esta respuesta, y son las señales inhibitorias provenientes del microambiente que aporta el órgano diana. Kobayashiet al.²⁸ demostraron que proteínas derivadas del estroma óseo, como la proteína morfogenética ósea 7 (BMP7) es la causante de lo que ellos llaman un estado de senescencia reversible en células *stem-like* (CSCs) de cáncer de próstata. Aquí es necesario realizar una aclaración, debido a que por definición el estado de senescencia es un estado no reversible, por lo tanto es más correcto referirse a las observaciones de estos autores como el favorecimiento de un estado quiescente, que incluye la activación de la quinasa p38, un aumento en la expresión de p21 (inhibidor del ciclo celular) y del gen supresor de metástasis NDRG1 (Gen 1 regulado río abajo por N-myc). *In vivo*, observaron que el tratamiento con BMP7 suprime el crecimiento de las CSCs inyectadas de forma intratibial, y que al retirar BMP7 se recupera la capacidad proliferativa de estas células. Los autores aseguran que el tratamiento con BMP promueve la diferenciación de las células pluripotentes, por lo tanto reafirman la idea de que el estado *dormant* va de la mano con un proceso de diferenciación, mientras que la tumorigénesis se favorece por la adquisición de un fenotipo relacionado a la pluripotencia y la capacidad de autorrenovación.

Recientemente comenzó a tener peso una hipótesis que relaciona la inducción del estado de quiescencia celular con la hipoxia. En un modelo de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Hep3) y en células de cáncer mamario MDA-MB-231, se observó que bajo condiciones de hipoxia, tanto *in vitro* como *in vivo* se induce la formación de una subpoblación con características *dormant* que es capaz de sobrevivir durante largos periodos en pulmón, y son resistentes a la terapia con cisplatino. En condiciones de normoxia, esta población es mucho menor, así como su supervivencia en pulmón. La subpoblación *dormant* sobreexpresa un receptor nuclear que se supone que es clave para la entrada en quiescencia, denominado NR2F1. Esta proteína, en conjunto con el Factor Inducido por Hipoxia 1 α (HIF1 α), mantienen altos niveles de expresión del inhibidor del ciclo celular p27. Lo interesante, es que en este caso se vuelve a proponer a p38 como una proteína mediadora clave de la entrada en quiescencia, siendo que p38 es activado en condiciones de hipoxia, y está demostrado que la actividad de esta proteína aumenta la expresión de NR2F1 y HIF1 α ²⁹.

Respaldando la hipótesis de la hipoxia como inductor del estado de *dormancy*, en un trabajo publicado en el 2017, Endo y colaboradores reportaron que en cultivos primarios derivados de pacientes con cáncer pulmonar, crecidos en un formato conocido como CTOS (del inglés *cancer tissue-originated spheroids*), al ser sometidos a condiciones de hipoxia se observa como resultado la entrada en quiescencia. Se relacionó este fenómeno con el aumento de la expresión de MIG6, que a su vez reduce la actividad de las vías PI3K/AKT y Ras/Raf/MEK/ERK1/2. Las muestras de origen contenían mutaciones activadoras de EGFR, y luego de la entrada en el estado de *dormancy*, estas células fueron refractarias al tratamiento con inhibidores de EGFR y a la radioterapia³⁰.

De esta manera, se puede sumar un tercer componente al grupo de inductores de la quiescencia. A los defectos intrínsecos de las células y las señales inhibitorias provenientes del órgano a colonizar, se suma una selección que se da a nivel del tumor primario. La hipoxia en este caso se propone como una fuente de heterogeneidad tumoral, dando a lugar al fenotipo *dormant* de forma previa a la etapa de la diseminación.

Dormancy de masa tumoral

Tal como se explicó en los incisos anteriores, existe un tipo de quiescencia que no tiene que ver con el arresto del ciclo celular, sino que está ligada a un balance negativo entre células que se duplican y células que entran en apoptosis. En estos casos, pequeñas micrometástasis no logran sobrepasar un umbral de crecimiento, en respuesta a dos barreras clave: la ausencia de una microvasculatura que pueda proveer de nutrientes y correcta oxigenación a las células tumorales, y la acción del sistema inmune del huésped que reconoce a esa nueva formación como un crecimiento “anormal”, en un proceso conocido como inmunovigilancia. Estos procesos tendrían lugar una vez que las DTCs quiescentes logran sortear los mecanismos que determinan la entrada en quiescencia celular, y ven restablecida su capacidad proliferativa.

A pesar de que estos sucesos se observan en órganos distantes, se puede establecer un paralelismo con lo que sucede a la hora de entablar el crecimiento por parte de un tumor primario. Luego de sufrir el proceso de transformación neoplásica, el nuevo foco de crecimiento tumoral se encuentra con los mismos obstáculos que las micrometástasis. El tiempo que le toma a una célula pasar por el proceso completo de transformación neoplásica, y luego conformarse como un tumor se denomina “latencia tumoral”, y en ciertos puntos clave guarda estrecha relación con los mecanismos de quiescencia de masa tumoral.

A continuación se explicarán los dos tipos de *dormancy* de masa tumoral, haciendo foco en algunos de los principales métodos de regulación y de escape por parte de la masa tumoral en crecimiento reportados hasta el momento.

Dormancy angiogénica

El estado de quiescencia de masa tumoral, como consecuencia de una falla en la correcta vascularización para sostener el crecimiento de las micrometástasis es lo que se conoce como *dormancy* angiogénica. Para que las micrometástasis logren crecer más de 1 o 2 mm deben inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos, habiendo pasado previamente por un proceso denominado *switch* angiogénico, dado por el aumento de las señales pro-angiogénicas, por sobre las señales anti-angiogénicas.

Dentro de las proteínas supresoras de angiogénesis se encuentra por ejemplo la Trombospondina 1 (TSP1), cuya regulación positiva se ha demostrado que lleva a una vascularización deficiente, limitando la progresión de la enfermedad e induciendo un estado de quiescencia, en modelos *in vivo* de mama y glioblastoma, entre otros. Esta proteína regula de manera directa a las células endoteliales, inhibiendo la migración e induciendo su entrada en apoptosis. Por otra parte, también inhibe la movilización de factores pro-angiogénicos y su acceso a los co-receptores presentes en la superficie de las células endoteliales³¹.

Dentro de los factores pro-angiogénicos, uno de los principales es el VEGF (Factor de crecimiento endotelio vascular). Se ha demostrado que este factor no sólo es clave para la migración y proliferación de las células endoteliales, sino que también es capaz, en conjunto con una proteína denominada β -defensina, de reclutar células del sistema inmune (precursores de células dendríticas, particularmente) que pueden ser diferenciadas hacia un fenotipo similar al de las células endoteliales, por lo que se denominan células inmunes pro-angiogénicas³². En un trabajo del año 2012, Straume y colaboradores demostraron otra forma de regulación de la angiogénesis, a través de la acción de la chaperona HSP27 (proteína de shock térmico de 27 kDa). La regulación negativa de HSP27 provoca una merma en la secreción de factores pro-angiogénicos, como VEGF-A y VEGF-C, y se ha demostrado que dicha regulación negativa en cáncer de mama provoca la entrada en el estado de *dormancy*, mientras que su regulación positiva provoca la salida de este estado y

el aumento en la densidad vascular. En muestras clínicas de pacientes con tumores mamarios y melanoma, se demostró que la expresión de HSP27 correlaciona con la expresión de marcadores de agresividad y baja supervivencia³³.

La expresión de las proteínas que se nombraron hasta aquí puede regular a nivel local la formación de nuevos vasos. Sin embargo, existe otro tipo de regulación que se da a nivel sistémico, y también puede explicar la entrada y el escape del estado de *dormancy* angiogénica. Esta regulación sistémica actúa a través de la secreción de factores pro y anti angiogénicos por parte del tumor primario, de esta manera estimulando o reprimiendo el *switch* angiogénico. En el último tiempo se ha propuesto que el tumor primario es en varios casos partícipe de la preparación de un nicho metastásico para las células que diseminan. Uno de los ejemplos es mediante la secreción exacerbada de factores pro-angiogénicos. De esta forma, el tumor primario puede sostener el crecimiento de metástasis promoviendo la vascularización a distancia³⁴.

Existen casos donde el fenómeno que se da es exactamente el opuesto. El tumor primario controla la progresión de las lesiones metastásicas mediante la secreción de factores anti-angiogénicos. En el caso nombrado en el párrafo anterior, la cirugía del tumor primario impediría a su vez el crecimiento metastásico, debido a que se extirpa la fuente de factores pro-angiogénicos. En el caso opuesto, la cirugía implicaría el favorecimiento del *switch* angiogénico, con lo cual no sería beneficioso para el paciente³⁵. En línea con esto, Dillekas y colaboradores alertan sobre los peligros de las cirugías reconstructivas mamarias que se realizan tiempo después de la remoción tumoral, debido a que los procesos de sanación y cicatrización pueden inducir, entre otros efectos, un aumento transiente de factores angiogénicos en la circulación, y una reducción de factores anti-angiogénicos, aportando al proceso de salida del estado de *dormancy* angiogénica por parte de las micrometástasis³⁶.

Dormancy inducida por el sistema inmune

El sistema de control que ejerce el sistema inmune del huésped sobre el crecimiento de tumores se denomina "Inmunoedición". Este mecanismo cuenta con tres etapas: eliminación, equilibrio y escape. Durante la etapa de eliminación, células de la inmunidad innata y adaptativa atacan a las células transformadas. En este proceso, las células T citotóxicas y las células NK conforman la principal barrera contra el crecimiento ³⁷. En algunos casos se da la aparición de un subclon que es resistente al ataque de las células inmunes, y logra proliferar. En este punto, se da un balance entre la proliferación y el control inmune, y es lo que se conoce como la fase de equilibrio, o la etapa de *dormancy* inducida por el sistema inmune, propiamente dicha. La etapa final es la etapa de escape, en la cual luego de varias rondas de inmunoedición se seleccionan sólo las subpoblaciones resistentes, que logran escapar del control y se establecen como una macro-metástasis ³⁸.

En el control del crecimiento, la acción de las células T citotóxicas es clave, ya que son las mediadoras del proceso de citólisis. En modelos murinos de depleción de células T CD8+ y CD4+ se observó la inducción del escape del estado de *dormancy*, siendo estos resultados respaldados por estudios clínicos en los cuales se observa una correlación entre la proporción de células T de memoria con respecto a células T CD8+ y CD4+ en la médula ósea de pacientes con cáncer de mama, con la presencia de tumores de mayor tamaño. Adicionalmente, se ha reportado que en pacientes que presentan en su médula ósea DTCs, también se observan altos niveles de células NK, macrófagos y linfocitos T^{39, 40}.

Existen varias vías de escape del control inmunológico por parte de las células tumorales. Una de las posibilidades es que dichas células dejen de producir el antígeno reconocido por los receptores de las células T. Otro de los mecanismos incluye la expresión de proteínas regulatorias del sistema inmune. Un ejemplo de esto es la expresión de PD-L1, como respuesta a la liberación de IFN- γ por parte de las células T CD8+ que se encuentran en el microambiente tumoral. PD-L1 al unirse con los receptores PD1 que se encuentran en la superficie de la célula T CD8+ promueve la inhibición de su replicación en los nódulos

linfáticos, de esta manera limitando la acción de las células citotóxicas⁴¹. Estos autores también explican la relación entre la salida del estado de *dormancy* por control inmunológico y la supresión inmune. Se ha reportado que pacientes inmunosuprimidos (los recipientes de órganos trasplantados, por ejemplo) tienen un mayor riesgo de incidencia de tumores altamente inmunogénicos (como el melanoma) o que son inducidos por infecciones virales (como el cáncer de cérvix). Llamativamente, este aumento en la incidencia no sucede en el caso de tumores de baja inmunogenicidad como el cáncer de mama, próstata y ovario. Esta evidencia lleva a la hipótesis de que las células altamente inmunogénicas son mantenidas como una micrometástasis quiescente en la fase de equilibrio, y que el debilitamiento del sistema inmunológico provoca el escape.

Estos son sólo algunos de los ejemplos de respuestas inmunes y métodos de escape por parte de las células tumorales. El rol del sistema inmune en el proceso de quiescencia está todavía en estudio, a pesar de esto, la cantidad de información que pudo ser recopilada hasta el momento es enorme, y de una complejidad creciente a medida que se avanza en la profundización de estos conocimientos. Las explicaciones que se incluyeron en este inciso son simplificaciones de una compleja red de sucesos, con el fin de subrayar su relevancia a la hora de analizar la quiescencia de masas tumorales y su posterior crecimiento como metástasis o recidivas.

Relevancia clínica de la EMR y posibles enfoques terapéuticos

Como se explicó previamente, la relevancia a nivel clínico de la presencia de DTCs, CTCs y micrometástasis quiescentes reside en su potencial rol como iniciadores de nuevos focos secundarios de crecimiento que podrían resultar letales. En el caso del cáncer mamario, por ejemplo, la presencia de DTCs en médula ósea, así como también la permanencia de dichas DTCs luego de la terapia adyuvante se constituyen como marcadores de un pronóstico desfavorable para los pacientes. Debido a que el acceso a muestras de médula resulta un proceso invasivo, se intenta realizar un monitoreo a partir de

la detección de CTCs en sangre, cuya presencia también se ha reportado como mal pronóstico clínico⁴².

Tal como se explicó previamente, las células quiescentes no responden de manera favorable a terapias que apuntan a frenar la replicación exacerbada característica de las células tumorales, debido (en parte) al cese en la proliferación inducido por el arresto del ciclo celular. Teniendo esto en cuenta, se han propuesto diferentes tipos de enfoques terapéuticos. Por un lado, la búsqueda de terapias que mantengan a estas células dormidas, entendiendo que no será posible erradicar de manera completa la enfermedad pero si la evasión de cualquier reactivación del crecimiento. Para esto, es evidente la necesidad de investigar a fondo los mecanismos clave en la regulación de este estado ⁴³. Se estima que la terapia metronómica (la administración de quimioterapia en bajas dosis de manera sostenida en el tiempo), es un ejemplo de este tipo de terapias, ya que actuaría manteniendo el estado de quiescencia, no sólo mediante la activación de vías que inducen este estado, sino también al favorecer la acción del sistema inmune y evitar el proceso de angiogénesis, lo que frenaría el crecimiento de micrometástasis quiescentes ⁴⁴. Otro enfoque posible es despertar estas células y de esta manera inducirlas a responder a las terapias⁴⁵. En este caso, también sería de primera necesidad contar con un conocimiento profundo de los mecanismos de señalización internos, y es sin dudas un enfoque que representa un riesgo muy alto.

En concordancia con lo anterior, es necesario recalcar que a partir del entendimiento de los procesos puestos en juego en la progresión desde la quiescencia hacia la proliferación, se han podido delinear nuevas terapias con potencial aplicación. Por ejemplo, un hecho clave que se ha observado es que las células quiescentes tienen activas sus vías de supervivencia. Es así como la inhibición de estas vías, junto con la terapia clásica, ha sido propuesta como una alternativa terapéutica. Otra observación importante es que las células iniciadoras del crecimiento metastásico presentan un fenotipo similar a una célula *stem*. Se asume entonces que sus mecanismos de resistencia a las drogas no sólo están ligados a la sobreexpresión de transportadores como respuesta a la mutación oncogénica

(como los clásicos transportadores del tipo ABC) sino que probablemente tengan activos como segunda barrera de resistencia mecanismos relacionados a células *stem*, y son esas vías las que deberían regularse para revertir la multirresistencia⁴⁶.

Objetivos

Formulación de los objetivos generales y particulares

A partir de lo expuesto como introducción de este trabajo, queda claro que la comprensión del proceso de diseminación, quiescencia, y metástasis, junto con el entendimiento de las señales que regulan esta progresión, constituye un marco necesario para el avance en el tratamiento de la enfermedad oncológica. Para ello, no sólo se necesitan evidencias sobre los mecanismos regulatorios claves, que permitirían el desarrollo de nuevas terapias, y la aplicación de terapias ya existentes para el manejo de la enfermedad, sino que también es necesario el desarrollo de modelos de estudio pertinentes, teniendo en cuenta que son la herramienta clave a la hora de estudiar de forma preclínica el efecto de los tratamientos propuestos y también para el estudio y la validación de posibles nuevos blancos. Es así como se presenta el siguiente objetivo general, con los correspondientes objetivos particulares que se desarrollarán a lo largo de los capítulos de esta tesis:

Objetivo General

Evaluación de los eventos moleculares que gobiernan el comportamiento de las células tumorales en proliferación activa y quiescente en el marco de la enfermedad mínima residual a través del uso de novedosos modelos tumorales.

Objetivos Capítulo 1:

Estudio del efecto de la regulación de la actividad de la quinasa p38 en el modelo celular de carcinoma mamario murino F3II.

- Estudiar la implicancia de la modulación de la quinasa p38 en el crecimiento *in vitro* de la línea F3II, en diferentes modelos de cultivo.
- Estudiar el efecto de la inhibición de p38 en aspectos claves de la biología tumoral, como lo son la adhesión, el proceso de *spreading* y la migración.
- Determinar el efecto de la inhibición de p38 sobre la expresión y activación de proteínas claves.

Objetivos Capítulo 2:

Desarrollo de modelos de estudio *in vivo* para el estudio de la diseminación, quiescencia y metástasis

- Desarrollar un modelo de cirugía del tumor primario para la evaluación de la diseminación de células tumorales durante la intervención quirúrgica.
- Estudiar el efecto sobre el crecimiento *in vivo* de las células tumorales ante la modulación de las principales vías de señalización involucradas en la transición proliferación/quiescencia y viceversa.

Objetivos Capítulo 3:

Estudiar con el modelo desarrollado compuestos con blancos moleculares definidos capaces de alterar los estadios de quiescencia y proliferación, tanto en el tumor primario como en las células diseminadas.

- Determinar el efecto del tratamiento con el péptido CIGB-300 sobre el comportamiento *in vitro* de la línea F3II.
- Aplicar los modelos de estudio *in vivo* desarrollados para evaluar el efecto del tratamiento con CIGB-300 sobre la diseminación celular, la quiescencia y el desarrollo de metástasis.

Capítulo 1

Introducción

La familia de quinasas p38

La familia de protein-quinasas activadas por mitógenos (MAPK) p38 tiene como rol fundamental el de integrar los estímulos externos de las células de forma tal de elaborar una respuesta de cara a las señales del ambiente. Es notoria su importancia en la activación de la respuesta ante el estrés celular, como ejemplo de lo mencionado. Esta familia está conformada por cuatro miembros: p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ . Las dos primeras son de expresión ubicua, observándose un patrón de expresión más restricto en el caso de las variantes γ y δ . Estas vías se activan a través de la acción de las MAP quinasas-quinasas MKK3 y MKK6⁴⁷.

La quinasa p38 α se encuentra expresada en altos niveles, y es de las más estudiadas debido a su abundancia y también a la gran cantidad de inhibidores que se han desarrollado para impedir su activación. Se encuentran reportadas más de 100 proteínas blanco para esta variante, la mayoría involucradas en regular la expresión génica. Se ha ligado la actividad de esta quinasa al control de los niveles de producción de moléculas de señalización extracelular, como citoquinas, quemoquinas y factores de crecimiento. También se le atribuyen roles dentro del proceso de diferenciación, arresto del ciclo celular, apoptosis, senescencia y regulación del *splicing*^{47, 48}.

Teniendo en cuenta la cantidad de proteínas *target* que presenta, y la variedad de respuestas que se desencadenan tras su activación, no resulta llamativo que su rol en la tumorigénesis y progresión de la enfermedad oncológica sea, actualmente, una discusión abierta. Se le ha atribuido por un lado, un rol como supresor de tumor. Esto tiene que ver con su actividad pro-apoptótica, mediando por ejemplo la respuesta ante el tratamiento con algunas drogas antitumorales. Por ejemplo, estudios preclínicos con cetuximab, Solanina o simvastatina demostraron que la acción antitumoral de estas drogas dependía de la actividad de p38⁴⁸⁻⁵⁰. Por otra parte, tal como se explicó en la introducción general, p38 ha

sido una de las proteínas propuestas como mediadoras del estado de quiescencia celular en modelos de próstata y de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, entre otros^{51, 52}.

De forma contraria, varios autores le atribuyen a esta quinasa un rol pro tumorigénico. Se observó por ejemplo, que su inhibición suprime la invasión y las metástasis en tumores de pulmón de células no pequeñas⁵³. Adicionalmente, se ha reportado que p38 es responsable de la resistencia a agentes quimioterápicos en células de cáncer gástrico humano⁵⁴. En un modelo murino de tumores mamarios inducidos por la expresión de la oncoproteína PyMT (*polyoma middle T*), la inhibición química de p38 α y β impide el crecimiento de tumores mamarios, aumentando los niveles de apoptosis y frenando la proliferación de células tumorales. El crecimiento *in vivo* de la línea celular MDA-MD-468 también se ve reducido al tratar con el inhibidor LY2228820⁵⁵.

La evidencia creciente del rol pro tumorigénico de p38 la colocó dentro de la lista de candidatos como blancos para el diseño de nuevas drogas antitumorales. En la actualidad, existen aproximadamente 30 registros de ensayos clínicos en los cuales se prueban inhibidores de p38 administrados de forma exclusiva, o combinados con quimioterapia clásica⁵⁶. Sin embargo, teniendo en cuenta que varios reportes le otorgan un rol supresor de tumor y en el mantenimiento del estado quiescente, resulta controversial la administración a pacientes inhibidores de esta quinasa como alternativa terapéutica.

Con el objetivo de estudiar el rol de p38 en los aspectos claves de la biología tumoral y mecanismos claves para la diseminación de células F3II, en principio se llevaron a cabo una serie de ensayos *in vitro* que serán descritos en la sección Materiales y Métodos a continuación.

Materiales y métodos

Líneas celulares y condiciones de cultivo

Para este trabajo se utilizó la línea celular de carcinoma mamario murino F3II. Esta línea celular es una variante sarcomatoide altamente agresiva y metastásica establecida a partir de una subpoblación clonal de un tumor espontáneo originado en un ratón BALB/c⁵⁷. Las células F3II crecen *in vitro* adheridas al sustrato hasta formar una monocapa confluyente. Esta línea es mantenida en cultivos en monocapa en medio de cultivo DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB, Sigma Aldrich), inactivado por calor, glutamina en una concentración de 2 mM y 80 µg/ml de gentamicina. Las células se mantienen en una atmósfera húmeda a 37°C, con gaseo controlado de CO₂ al 5%.

En ensayos *in vivo*, F3II forma tumores altamente invasivos localmente de manera similar en hembras y machos.

Reactivos y anticuerpos

La inhibición de p38 se llevó a cabo mediante la utilización de un inhibidor denominado SB203580 (LC Laboratories), el cual se solubiliza en Dimetil Sulfóxido (DMSO) a una concentración de trabajo 200 veces más concentrada que la concentración final de tratamiento, en el caso de los ensayos *in vitro*. Este inhibidor es un pyridinyl imidazol que se une al sitio de unión de ATP (Figura 3)⁵⁸, impidiendo de esta forma que p38 pueda fosforilar sus sustratos, pero sin afectar la activación de esta proteína por parte de sus MAPKKs⁵⁹. Su capacidad inhibitoria es ejercida de forma equipotente sobre las isoformas α y β , mientras que otras proteínas homólogas como p38 γ , p38 δ , JNK y Erk2 no son inhibidas o sólo de una manera muy débil⁶⁰. Adicionalmente, se ha reportado que este inhibidor replica fenotípicamente la inhibición genética de al menos p38 α ⁶¹.

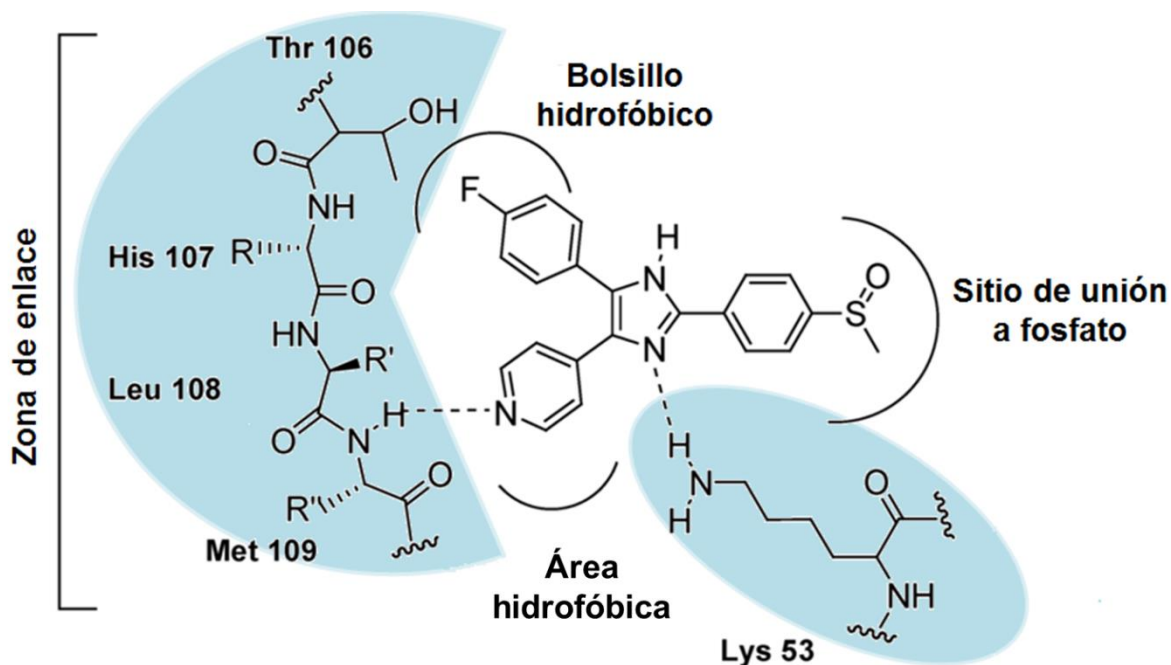


Figura 3. Representación gráfica de la unión entre SB203580 con p38, a partir de estudios cristalográficos y bioquímicos. La unión entre el inhibidor y p38 se da a partir de un enlace puente de Hidrógeno entre el nitrógeno presente en el anillo de piridina y la Met 109, sumado a la unión entre el 4-fluorofenilo y el bolsillo hidrofóbico de la molécula (Modificado de Bagley MC *et al.* 2010).

Los anticuerpos utilizados en este trabajo se listan a continuación: Anti-Erk1/2 (p44/p42), clon MK12 cat. n: 05-1152 (Merck Millipore). Anti-p-ERK (Tyr 204) cat.n: sc-7679-R (Santa Cruz Biotechnology). Anti-tubulina (Abcam). Anti- Integrina $\alpha 5$ conjugado a FITC (Abcam). Anti- E-cadherina (Abcam). Anticuerpos secundarios anti IgG de ratón y de conejo, conjugados a peroxidasa (BioRad). Anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a FITC (Dako).

Ensayo clonogénico con tratamiento con el inhibidor de p38 SB203580

Con el objetivo de estudiar el efecto de la inhibición de p38 en el desarrollo de colonias, se sembraron 600 células F3II por *well* en placa de 24 *wells*, en medio DMEM con 5% SFB. Al momento de la siembra se adicionó la droga SB203580 en las concentraciones

2, 4 y 10 μM . Como control se utilizó el vehículo de la droga (DMSO). Se dejaron crecer las colonias durante 7 días, cambiando el medio y el tratamiento a los 4 días post-siembra. Al séptimo día las células se tiñeron y fijaron durante 30 minutos con una solución de cristal violeta 0.5% en metanol al 20%. Posteriormente se lavaron con agua corriente y se procedió a contar las colonias bajo el microscopio, considerando colonia sólo aquellos conglomerados en los cuales se superaron las 50 células.

Ensayo de proliferación en 2D y 3D

Para estudiar el efecto de la inhibición de p38 en un cultivo 2D, 1.5×10^4 células/*well* F3II se sembraron en medio completo en una placa de 96 *wells*. De forma previa a la siembra, estas células fueron privadas de SFB, al mismo tiempo que se trataron con SB203580, con concentraciones de 2, 4 y 10 μM . Luego de la siembra, nuevamente se trataron las células con las concentraciones de SB203580 detalladas. En el caso del grupo control, se adicionó el volumen equivalente de DMSO. Luego de 72 h de incubación, la proliferación celular se determinó de manera indirecta mediante el ensayo metabólico de MTT según las instrucciones del fabricante (Sigma Aldrich).

Para estudiar el efecto de la inhibición de p38 en formato de cultivo en 3D, se cubrieron las superficies de una placa de 96 *wells* con 50 μl de Matrigel HC[®] (BD Biosciences), reducido en factores de crecimiento, diluido al medio en DMEM. Una vez solidificado, se sembraron 1.5×10^4 células F3II por *well* en 150 μl de medio completo, las cuales fueron previamente privadas de SFB y pre-tratadas con SB203580 en concentraciones de 2, 4 y 10 μM durante 24 h. Al momento de la siembra, se repitió el tratamiento con SB203580. Este tratamiento se renovó los días 4 y 7 después de la siembra, cambiando la mitad del volumen de medio de cultivo completo con tratamiento, para evitar desarmar los esferoides anclados al Matrigel. Cuando se cumplieron 10 días, se

fotografiaron los cultivos y se midió el crecimiento de forma indirecta utilizando el ensayo de proliferación con MTS (Sigma Aldrich) de acuerdo a las instrucciones de uso del fabricante.

Ensayo de adhesión celular

La adhesión celular fue medida como se describió previamente ⁵⁷. Células F3II fueron pre-tratadas durante 24 h con SB203580. Luego, se despegaron del sustrato utilizando una solución de disociación no enzimática (Sigma Aldrich) y se sembraron en una concentración de 1.6×10^5 células/*well* en una placa de 24 *wells*, en medio completo con tratamiento. Después de una incubación de 1 h a 37°C se descartaron las células no adheridas mediante un lavado con PBS. Las células adherentes se fijaron y tiñeron con una solución de cristal violeta al 0,5% y 20% metanol en PBS. A continuación se lavó el excedente de colorante con agua destilada y se solubilizó el colorante en una solución 10% metanol, 5% ácido acético en agua, para luego medir la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

Ensayo de *spreading* celular

Para estudiar el efecto de la inhibición de p38 en la dinámica de *spreading* de la línea F3II, las células fueron sembradas en una placa de 24 *wells* e inmediatamente se trataron con SB203580 a concentraciones de 2, 4 y 10 μ M. Después de una hora de incubación en estufa gaseada, se lavaron las células no adheridas con PBS y se tomaron 4 fotos de cada condición bajo el microscopio de contraste de fase. Luego, se cuantificaron las células en *spreading* por campo fotografiado, y se calcularon los porcentajes de células en *spreading* en relación a la totalidad de células adheridas.

Ensayo de migración en herida

Para determinar el efecto de la inhibición de p38 en la migración celular, 2×10^5 células F3II fueron sembradas en cada *well* de una placa de 6 *wells* y crecidas en presencia de D-MEM suplementado con 5% SFB. Cuando las células alcanzaron 95% de confluencia se realizaron tres heridas sobre la monocapa y la placa se incubó a 37°C durante 16 h, en presencia de 2 y 4 μM de SB203580. 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 *well* fue cuantificada usando el programa NIS Elements Br (Nikon).

Citometría de flujo

Para la detección de la Integrina $\alpha 5$ y de E-cadherinas se llevó a cabo una citometría de flujo. Para esto, se crecieron células F3II en medio completo y se trataron con diferentes concentraciones de SB203580 de 24 a 48 h. Después del tratamiento las células se despegaron utilizando una solución de disociación no enzimática (Sigma Aldrich) y se mantuvieron a 4°C. Las células se lavaron y resuspendieron en un buffer Tyrode-Hepes (1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5.5 mM Glucosa and 1 mg/ml BSA) para luego ser incubadas con los anticuerpos primarios, y luego el anticuerpo secundario (en el caso de la detección de E-cadherinas). Las células se lavaron y se resuspendieron en buffer Tyrode-Hepes frío, y se mantuvieron en hielo hasta ser analizadas por citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences). Anticuerpos monoclonales anti-isotipo fueron utilizados en el caso de los controles negativos. Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo 7.6.

Western Blot

Se sembraron 2×10^5 células F3II en placa de 6 *wells*, en DMEM con SFB 5%. A las 24 horas después de la siembra se cambió el medio de cultivo completo por DMEM con SFB al 2%. Al día siguiente, se trataron las células con SB203580 durante 10 minutos. Las células se lisaron en buffer 150-GLPB (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.5% NP40, 10% glicerol, pH 7.4), se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos y se hirvieron en buffer Laemmli's durante 5 minutos. Las proteínas se resolvieron en un SDS-PAGE 10%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, y se realizó una inmunomarcación con anticuerpos anti ERK1/2, pERK1/2 y Tubulina, y a continuación con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa. Se reveló utilizando el reactivo para quimioluminiscencia Biolumina (Kalium) y se utilizó el equipo C-Digit (LI-COR) para la detección de la luminiscencia y la digitalización de las imágenes. Los resultados se analizaron con el software Image Studio (LI-COR). En todos los casos para la cuantificación se relativizaron las intensidades de las bandas a la intensidad de la banda de tubulina.

Resultados

Efectos sobre el comportamiento in vitro de la línea celular F3II ante la modulación de la actividad de la quinasa p38.

La inhibición química de p38 provoca una inhibición en la proliferación en cultivos 2D de células F3II

Como se explicó previamente, el rol de p38 en la progresión de tumores es una discusión que actualmente permanece abierta. Numerosas publicaciones le asignan un rol supresor de tumor, mientras que otros reportes le adjudican un rol pro-tumorigénico, y otros la señalan como una proteína clave en el mantenimiento del estado quiescente y la supervivencia de DTCs. Como primer paso para el establecimiento de su función en el modelo de carcinoma mamario murino F3II, se comenzó con el estudio de la proliferación en alta y baja densidad de siembra celular, en cultivos del tipo 2D (sin matrices proteicas de crecimiento adicionales), realizando tratamientos con un inhibidor químico de p38 denominado SB203580.

El ensayo de proliferación a baja densidad de siembra, también conocido como ensayo clonogénico, se realiza con el fin de mimetizar el proceso de formación de una masa tumoral a partir de una célula solitaria, que debe iniciar su crecimiento en un nuevo entorno y adaptarse a condiciones ambientales que no son las propicias. En el caso de los ensayos de proliferación con alta densidad de siembra, el proceso de condicionamiento del medio y de adaptación no resulta tan crítico como en el caso previamente explicado, de manera tal que podría relacionarse con el crecimiento de una masa de células más numerosa, con menos barreras que sortear post-siembra.

Al inhibir p38 en el ensayo clonogénico se observó un descenso en la capacidad de formación de colonias para las células tratadas con SB203580 en comparación con su control (células en presencia de DMSO, vehículo del SB203580). Esta inhibición se hace evidente para las concentraciones de 4 y 10 μM ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectivamente, Test de ANOVA contrastado con Tukey), con porcentajes inhibitorios del 30% y 50%,

respectivamente, sin observarse diferencias significativas en el caso del tratamiento a 2 μM (Figura 4.a).

Al momento de evaluar la incidencia de la modulación negativa de p38 en la proliferación con alta densidad de siembra de células F3II, se observa que el tratamiento con el inhibidor SB203580 provoca un descenso en la capacidad proliferativa a 72 horas, para las concentraciones de tratamiento más altas ($p < 0.001$, ANOVA contrastado con Tukey). Los porcentajes de inhibición son de alrededor del 20% para 4 μM y del 35% para 10 μM , siguiendo de esta forma con la misma línea de resultados que la observada para el ensayo clonogénico antes descrito (Figura 4.b).

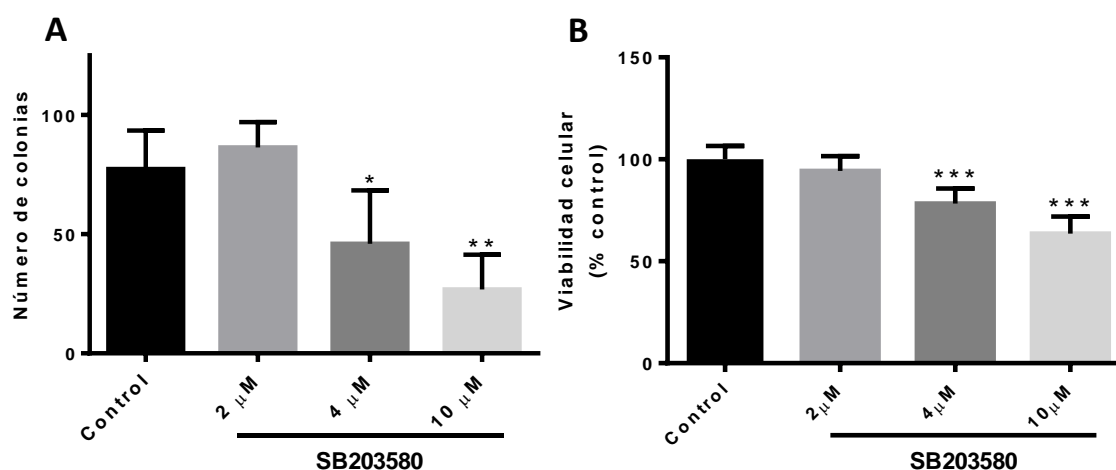


Figura 4. El tratamiento con SB203580 disminuye la proliferación in vitro, en sistemas de cultivo en 2D. **A.** Efecto de la inhibición de p38 en el crecimiento de colonias de células F3II. Las células fueron sembradas en placas de 24 *wells* e incubadas en medio completo con concentraciones de SB203580 entre 2 y 10 μM durante 7 días. El resultado de la cuantificación de colonias se expresa como el promedio de colonias por cuadrante \pm desvío estándar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (ANOVA contrastado por el test de comparación múltiple de Tukey). **B.** Se sembraron células F3II en una placa de 96 *wells*, y se realizaron tratamientos con SB203580 en las concentraciones indicadas, durante 72 h. La proliferación celular se midió indirectamente mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Los datos fueron graficados como el promedio \pm desvío estándar. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (ANOVA contrastado por el test de comparación múltiple de Tukey).

Los modelos de crecimiento *in vitro* sobre superficies plásticas constituyen una herramienta rápida y económica para el estudio de nuevos tratamientos y como una primera prueba para la validación de nuevos blancos. Sin embargo, es evidente que este tipo de modelos de cultivo resultan incompletos a la hora de imitar un entorno de crecimiento *in vivo*, donde la presencia de una compleja matriz extracelular es determinante del comportamiento de las células tumorales que allí residen.

Con el objetivo de replicar de una manera más fiel el crecimiento en un entorno *in vivo*, se decidió utilizar un sistema de cultivo en 3D, adicionando una matriz proteica (Matrigel®) como superficie de crecimiento para las células. En este sistema se estudió el efecto de la inhibición de p38. Este tipo de cultivos se realiza, al igual que el ensayo clonogénico, a una baja densidad de siembra, favoreciendo de esta manera que cada esferoide formado sea producto del crecimiento de una célula individual que se ancla a la matriz. De esta forma, guarda estrecha relación con el proceso mediante el cual una célula solitaria inicia el crecimiento en un órgano *target*.

Llamativamente, se observó que el crecimiento de esferoides conformados por células F3II se ve favorecido por el tratamiento con SB203580, contradiciendo los resultados que se observaron de forma previa en los modelos de crecimiento en dos dimensiones. Mediante microscopía se hace evidente la presencia de esferoides de mayor tamaño, y esto pudo ser cuantificado de manera indirecta a través del ensayo colorimétrico con MTS, demostrando que la cantidad de células viables presentes en dichos esferoides es significativamente mayor (ANOVA, contrastado con Tukey) (Figura 5).

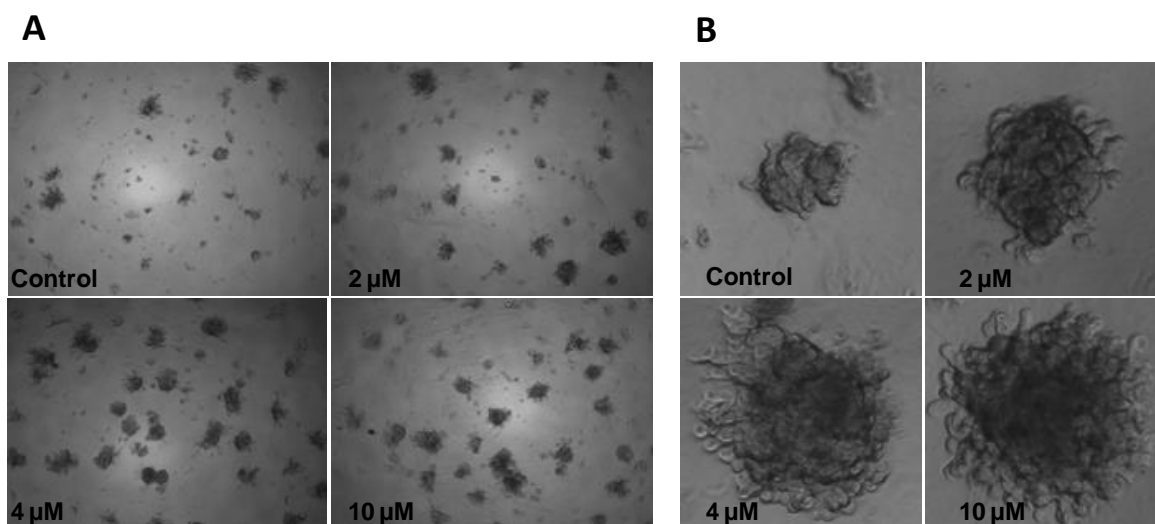


Figura 5. La proliferación de células F3II aumenta en un sistema de cultivo 3D al inhibir p38. A. Células F3II fueron sembradas en placas de 24 wells cubiertas con Matrigel®. Las fotografías fueron tomadas 10 días después del inicio del tratamiento con SB203580 y son representativas de cada condición. **B.** Imágenes representativas de esferoides individuales por cada condición de tratamiento. **C.** Luego de 10 días de tratamiento se llevó a cabo un ensayo metabólico de MTS, para la determinación indirecta de la viabilidad de los esferoides. Se calcularon los promedios de porcentajes con respecto al control de cada uno de los valores de absorbancia medidos por well (n=4 por condición). Las barras representan el desvío estándar. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 ANOVA contrastado por el test de comparación múltiple de Tukey)

Los procesos de adhesión y *spreading* celular son favorecidos al inhibir p38 en la línea celular F3II, sin observarse cambios para el proceso de migración.

Los procesos de adhesión y *spreading* celular son claves al inicio de la colonización de un tejido por las células tumorales, debido a que se conforman las primeras conexiones entre las células y el microambiente que las rodea. En caso de interpretar adecuadamente las señales del entorno, dichas células podrán adaptarse favorablemente al nuevo nicho y de esta manera entablar efectivamente su crecimiento y expansión.

Siguiendo con la caracterización del rol de p38 en la línea de carcinoma mamario murino F3II, se estudió cómo se ven afectados los procesos de adhesión y *spreading* al tratar las células con SB203580. Se observó que en este modelo de estudio la inhibición de p38 aumenta de forma significativa la capacidad de adherirse al sustrato de crecimiento (en este caso, el sustrato estaba conformado por proteínas de matriz secretadas por células F3II crecidas previamente en el mismo *well* donde se llevó a cabo el ensayo posteriormente). El aumento de la capacidad adhesiva se dio de manera concentración-dependiente, con incrementos significativos para todas las condiciones ensayadas (Kruskal Wallis test, Dunn's post-test). Para la mayor concentración ensayada, el porcentaje de adhesión duplica aproximadamente al registrado para las células tratadas con el vehículo control (Figura 6.a).

Teniendo en cuenta el resultado obtenido con respecto a la adhesión celular, se decidió comprobar si ante la inhibición de p38 se observan cambios en la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$, como uno de los puntos determinantes del cambio fenotípico de las células F3II tratadas con SB203580. Para esto, se procedió a la detección mediante citometría de flujo de la subunidad $\alpha 5$ en la membrana de células tratadas con SB203580. De esta manera, se observó que al tratar las células con SB203580 a una concentración de 2 μM , se produce un aumento en el porcentaje de células con expresión en membrana de este tipo integrinas, que alcanza un pico a las 24 horas (donde se duplica el porcentaje de

expresión), mermando a las 48 horas, aunque manteniéndose siempre superior al porcentaje registrado para el grupo control (Figura 6.b).

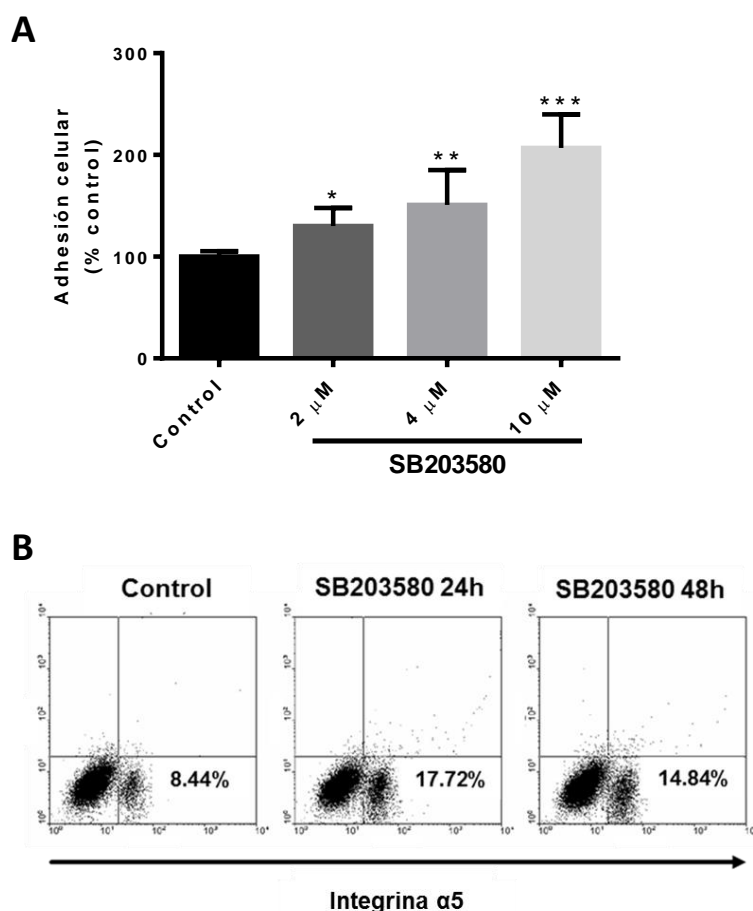


Figura 6. La inhibición de p38 aumenta la capacidad de adhesión de las células F3II, y la expresión en membrana de la integrina α 5. A. Ensayo de adhesión. Células F3II fueron tratadas con SB203580 (2, 4, 10 μ M) o el vehículo (DMSO) durante 12 h y luego sometidas a un ensayo de adhesión celular. Las células que se adhirieron al sustrato fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. Los valores de absorbancia registrados se relativizaron con respecto al control. Los datos se representan como el promedio de los porcentajes \pm el desvío estándar (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 Kruskal Wallis test contrastado con Dunn's) **B.** La expresión de integrina α 5 en células F3II tratadas durante 24 y 48 h con una concentración de 2 μ M de SB203580 se detectó mediante citometría de flujo, observándose un incremento en la expresión de la misma con respecto al control.

Es importante resaltar que no sólo se observó un aumento en la adhesión, sino que también las células que fueron tratadas con SB203580, luego de la adhesión, comenzaron el proceso de *spreading* de manera más rápida. Este fenómeno se observó mediante microscopía, cuantificando las células que con protuberancias como consecuencia de la formación de nuevas adhesiones focales, en relación con la totalidad de células fotografiadas por campo. Al cabo de una hora, se observa que aproximadamente un 35% de las células control se encuentran realizando *spreading*, mientras que para las células tratadas con SB203580 este porcentaje asciende a valores de entre un 50 y un 60%, siendo esta diferencia significativa (ANOVA contrastado por Tukey). Resulta importante aclarar que se fotografiaron también las células luego de dos y tres horas, sin embargo, a estos tiempos la totalidad de las células adheridas se encontraban realizando *spreading*, inclusive aquellas pertenecientes al grupo control (Figura 7).

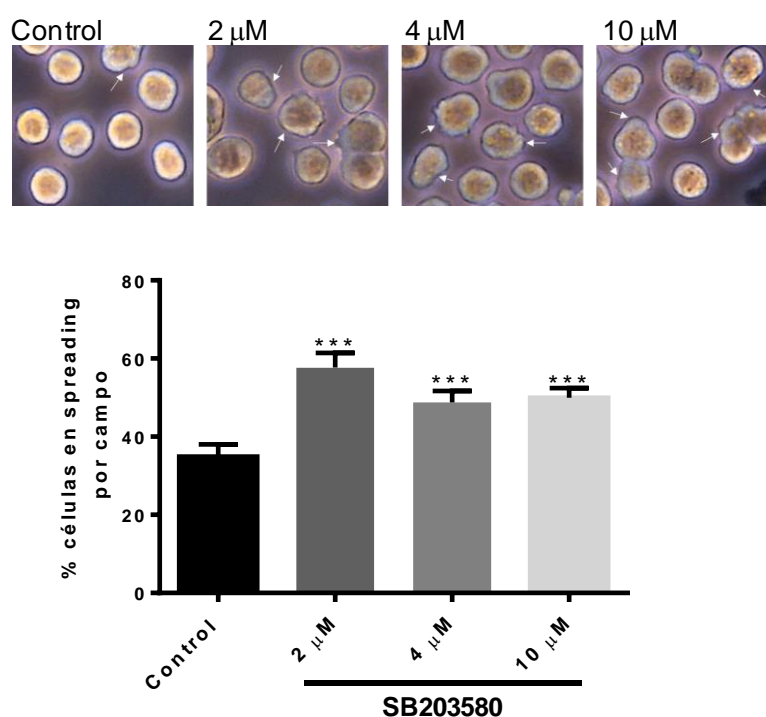


Figura 7. La inhibición de p38 aumenta la capacidad *spreading* de las células F3II. Ensayo de *spreading* celular. Células F3II fueron sembradas en presencia de SB203580 y luego de 1 hora se tomaron fotografías de cuatro campos representativos en un microscopio de contraste de fase. En la parte superior de la figura se muestra una ampliación de los campos fotografiados, para cada una de las condiciones. Las flechas señalan células en *spreading*. Se determinó el porcentaje de células en *spreading* con respecto al total y en el gráfico inferior se representan los valores como promedio de los campos \pm desvío estándar (***) $p < 0.001$ ANOVA contrastado por el test de comparación múltiple de Tukey.

A la hora de encarar el proceso de diseminación, tan importante como la capacidad de adhesión es la migración celular. Previo al establecimiento de las metástasis y del contacto con el nuevo ambiente de crecimiento, las células deben comenzar a migrar e invadir el tejido circundante al tumor primario que conforman. Es por esto que para comprender la importancia de p38 en el proceso de diseminación, también resulta clave estudiar cómo su inhibición afecta esta característica. En este caso, la inhibición de p38 no modifica la capacidad migratoria de las células F3II, para ninguna de las concentraciones probadas de SB203580 (Figura 8.a).

Finalmente, se estudió la relación entre la actividad de p38 con la expresión de E-cadherinas, considerando que esta proteína de membrana es central en los procesos de diseminación y adhesión celular. Como se describió en la introducción general, el nivel de expresión de esta proteína disminuye durante el proceso de transición epitelio mesenquimal, lo cual resulta clave en la adquisición de un fenotipo mótil, y de esta manera, más invasivo, de forma previa a la diseminación metastásica. Por otra parte, el proceso de adhesión al sustrato desencadena señales que provocan un aumento en la expresión de E-cadherinas, favoreciendo de esta manera las uniones célula-célula. Es por estos motivos que decidimos evaluar si la inhibición de p38 provoca cambios en sus niveles de expresión. Como se muestra en la figura 8.b, al realizar una citometría de flujo de células tratadas durante 24 h con SB203580, no se observan modificaciones en el porcentaje de células con expresión de E-cadherinas.

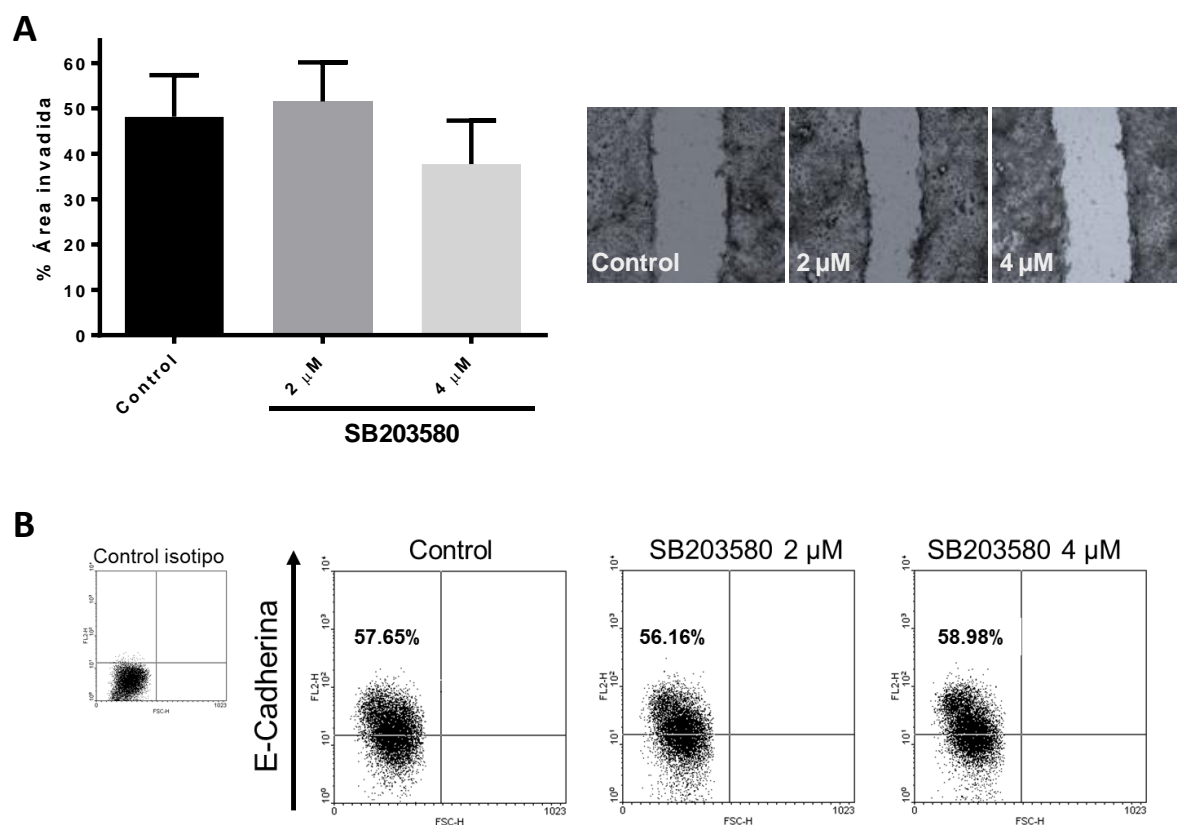


Figura 8. La inhibición química de p38 no provoca cambios en la capacidad migratoria de células F3II, y tampoco altera la expresión de E-cadherinas. A. Ensayo de migración en herida. Células F3II se crecieron hasta alcanzar un 90% de confluencia. En ese momento, se realizaron heridas de igual grosor sobre la monocapa, se comenzó con el tratamiento con SB20358 durante 16 h. Las monocapas se tiñeron luego con azul de toluidina y se determinó el porcentaje de área invadida por campo para cada condición. Se representan los datos como un promedio de dichos porcentajes \pm desvío estándar (10 campos fotografiados por condición). No se registran diferencias significativas entre grupos. A la derecha se presentan fotografías representativas de cada condición ensayada. **B. La expresión de E-cadherinas se determinó mediante citometría de flujo.** Para esto, se crecieron células F3II en placas de 6 fosas. Cuando se alcanzó una confluencia del 60% se realizó un tratamiento por 24 h con las concentraciones indicadas de SB203580. Al finalizar el tratamiento las células se fijaron y se marcaron para realizar la lectura con el citómetro. Como control negativo de la marcación se incluyó un control de isotipo IgG. Los porcentajes de expresión de E-cadherinas no se ven afectados por el tratamiento.

La fosforilación de la proteína mitogénica ERK1/2 se ve favorecida al modular de forma negativa la quinasa p38.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió estudiar qué tipo de respuesta se obtenía al modular p38 en la línea F3II en relación a la actividad de la quinasa ERK1/2, tomando como referencia reportes previos y las características que se vieron afectadas al inhibir dicha quinasa en el modelo elegido. De forma previa se ha reportado en un modelo de carcinoma escamoso de cabeza y cuello una co-inhibición entre p38 y ERK, siendo la actividad de una inhibitoria de su contraparte. La relación entre las actividades de ambas quinasas dictaría el tipo de respuesta celular. Al primar la actividad ERK1/2 las células se encontrarían en proliferación activa, mientras que en el escenario opuesto (activación de p38 con la consecuente inhibición de ERK) se desviaría el destino celular hacia la entrada en el estado quiescente.

En el caso de nuestro modelo central de estudio, se comprobó mediante la detección por Western Blot que la inhibición de p38 provoca un aumento en los niveles de ERK1/2 fosforilado. Por otra parte, el tratamiento con SB203580 no afecta la expresión de ERK1/2 (Figura 9 a y b). Este resultado se relaciona también con el resultado obtenido al analizar el nivel de expresión de la integrina $\alpha 5$. Teniendo en cuenta que la activación de ERK1/2 es consecuencia de un conjunto de señales cuya transducción comienza desde un *cluster* de membrana conformado por varios receptores, entre ellos la integrina $\alpha 5\beta 1$.

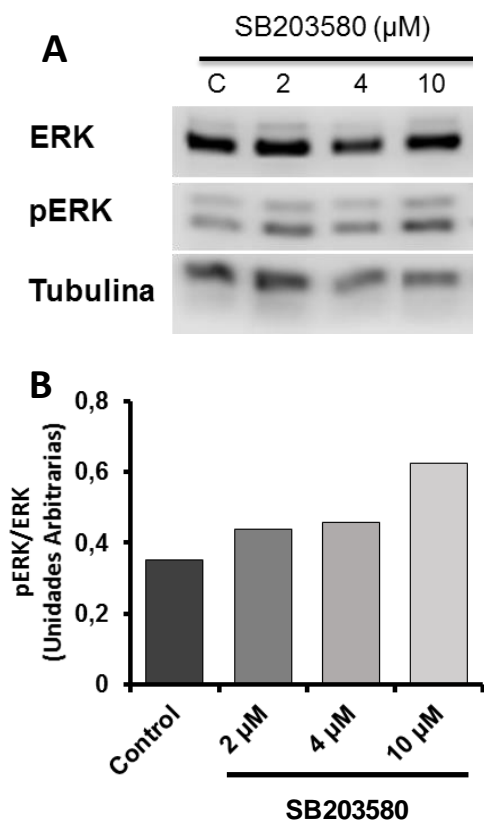


Figura 9. La inhibición de p38 afecta los niveles de fosforilación de ERK.

A. Lisados totales de células F3II tratadas con el vehículo (DMSO) o diferentes concentraciones de SB203580 fueron separados mediante SDS-PAGE, para luego detectar ERK1/2 y fosfo-ERK1/2 mediante Western Blot. Como control de carga se detectó β -Tubulina **B.** Los niveles de ERK y fosfo ERK se determinaron mediante densitometría y normalizados al control de carga en ambos casos. En el gráfico se representan los coeficientes de pERK/ERK para cada una de las condiciones evaluadas.

Discusión

Tal como se describió en la introducción al capítulo 1, las funciones de la quinasa p38 son dependientes de un amplio rango de señales y estímulos, y en consecuencia, el tipo de respuesta es también sumamente abarcativa, y depende de variables como el tipo celular, su grado de transformación, el entorno de crecimiento, entre otras. En particular, en este trabajo se busca relacionar la actividad de esta quinasa con el comportamiento de la línea celular F3II, un modelo de carcinoma de mama de origen murino. Es así como se analizó la respuesta ante la inhibición de la quinasa p38 en diferentes aspectos que son sumamente importantes en la biología tumoral. A continuación, serán discutidos cada uno de los efectos observados de acuerdo al fenómeno estudiado, se comparará lo observado con lo reportado en otros trabajos del área, y se analizarán las implicancias de este tipo de regulación en un entorno de crecimiento *in vivo*.

En cuanto a la capacidad proliferativa de las células F3II, y la inhibición de p38 se obtuvieron resultados antagónicos, dependientes del entorno de crecimiento ensayado. En sistemas de crecimiento en 2D, la inhibición de la quinasa provocó un descenso en la capacidad proliferativa, tanto en cultivos clonogénicos, como en cultivos con alta densidad de siembra durante 72 horas de tratamiento totales. Es así que se puede afirmar que p38 en este escenario resulta clave para el crecimiento de las células de carcinoma mamario. Estos resultados se relacionan con lo ya observado por diferentes autores. Recientemente, Huth y colaboradores⁶² reportaron que la regulación positiva de p38 a través del tratamiento con un péptido denominado LyeTx II, provoca un aumento en la proliferación de la línea celular MDA-MB 231, confirmando el dato al observar que este efecto se ve contrarrestado al co-incubar las células con el inhibidor SB203580. Resulta importante aclarar que este efecto se observó sólo en una de las cuatro líneas celulares de mama utilizadas, y según los autores la respuesta depende del grado de agresividad de la línea. MDA-MB-231 casualmente se trata de una línea con características fenotípicas similares a las de la línea F3II, siendo

ambas agresivas y acomodándose dentro del grupo de líneas celulares hormono independientes.

Sin embargo, los resultados para el ensayo de proliferación en un entorno 3D se enfrentan a lo descrito en el párrafo anterior. En este caso, las células F3II aumentan su crecimiento en forma de esferoides al inhibirse la actividad de p38. Esto a primera vista puede resultar contradictorio, sin embargo existen reportes que muestran cómo el comportamiento de una línea celular es dependiente del tipo de sistema de crecimiento empleado. Como ejemplo, Imamura y colaboradores⁶³ realizaron un estudio de la respuesta de un panel de 6 líneas celulares de mama ante el tratamiento con paclitaxel y doxorubicina en entornos 2D y 3D, encontrando diferencias en las respuestas en 3 de las líneas celulares testeadas. Asimismo, reportan una expresión diferencial de proteínas marcadoras de la proliferación, como es el caso de Ki67.

En una revisión realizada en el 2014, Edmondson y colaboradores describen minuciosamente las diferencias claves que separan a los sistemas de crecimiento en 2D con los sistemas 3D. Una de las características resaltadas es obviamente la arquitectura de los esferoides o agregados celulares, que representan de forma más acertada el formato de crecimiento *in vivo*, manteniendo las uniones célula-célula, la disposición espacial y las interacciones con la MEC. En este trabajo también se describe que las células en entornos 2D suelen modificar su patrón de expresión proteico, particularmente, de aquellas proteínas encargadas de regular el crecimiento, como forma de adaptación. Esta es la causa por la cual con frecuencia se observa que las células en cultivo 2D proliferan más que en formato 3D⁶⁴. Esto podría explicar lo observado en el caso de la respuesta diferencial ante el tratamiento con SB203580 en los diferentes formatos de cultivo empleados.

Por último, es importante resaltar que el formato de crecimiento en 3D resulta interesante en el estudio de la diseminación y la enfermedad mínima debido a que los esferoides conservan características similares a las micrometástasis, o tumores quiescentes. Una de las desventajas que poseen los cultivos 3D es que no son capaces de

imitar el desarrollo de nuevos vasos, por lo que sólo pueden alcanzar cierto tamaño, dado por la capacidad de difusión de nutrientes y gases dentro del esferoide, para luego comenzar con procesos de necrosis y apoptosis. Sin embargo, esto es sólo una falla si pensamos en representar tumores o metástasis consolidadas. En el caso de las masas tumorales quiescentes, no poseen en ese estadio la capacidad de generar nuevos vasos, de hecho es esta una de las variables que mantiene su crecimiento a raya. Con lo cual, esta representación en cultivo 3D pasa a ser una versión bastante fiel de las pequeñas masas tumorales que comienzan a colonizar un nuevo nicho de crecimiento.

En lo que respecta a otros cambios fenotípicos producidos por la inhibición de la quinasa p38, a lo largo de este capítulo se han estudiado dos características adicionales, muy importantes a nivel biológico: la adhesión y la migración. En el caso de la adhesión, la inhibición de p38 provoca un aumento en la capacidad adhesiva de las células F3II, de manera dosis dependiente. Adicionalmente, las células tratadas con SB203580 aceleran el proceso de *spreading*. Estos resultados hablan de una capacidad aumentada de las células de adaptación a un ambiente nuevo. El establecimiento de uniones con el entorno de crecimiento es el primer paso para la transducción de señales hacia el interior de la célula, y de esta manera interpretar su ambiente, adaptarse y comenzar con el crecimiento, que se sabe es dependiente del anclaje a un sustrato de crecimiento.

En el año 2016, Priego y colaboradores reportaron un efecto similar al descrito en este trabajo, en células de carcinoma colorrectal humano. Ellos demostraron que la inhibición química de p38 con SB203580 (a una concentración de 5 μ M, similar a las condiciones utilizadas en este trabajo), provoca un aumento en la adhesión de la línea celular HCT116. Resulta interesante que este efecto también se corrobora cuando se realiza una inhibición de p38 α mediante *knockdown*, en comparación con la línea HCT116 parental⁶⁵.

De forma contraria, Düzgün y colaboradores en el 2017 reportaron que la inhibición de la quinasa p38 en la línea MDA MB 231, mediante la utilización de SB203580, pero

también del inhibidor SB202190, (cuya función inhibitoria la cumple compitiendo con el ATP, y también impidiendo la fosforilación de p38), no genera cambios en la adhesión, con excepción de dos condiciones. Por un lado, el tratamiento a una concentración de 1 μM de SB203580, que provoca un aumento en la adhesión que se mantiene durante las 3 horas de registro del ensayo. Sin embargo, a concentraciones de 5 y 50 μM no observan ningún cambio con respecto al control. Por el otro, el tratamiento con SB202190 a 50 μM tiene un efecto inhibitorio de la adhesión a una hora del tratamiento, pero que se revierte a las 3 horas, alcanzando niveles similares al control⁶⁶.

Esta divergencia entre la respuesta observada en F3II y lo reportado en MDA MB 231 es interesante, y no es la única diferencia reportada por el antes mencionado grupo con respecto a los resultados aquí presentados (más adelante se discutirá, por ejemplo, la diferencia observada en la fosforilación de ERK1/2). Resulta importante entonces, resaltar las evidencias adicionales que respaldan nuestros resultados. Por un lado, fue posible identificar un cambio en la expresión en membrana de la integrina $\alpha 5$ al tratar las células con SB203580. El aumento en la expresión de esta integrina podría interpretarse como una de las causas del aumento en la adhesión de las células F3II. Por otra parte, también se puede relacionar este incremento en la expresión con el aumento en la proliferación celular en cultivos 3D. Las integrinas son receptores de unión a fibronectina, y al establecer interacciones con la matriz, y en presencia de factores de crecimiento del medio, se transducen a través de estos receptores señales mitogénicas, favoreciendo la proliferación celular.

Hasta aquí puede interpretarse que cuando p38 se encuentra activo en la línea celular F3II, regula los procesos de proliferación y adhesión de forma negativa. En ocasiones, se interpreta que la inhibición de la adhesión es un símbolo de aumento de la agresividad, como paso determinante a la hora de aumentar la capacidad migratoria de una célula tumoral, y de esta manera dar inicio al proceso de invasión y diseminación metastásica. Wagner y Nebreda, en un review del año 2009 postularon a p38 como un

regulador de la migración, actuando a través de MK2, que se encuentra río abajo en la vía y que a su vez es intermediaria en la fosforilación de la proteína HsP27, lo que provoca en última instancia una remodelación del citoesqueleto de actina⁶⁷. En línea con esto, varios trabajos reportan una inhibición en la expresión de e-cadherina por parte de p38. Por ejemplo, Lin y colaboradores publicaron un trabajo en el año 2016 en el cual demuestran que en líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, la inhibición de p38 provoca un aumento en la expresión de E-cadherinas. Proponen entonces que p38 regula de forma negativa a nivel transcripcional la expresión de E-cadherinas, fomentando de esta manera la adquisición de un fenotipo más invasivo⁶⁸.

En el antes mencionado reporte de Priego y colaboradores del 2016, se observó que en dos líneas celulares (una de carcinoma colorrectal y otra de fibroblastos embrionarios de ratón) tanto el tratamiento con SB203580 como el silenciamiento de p38 α provocan una disminución en la migración de las células con respecto a sus contrapartes no tratadas y *wild type*, lo que señala a p38 como un modulador positivo de la migración celular⁶⁵.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en lo que respecta a la adhesión, y lo reportado con respecto a la actividad de la quinasa p38 y la expresión de e-cadherinas, se estudiaron los efectos sobre la migración celular en el modelo F3II. Llamativamente, no se observan cambios en la capacidad migratoria de las células F3II con p38 inhibido químicamente con respecto a las células no tratadas. En línea con estas observaciones, tampoco se vieron modificados los niveles de expresión de E-cadherinas para ninguna de las concentraciones de SB203580 utilizadas. Por lo tanto, se puede afirmar que en esta línea de tumor mamario, p38 no se encontraría regulando la migración, de forma contraria a lo que se ha reportado para otras líneas celulares.

Por último, se estudió la regulación cruzada de ERK1/2 por parte de p38. Como se ha explicado previamente, existen reportes que proponen que el rol de p38 como regulador del ciclo celular, promoviendo un arresto del crecimiento, se ejerce a partir de la inhibición de ERK1/2. Teniendo en cuenta la actividad pro-mitogénica de ERK1/2, p38 estaría

entonces inhibiendo el crecimiento de tumores, limitando su capacidad de proliferar. Sin embargo, cabe resaltar que contradiciendo estas afirmaciones, se ha reportado recientemente que la inhibición química de p38 en la línea MDA MB 231 provoca una reducción en los niveles de ERK1/2 fosforilado⁶⁶.

En el caso de la línea celular F3II, se observa un aumento en la fosforilación de ERK1/2 al tratar a las células con el inhibidor SB203580. Este resultado va de la mano con el aumento de la proliferación *in vitro*, en el cultivo en 3D. Este aumento en la fosforilación de ERK1/2 ante la inhibición de p38 podría ser explicado a partir de una serie de observaciones reportadas previamente por otros grupos. Por un lado, la regulación de la activación de ERK1/2 por parte de la fosfatasa PP2A. Esta fosfatasa tiene como blanco a MEK1/2, una quinasa que se encuentra río arriba en la cascada de señales de activación de ERK1/2. A su vez, la activación de PP2A es fuertemente estimulada por p38⁶⁹. De esta manera, al inhibir p38 estaríamos indirectamente afectando la actividad de esta fosfatasa, dando lugar a la activación de ERK1/2.

Por otra parte, existe una relación entre la expresión de integrinas y la activación de ERK1/2. Este hecho resulta muy interesante, dado que se trataría de un círculo de activación que se retroalimenta de forma positiva. La activación de la vía de ERK1/2 a partir de la interacción de las integrinas con las proteínas de la matriz extracelular ha sido reportado ampliamente en distintos tipos celulares, tanto normales como transformados^{21, 70-72}. Teniendo en cuenta el aumento en la expresión de la integrina $\alpha 5$ en la membrana de las células tratadas con SB203580, se puede considerar esta como otra de las causas por las cuales ERK1/2 aumenta sus niveles de fosforilación. Pero lo que es interesante es que existen evidencias que muestran una relación entre la actividad de ERK1/2 con el aumento en la expresión de diferentes integrinas, en células del núcleo pulposo del disco intervertebral⁷³ y también en células de carcinoma de páncreas y melanoma⁷⁴. De esta forma, podemos hipotetizar que existe una continua retroactivación entre estas dos proteínas al inhibir p38 en F3II. Adicionalmente, se ha demostrado que la inhibición de ERK1/2 mediante la

expresión de un dominante negativo provoca la inhibición de los procesos de adhesión y *spreading* celular en células osteoblásticas humanas⁷⁵, un fenómeno exactamente opuesto a lo observado en este trabajo ante el tratamiento con SB203580, lo cual no resulta llamativo teniendo en cuenta que en nuestro modelo se produce un aumento en los niveles de fosfo-ERK1/2.

En resumen, a partir de los resultados obtenidos en este capítulo se puede establecer que la quinasa p38 en la línea F3II cumpliría un rol de supresión tumoral, actuando a través de la regulación del crecimiento y del anclaje a la matriz, afectando tanto la expresión de integrinas como también la activación de ERK1/2. Estas observaciones permitirían predecir una ventaja para las células inhibidas a la hora de entablar el crecimiento *in vivo*, lo cual será desarrollado en el siguiente capítulo.

Capítulo 2

Introducción

Modelos de estudio de diseminación, enfermedad mínima residual y *dormancy*.

En la actualidad, el estudio de la diseminación celular, la enfermedad mínima y los fenómenos de quiescencia tumoral se encuentran limitados debido a la falta de modelos de estudio que puedan mimetizar estos pasos, y a las limitaciones a la hora de la detección de las células tumorales. Los modelos *in vitro*, por otra parte, son ampliamente desaconsejados como única herramienta de estudio debido a que es reconocida la importancia del microambiente tumoral a la hora de determinar el destino de las células diseminadas. Los componentes celulares y las funciones de los nichos se adaptan para sostener el crecimiento de las células tumorales a través de cambios espacio-temporales, y de esta manera se garantiza a través de la interacción constante entre ambas células su evolución coordinada ^{76, 77}. Es por esto que los modelos de estudio *in vitro* son útiles como una primera aproximación, pero siempre deben ser complementados con estudios en modelos *in vivo*.

La utilización de células marcadas con proteínas fluorescentes o con bioluminiscencia es una de las herramientas más completas para el estudio de los fenómenos descritos. En una revisión muy completa del año 2013 de Fein y Egeblad, se muestran los diferentes mecanismos puestos en juego durante la invasión metastásica que han podido estudiarse utilizando la tecnología de imagenología *in vivo*⁷⁸. Este tipo de estudios, sin embargo, cuentan con algunas desventajas. Una de ellas es la pérdida de señal por parte de las células tumorales marcadas por silenciamiento de la expresión de las proteínas fluorescentes. También sucede que estas proteínas suelen ser inmunogénicas, por lo que son un blanco fácil para el sistema inmune ⁷⁹. De esta forma, un resultado negativo no asegura la ausencia de residuos tumorales o micrometástasis. Es por esto necesario complementar estos estudios con análisis histológicos, para comprobar el resultado obtenido mediante imagenología. Por otra parte, no es menor el hecho de que los

equipos para realizar este tipo de seguimiento *in vivo* son de un elevado costo, por lo que no son accesibles para una gran proporción de investigadores.

Otra de las estrategias comunes a la hora de estudiar latencia y quiescencia *in vivo* es la utilización de líneas celulares o variantes de líneas celulares que poseen un fenotipo *dormant*, imposibilitadas de realizar metástasis. A pesar de que este tipo de modelo es útil para caracterizar los mecanismos que rigen la incapacidad de crecimiento, y los involucrados en la reactivación proliferativa, no imita de manera fiel el escenario clínico. Al utilizar líneas celulares quiescentes, que no proliferan *in vivo*, se recurre a la inyección de las mismas por vía intravenosa, facilitando la llegada al órgano donde se anidarán. Previamente se ha recalcado la importancia de la formación de un nicho pre-metastásico, regulado a distancia por el tumor primario a través de la secreción sistémica de factores que condicionan el desarrollo de nódulos secundarios. Queda claro entonces que este efecto no se reproduce en estos modelos experimentales de metástasis. De forma similar, teniendo en cuenta que se inyectan directamente en la circulación, estas células no deberán sortear los obstáculos previos al paso de intravasación. Estas barreras incluyen, las limitaciones en el crecimiento por la hipoxia y la falta de nutrientes una vez alcanzado cierto volumen tumoral (previo al proceso de angiogénesis inducida por el tumor), la invasión local, la migración, y la intravasación en sí misma.

Resulta importante resaltar que varios de los modelos de cáncer mamario utilizados son de origen humano, por lo que se recurre para su estudio *in vivo* a la utilización de animales inmunosuprimidos. Este es el caso de la línea celular MDA MB 231, una de las líneas más ampliamente difundidas a la hora de estudiar efectos de nuevas drogas antitumorales. La limitación en este caso está dada por el hecho de que los resultados obtenidos en este tipo de modelos no siempre pueden ser trasladables a la clínica, debido a la relevancia que tiene la inmunovigilancia sobre el desarrollo tumoral⁸⁰.

Teniendo en cuenta lo explicado, y entendiendo la necesidad de desarrollar modelos novedosos para el estudio *in vivo* del efecto de nuevas terapias sobre la latencia y la

diseminación metastásica, se decidió poner a punto diferentes protocolos *in vivo* de diseminación a partir de la cirugía de tumores de células de carcinoma mamario F3II, de origen murino. Adicionalmente, se desarrolló un modelo de estudio de latencia tumoral, a partir de la inoculación de un número subóptimo de células de forma heterotópica. Finalmente, y en línea con lo estudiado *in vitro* en el Capítulo 1, sumado a la evidencia que respalda un carácter central de p38 en el mantenimiento del estado de quiescencia celular (abordada en la Introducción general), se aplicaron estos modelos para el estudio del rol de p38 en la latencia, la diseminación metastásica y el desarrollo de recidivas de la línea celular mencionada.

Materiales y métodos

Animales

Ratones hembras de la cepa Balb/c, libres de patógenos se obtuvieron del bioterio perteneciente a la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata, y se alojaron en el Bioterio de la Universidad Nacional de Quilmes, con provisión de comida y agua ad libitum, monitoreando el estado general de salud de los animales de forma diaria. Para los ensayos *in vivo* se utilizaron animales de 8 a 14 semanas con un promedio de peso de 23 g. Todos los protocolos *in vivo* incluidos fueron previamente aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional de Quilmes.

Ensayo de cirugía completa. Puesta a punto para el favorecimiento del desarrollo de metástasis pulmonares

Se inyectaron 2×10^5 células F3II de forma subcutánea en el flanco derecho de hembras Balb/c. Periódicamente, se realizó un seguimiento del crecimiento de los tumores, mediante la medición con un calibre. Los volúmenes tumorales se calcularon utilizando la fórmula $\pi/6 \times \text{diámetro menor}^2 \times \text{diámetro mayor}$. Se incluyeron 24 animales en este protocolo, los cuales fueron sometidos a una cirugía para la extracción del tumor primario a diferentes tiempos post-inoculación, en un rango entre 15 y 45 días. Para la cirugía, los animales fueron anestesiados con una combinación de ketamina/xilacina. Se utilizaron suturas reabsorbibles de ácido poliglicólico para cerrar las heridas, y los animales fueron controlados durante las horas siguientes a la intervención, manteniéndose en un ambiente cálido para contrarrestar la baja de temperatura causada por los efectos de la anestesia. Pasados los 30 días después de la cirugía se procedió al sacrificio de los animales por

dislocación cervical (Figura 10). Los pulmones fueron fijados en solución de Bouin para luego realizar un recuento de metástasis superficiales bajo lupa de disección.

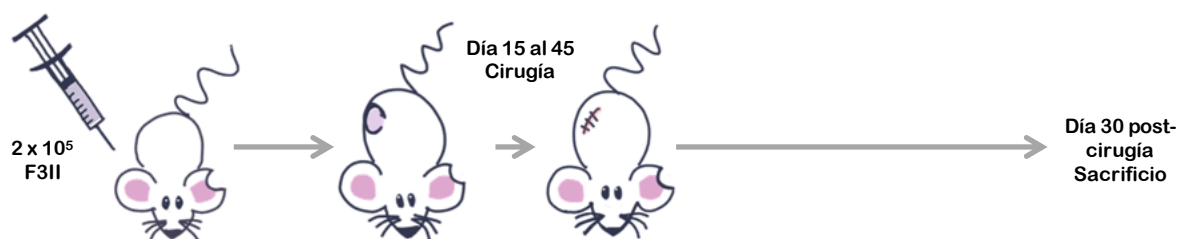


Figura 10. Esquema de inoculación y cirugía de tumores subcutáneos F3II para el favorecimiento del desarrollo de metástasis pulmonares.

Ensayos de cirugía completa e incompleta con inhibición de p38.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la inhibición de p38 en la diseminación de células a pulmón luego de la extracción quirúrgica del tumor primario, se procedió a inocular 2×10^5 células F3II en el flanco de ratones hembras de la cepa Balb/c. El día 35 luego de la inoculación se procedió a realizar una cirugía completa del tumor, bajo condiciones similares a las detalladas en el punto anterior. Durante 10 días consecutivos, a partir de la cirugía, se suministró por vía intraperitoneal SB203580, en una dosis de 10 mg/kg en 200 μ l de solución fisiológica con 10% de DMSO. Los ratones control recibieron sólo el vehículo bajo el mismo esquema de tratamiento que el grupo tratado. Durante los 30 días posteriores a la cirugía se controló el estado de salud general de los animales, y el desarrollo de recidivas locales. Cumplidos los 30 días post-cirugía se procedió al sacrificio por dislocación cervical (Figura 11). Los pulmones fueron fijados en solución de Bouin para el posterior recuento de metástasis superficiales bajo lupa de disección.

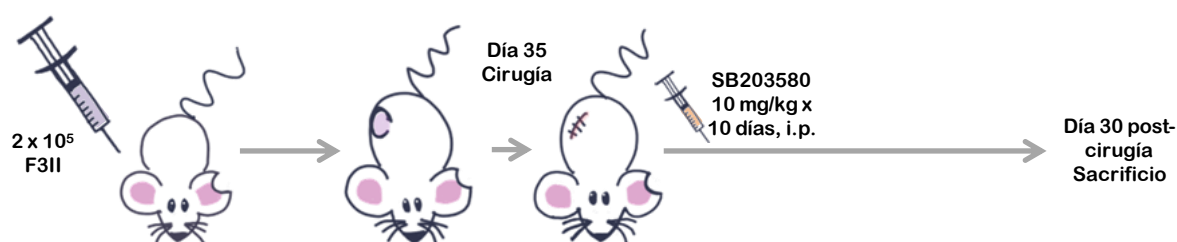


Figura 11. Esquema de tratamiento con SB203580 luego de la cirugía de tumores subcutáneos F3II.

En el caso del protocolo de cirugía incompleta, se procedió de manera idéntica a lo descrito para el caso de la cirugía completa, con una salvedad: al extirpar el tumor, se tomó un cubo de 2 mm de lado, de la zona del tumor periférica, evitando la zona de necrosis tumoral, y se volvió a insertar en un bolsillo formado en la zona donde se realizó la cirugía, fomentando de esta manera el desarrollo de recidivas locales, y favoreciendo la diseminación de células a pulmón. El día 35 post-cirugía se sacrificó a los ratones, y se fijaron los pulmones en solución de Bouin (Figura 12). Las metástasis superficiales se contaron bajo lupa de disección.

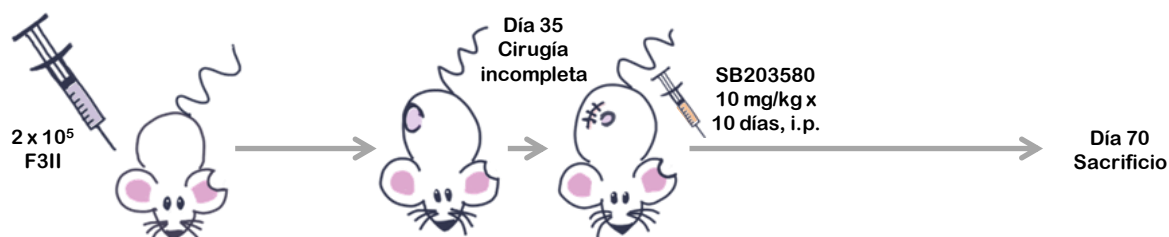


Figura 12. Esquema de tratamiento con SB203580 luego de la cirugía incompleta de tumores subcutáneos F3II.

Estudio de la regulación de la latencia tumoral

Al inicio del protocolo se inocularon de manera subcutánea en el flanco derecho de hembras Balb/c células F3II en cantidades variables (5×10^4 , 2.5×10^4 y 1×10^4 células), con un mínimo de 5 animales por grupo. Para determinar el efecto de la inhibición de p38 en los tiempos de latencia, se suministró luego de la inoculación, y durante 10 días consecutivos, SB203580 por vía intraperitoneal, a una dosis de 10 mg/kg, en 200 μ l de solución fisiológica con DMSO al 10%. Los grupos controles recibieron 200 μ l de vehículo. La aparición de tumores fue monitoreada mediante palpación, registrando de esta forma el tiempo de prendimiento para cada animal. Los tamaños tumorales fueron medidos periódicamente con un calibre, y se calcularon los volúmenes como ya fue descrito. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se realizó una necropsia el día 50 (Figura 13).



Figura 13. Esquema de tratamiento con SB203580 luego de la inoculación subcutánea de un número variable de células F3II para el seguimiento de la latencia y la progresión tumoral.

Resultados

Modelos de diseminación por cirugía y latencia tumoral

Puesta a punto del modelo de cirugía de tumores primarios heterotópicos para el favorecimiento de la diseminación metastásica y su aplicación como modelo quirúrgico *in vivo*.

El proceso de remoción quirúrgica de tumores constituye una de las etapas claves para la diseminación de células tumorales hacia el torrente sanguíneo y órganos distantes. A pesar que durante la cirugía se procura retirar parte del tejido sano que rodea al tumor (cuando es posible, de acuerdo a la ubicación del tumor primario y el grado de invasividad), de manera de asegurar la remoción total del tejido maligno, es inevitable que la manipulación produzca la diseminación de células hacia la circulación, lo cual es en adición fuertemente promovido por el proceso de sangrado típico de la intervención.

Teniendo en cuenta este fenómeno, resulta interesante generar modelos que imiten la cirugía de tumores primarios, donde se busque favorecer la diseminación de células, constituyéndose de esta manera en una herramienta para el posterior estudio no sólo del impacto de terapias anti-tumorales, sino también para el estudio de proteínas y su implicancia en la diseminación metastásica promovida por la intervención quirúrgica.

En línea con lo descrito, se decidió establecer un modelo de cirugía para el caso de células F3II implantadas de manera heterotópica, en el subcutis de ratones Balb/c. En primer lugar, se realizó la búsqueda de los valores de corte para llevar a cabo la cirugía, de manera tal de favorecer la diseminación metastásica. Dos variables resultaron críticas: por un lado, el tiempo transcurrido entre la inoculación subcutánea y la cirugía y por el otro, el tamaño del tumor primario al momento de realizar la intervención. De esta forma, se pudo observar que la aparición de metástasis se favorece cuando la cirugía se realiza luego de 30 días de inoculación (figura 14.a). Con respecto al tamaño tumoral, se observa que el tumor primario debe contar con un diámetro promedio no menor a los 10 mm (figura 14.b). A

tiempos menores o diámetros tumorales más pequeños el porcentaje de ratones portadores de metástasis es minoritario, por lo tanto no se ve favorecida la diseminación metastásica. El hecho de aumentar la espera para realizar la cirugía favorece ampliamente la diseminación, sin embargo es necesario tener en cuenta que el grado de irrigación de los tumores, la ulceración de la masa tumoral, así como también la invasión hacia el peritoneo (dos características que se observan frecuentemente para esta línea celular), dificultan técnicamente la cirugía y por consecuencia pone en riesgo la sobrevivencia del animal, lo cual es absolutamente no deseable.

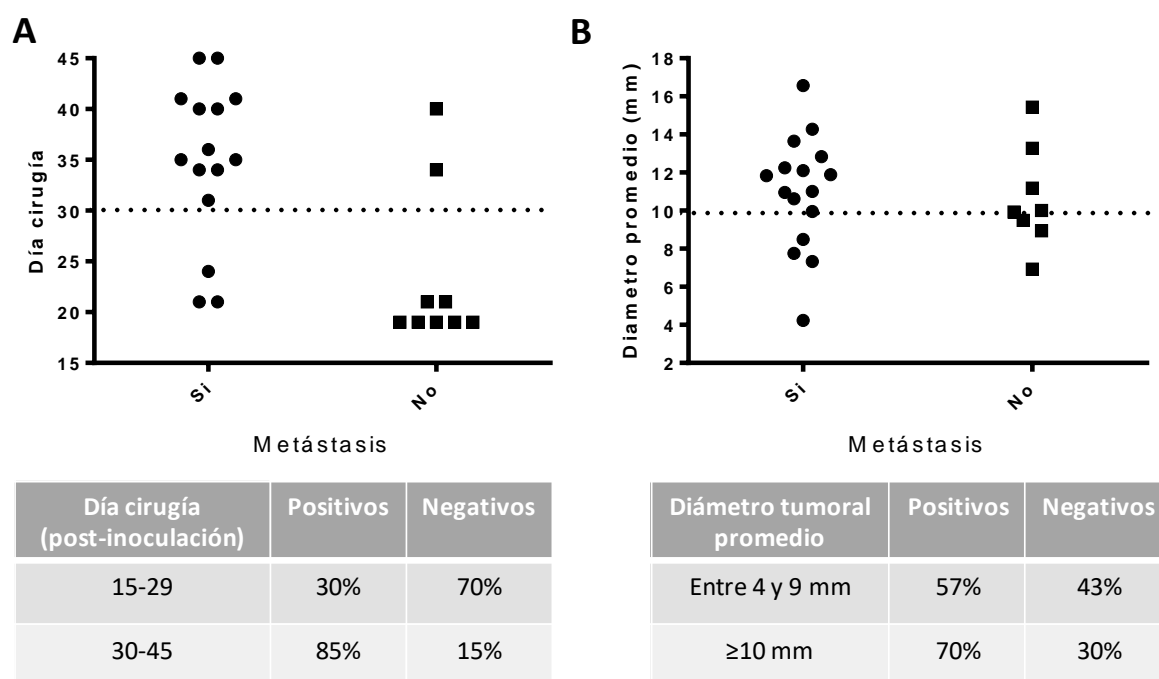


Figura 14. Variación de la incidencia de metástasis pulmonares F3II de acuerdo al tiempo transcurrido post-inoculación y tamaño tumoral registrado al momento de la intervención. Ratones Balb/c fueron inoculados con 2×10^5 células F3II. A diferentes tiempos y habiendo registrado el diámetro tumoral, se realizó una cirugía completa de los tumores. Luego del sacrificio se fijaron los pulmones en solución de Bouin para determinar la incidencia de metástasis. Se observa de esta manera que la aparición de metástasis se favorece al realizar la cirugía luego del día 30 post-inoculación de las células (A), y a partir de diámetros tumorales mayores a 10 mm en promedio (B).

Estudio del efecto de la inhibición de p38 sobre el proceso de diseminación y recidiva

Teniendo en cuenta los resultados *in vitro* obtenidos a partir de la regulación negativa de p38 en la línea F3II, se decidió realizar una prueba para determinar cómo afecta la modulación de esta quinasa los parámetros como el desarrollo de recidivas y la diseminación metastásica luego de la cirugía de tumores subcutáneos F3II. De acuerdo a los datos obtenidos a partir de la puesta a punto previa, se fijó que las cirugías se realicen a partir del día 35, siempre y cuando los tumores superen los 10 mm de diámetro promedio. Inmediatamente después de la intervención, de manera diaria durante 10 días, se trataron los animales de forma sistémica con SB203580. En este caso, la inhibición de p38 durante los días posteriores a la cirugía no provocó cambios significativos en el número de metástasis pulmonares con respecto a los animales del grupo control, aunque resulta evidente que existe una tendencia a desarrollar una cantidad mayor de metástasis en el caso de los ratones tratados (figura 15.a). De manera similar, resulta interesante que un 5% (1 de 21) de los animales control presentaron recurrencias locales, mientras que en el grupo tratado ese porcentaje asciende al 19% (4 de 21), siendo estas últimas de un tamaño mayor. No obstante, resulta necesario aclarar que no se puede realizar una comparación fiable a partir de una muestra tan acotada (Figura 15.b).

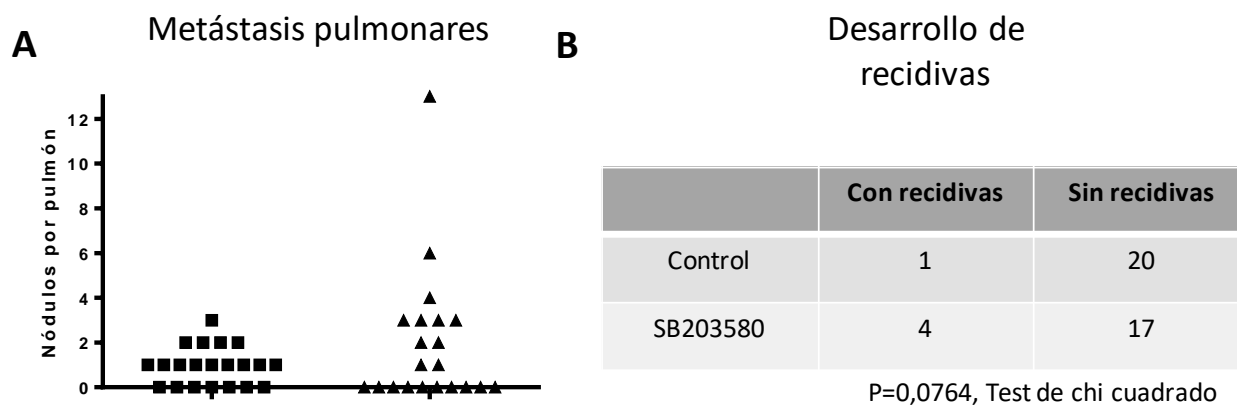
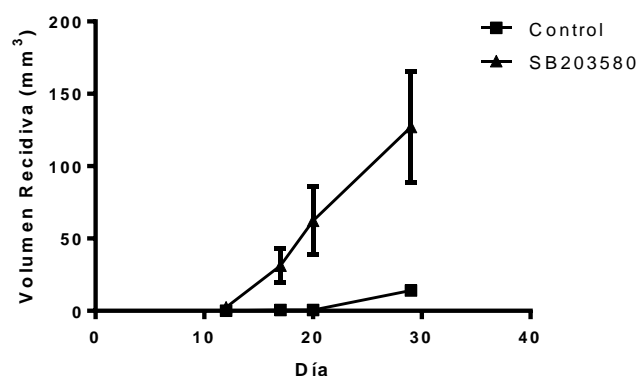


Figura 15. Efectos de la inhibición sistémica de p38 en el desarrollo de metástasis espontáneas y recidivas luego de la cirugía completa de tumores subcutáneos F3II. **A.** El tratamiento durante 10 días consecutivos luego de la cirugía de tumores heterotópicos con una dosis de 10 mg/kg diarios no provoca cambios significativos en la aparición de metástasis espontáneas superficiales. Cada uno de los puntos representa la totalidad de metástasis registradas por animal (n=21 por grupo). **B.** En la tabla se compara el número de animales que espontáneamente desarrollaron recidivas luego de la cirugía. Debajo, se muestran las curvas de crecimiento de dichas recidivas por grupo experimental.



Debido a la gran cantidad de ratones que no desarrollaron metástasis pulmonares superficiales, se decidió realizar un ensayo adicional *in vivo* en condiciones tales que se estimule la diseminación tumoral, y de esta manera resulte apropiado para ahondar en el rol de la vía de p38 en este fenómeno. Siguiendo esta premisa, se puso en consideración la realización de la cirugía de los tumores primarios dejando un residuo de un tamaño establecido en la zona donde se realizó la incisión. El esquema de tratamiento con SB203580 para este ensayo fue el mismo que se aplicó en el ensayo previo. Se obtuvo a partir de este ensayo un interesante resultado a nivel local: las recidivas desarrolladas por

los animales tratados con SB203580 resultaron significativamente mayores, con tamaños promedio que duplicaron a las recurrencias registradas en los animales pertenecientes al grupo control. Sin embargo, la modificación del protocolo no provoca un aumento en el número de metástasis (una vez más se registró un número alto de animales sin nódulos metastásicos pulmonares) (Figura 16).

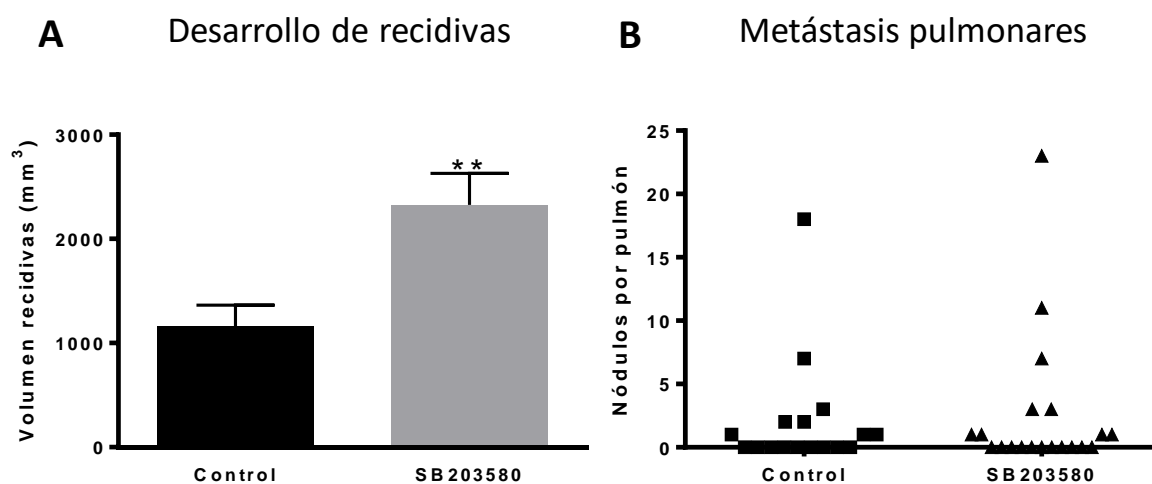


Figura 16. El tratamiento sistémico con SB203580 provoca un aumento en el tamaño de las recidivas luego de una cirugía incompleta del tumor primario, sin afectar el desarrollo de metástasis pulmonares. A. Los volúmenes de las recurrencias luego de las cirugías fueron calculados para el día 35 (finalización del protocolo). Los ratones fueron tratados inmediatamente luego de la cirugía con SB203580 en una dosis de 10 mg/kg diarios durante 10 días. Los datos se representan como los promedios de los volúmenes de las recidivas \pm el desvío estándar (** $p < 0,01$, test de t). **B.** Luego del sacrificio se cuantificaron las metástasis pulmonares superficiales. El tratamiento con SB203580 no provocó cambios significativos en el desarrollo de metástasis. Cada uno de los puntos representa el número de nódulos por pulmón por animal.

Estudio de los efectos de la inhibición química de p38 sobre la latencia tumoral. Determinación de la carga de células inicial para su aplicación como modelo de estudio in vivo.

Es posible establecer un paralelismo entre la inoculación de células tumorales de forma heterotópica con lo sucedido cuando una masa tumoral quiescente retoma su crecimiento en el órgano a colonizar. En ambos casos es necesaria la adaptación a un nuevo entorno de crecimiento, que resulta hostil comparado con las condiciones en las cuales se encontraban las células de forma previa a la nueva implantación. En ambos casos se registra una pausa en la replicación y expansión de la masa tumoral: en el caso de tratarse de micrometástasis, esta pausa se denomina “quiescencia” (tal como se ha explicado en la introducción general) y en el caso de tratarse de un tumor primario, ese período se denomina latencia. Con el objetivo de establecer un modelo que pueda mimetizar el proceso de quiescencia tumoral de manera sencilla y que permita, de forma adicional, establecer una relación entre el estado de activación de p38 y la entrada o salida del estado quiescente, se consideró la inoculación subcutánea de un número subóptimo de células F3II que permita alargar el período de latencia y de esta forma otorgue una ventana de trabajo adecuada para estudiar su modulación.

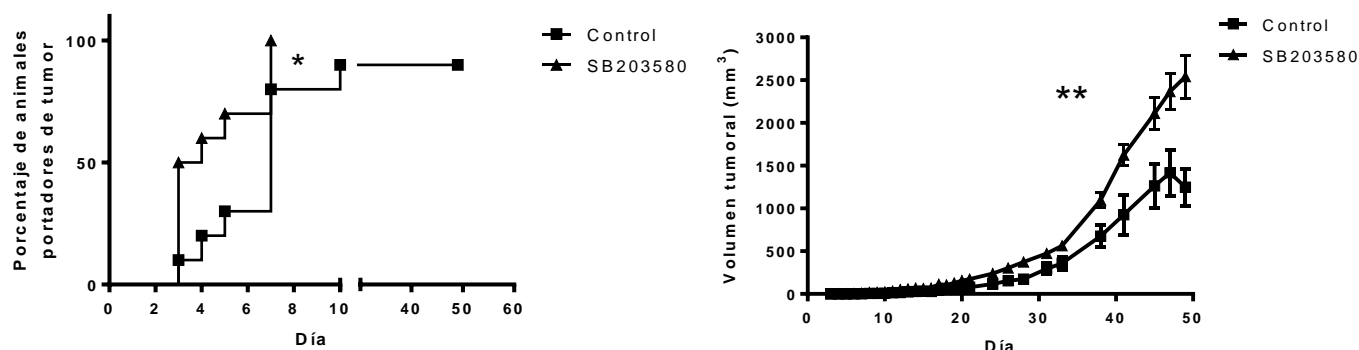
En un primer lugar, se realizó una puesta a punto del número de células a inocular, de manera tal que se puedan retrasar los tiempos de latencia, pero que a su vez no afecte la incidencia. De forma rutinaria, para ensayos de progresión tumoral se inoculan de forma subcutánea 2×10^5 F3II, con el objetivo de asegurar una incidencia del 100%. En este caso, se bajó la carga inicial a 5, 2,5 y 1×10^4 células.

En el caso de ratones inoculados con cargas de 5 y $2,5 \times 10^4$ células, las latencias resultaron significativamente reducidas al inhibir p38 sistémicamente, en comparación con el grupo control. Adicionalmente, los tumores pertenecientes a los animales tratados crecieron a una tasa significativamente mayor, determinado mediante la comparación de las pendientes de las regresiones lineales de las curvas de crecimiento de cada grupo. En

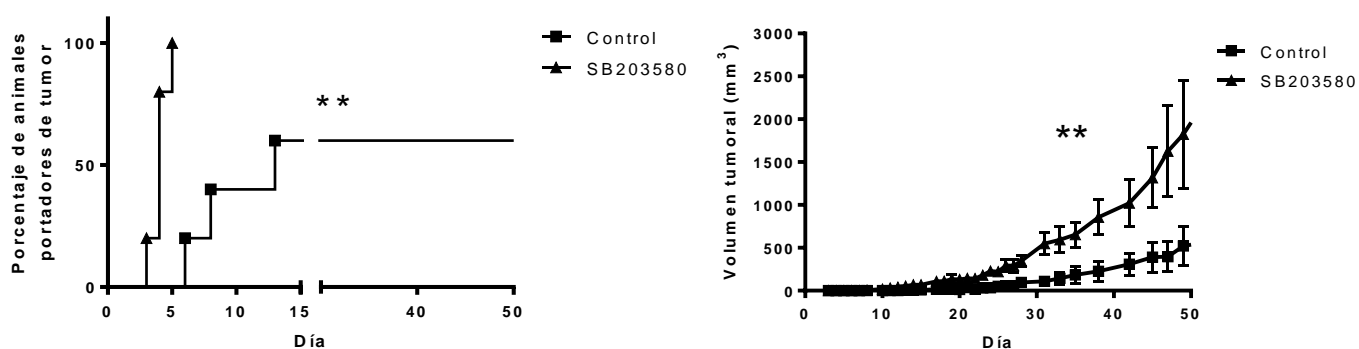
ambos casos, se registró para los animales tratados una incidencia tumoral del 100%, mientras que para los grupos control estas incidencias fueron del 90 y el 60% (5 y 2,5 x 10⁴, respectivamente).

Para aquellos animales inoculados con la carga menor, de 1 x 10⁴ células, no se observan diferencias significativas en los tiempos de latencia ni en las tasas de crecimiento entre los animales tratados y su control. En este caso, la incidencia se vio ampliamente afectada, registrándose un 70% de animales positivos en el grupo tratado y un 50% en el control. Además, dentro de ambos grupos se observa una importante variabilidad en los tamaños tumorales calculados durante la totalidad del protocolo (Figura 17).

5 x 10⁴F3II



2,5 x 10⁴F3II



1 x 10⁴F3II

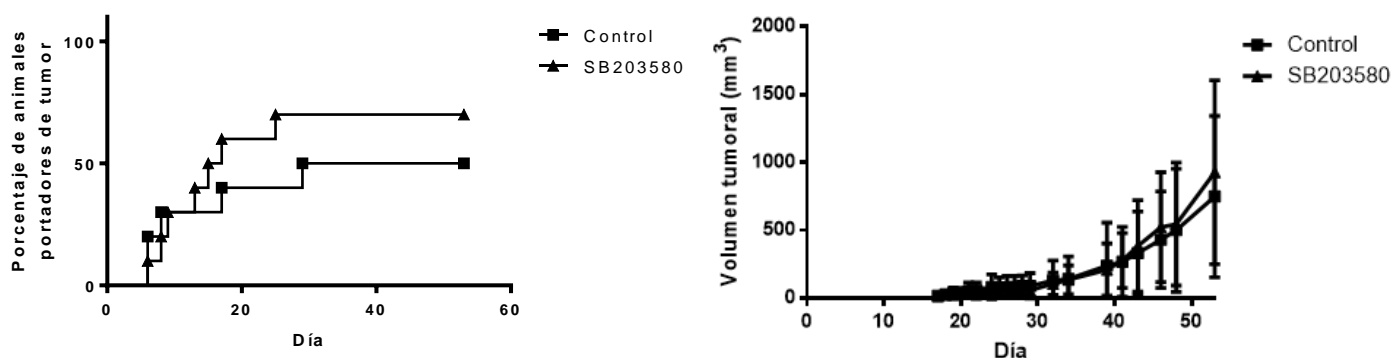


Figura 17. La inhibición sistémica de p38 provoca una disminución en los tiempos de latencia tumoral, así como también un aumento en la tasa proliferativa de tumores F3II. A la izquierda se muestran las curvas de prendimiento de tumores subcutáneos para cada una de las cargas celulares ensayadas, para los animales control y los animales tratados por vía intraperitoneal con SB203580 10 mg/kg diariamente durante 10 días, con excepción de la menor carga celular, para la cual se administraron un total de 30 dosis. Para las cargas de células mayores se observan diferencias significativas entre las curvas de prendimiento (*p<0.05, **p<0.01, Logrank test). Del lado derecho se presentan las curvas de crecimiento para cada una de las condiciones descritas. Para las cargas iniciales de 5 y 2,5 x 10⁴ F3II se observa que las tasas de crecimiento tumorales son significativamente superiores en los grupos tratados con SB203580 (**p<0,01 test de t para la comparación de las pendientes de las curvas, determinadas mediante una regresión lineal)

Discusión

Uno de los desafíos vigentes a la hora del desarrollo de nuevas terapias antitumorales es la selección de modelos pre-clínicos pertinentes, que puedan mimetizar de manera fiel lo que ocurre clínicamente en pacientes oncológicos. Es así como a pesar de haber logrado avances en este campo, es muy alto el porcentaje de drogas que no resultan efectivas a la hora de ser probadas en la clínica⁸¹.

Yang y colaboradores ⁸⁰ también hicieron hincapié en esta problemática. Estos autores consideran que una de las fallas históricas a la hora de estudiar la preclínica de un nuevo compuesto es el hecho de que el foco generalmente está en el efecto sobre el crecimiento del tumor primario, sin tener en cuenta el desarrollo de metástasis. Adicionalmente, la variedad de líneas utilizadas para el estudio de la biología metastásica y el efecto anti-metastásico de nuevos compuestos en general se centra en estudios realizados en tres tipos de modelos: la línea de cáncer de mama humana MDA-MB-231, que debe ser inoculada en ratones inmunodeficientes, la línea murina 4T1, que permite la utilización de ratones inmunocompetentes, y el modelo murino de cáncer mamario metastásico, genéticamente modificado denominado MMTV-PyVT. Resultan indiscutibles los avances que se generaron a partir de la utilización de estos modelos, sin embargo, no representan la heterogeneidad que caracteriza el cáncer de mama humano.

A lo largo de este capítulo se intentó explorar el potencial de la línea F3II como alternativa a la utilización de los modelos de tumores mamarios disponibles. En principio, en miras de la escasez de modelos que recapitulan los pasos comunes en el tratamiento contra el cáncer, se decidió desarrollar un modelo de diseminación metastásica a través de la inoculación de un tumor primario que luego se remueve quirúrgicamente. De esta forma, se logra simular el efecto de formación de un nicho pre-metastásico como consecuencia de la presencia de un tumor primario, y, adicionalmente, imitar las condiciones de sangrado e inflamación típicas de los procedimientos quirúrgicos. En este caso, era clave la selección

de tiempos y tamaños tumorales para el favorecimiento de la diseminación y aparición de metástasis. De esta manera, se fijó el tiempo y el tamaño tumoral apropiado para asegurar la diseminación.

Este modelo se aplicó para el estudio de la regulación de la quinasa p38 y su influencia sobre el desarrollo de metástasis pulmonares luego de la cirugía del tumor primario. Esto fue llevado a cabo inhibiendo p38 de manera sistémica luego de la cirugía. En este caso se observó una tendencia en los animales inhibidos a desarrollar un mayor número de metástasis pulmonares. Sin embargo, la gran cantidad de animales sin nódulos metastásicos resultó llamativa, teniendo en cuenta la agresividad del modelo FII. Asimismo, la diferencia registrada en el número de animales portadores de recidivas al final del protocolo fue un resultado no esperado. Y, a pesar de no poder analizar estadísticamente estos resultados, (debido a que sólo uno de los ratones control desarrolló recidivas) el seguimiento de la progresión de estas recurrencias muestra una tendencia muy interesante a formar recidivas de mayor tamaño en el grupo en el cual se inhibió p38 de manera post-quirúrgica.

El modelo de cirugía incompleta, por su parte, ha permitido confirmar lo observado en el ensayo de cirugía completa. Los animales tratados con el inhibidor SB203580 desarrollaron recidivas significativamente más grandes que aquellos no tratados. De esta manera, se puede establecer una relación entre la actividad de p38 y el control del crecimiento. Estos datos apoyan el concepto de que esta vía actúa como supresor de tumor, limitando el crecimiento de las masas tumorales recurrentes. Sin embargo, a pesar de intentar estimular la diseminación, la baja incidencia de metástasis continuó siendo un problema aun favoreciendo el crecimiento de recidivas. A pesar de las limitaciones planteadas, consideramos este modelo de gran utilidad para el estudio del efecto de nuevas terapias antitumorales para cáncer de mama en un tratamiento aplicado de manera perioperatoria.

El último de los ensayos *in vivo* que se muestra en este capítulo fue planteado como una estrategia para estudiar la latencia tumoral, y de alguna manera poder emular las condiciones dadas para las células que se encuentran encarando el crecimiento en un nuevo nicho, con las dificultades que este proceso conlleva (ya descritas a lo largo de este trabajo). La línea celular F3II se caracteriza por tener tiempos de latencia cortos. De rutina se inyectan 2×10^5 células de forma subcutánea, lo cual asegura una incidencia del 100%, y periodos de latencia que van de 3 a 7 días. Esta ventana de tiempo no es lo suficientemente amplia como para ser modulable, y menos con compuestos que se asume (como es el caso del SB203580). Es por esto que se planteó la utilización de un número menor de células, y se estableció un límite inferior de $2,5 \times 10^4$ células, de manera tal de maximizar el período de latencia sin afectar radicalmente la incidencia ni la variabilidad en el crecimiento.

Los tiempos de latencia reducidos como consecuencia de la inhibición de p38, sumado a un aumento en la tasa de crecimiento de los tumores (efecto que se mantuvo a lo largo de todo el protocolo) constituyen una vez más una evidencia del rol de p38 como una quinasa que limita la proliferación, en línea con aquellos que proponen un rol supresor de tumor y un papel fundamental a la hora de mantener el estado quiescente. Como ejemplo, en un trabajo publicado en el año 2017 por Moriwaki y Asahi, se establece que el incremento en el crecimiento de tumores subcutáneos de la línea de melanoma B16, en respuesta a una O-glicosilación aumentada del microambiente tumoral, se debe principalmente a la inhibición de p38 y el aumento en la activación de ERK, destacando la importancia de la regulación de estas señales como una de las claves del aumento en la proliferación⁸².

En lo que respecta al desarrollo de modelos de estudio, dados los resultados que se obtuvieron al regular la actividad de p38, resultaría interesante aplicar dicha inhibición como una herramienta de estudio *in vivo*. Considerando que los resultados hasta acá observados se enmarcan dentro del esquema propuesto de regulación de la entrada y salida de la quiescencia tumoral⁸³, podríamos pensar que las células tratadas con el inhibidor son

representantes de aquella población que cuenta con su crecimiento limitado por la actividad p38 y que de forma inesperada reanudan su proliferación, por un decrecimiento en las señales propagadas por esta vía y un aumento de la actividad de ERK1/2. Con esto en mente, se podría analizar qué efecto tiene un compuesto bajo evaluación sobre una célula que retoma su crecimiento luego de verlo detenido por causa de una relación de actividades ERK/p38 baja, adquiriendo así un fenotipo marcadamente más agresivo.

Adicionalmente, los resultados *in vivo* aquí presentados resaltan la relevancia del microambiente como uno de los moduladores de la respuesta ante la inhibición de p38, dado que sólo las células F3II sembradas en un sustrato proteico que emula un contexto similar a la matriz extracelular respondieron de forma similar a las células que crecieron *in vivo*. El hecho de que el bloqueo de la actividad de p38 represente una ventaja para las células recién inoculadas podría explicarse a partir de dos hipótesis. Por una parte, cuando se inhibe esta quinasa, las células serían capaces de evadir el proceso de apoptosis disparado por el estrés inducido de manera extracelular. En cuanto se evade esta edición temprana de células tumorales, la masa disponible para comenzar con el crecimiento tumoral es mayor, de modo que se ve facilitado el condicionamiento del nuevo nicho de crecimiento. Por otra parte, la segunda hipótesis plantea que las células inhibidas con SB203580 son capaces de captar más fácilmente las señales del ambiente, como consecuencia de los cambios en la expresión de integrinas que favorecen la transducción de señales y la interpretación de los estímulos extracelulares. Estas ventajas, entonces, resultan cruciales para que un pequeño número de células logre establecerse y comenzar a multiplicarse, de la misma manera que lo son para una masa tumoral residual a la hora de reanudar su crecimiento luego de la cirugía.

Los resultados de este capítulo, por otra parte, resaltan el riesgo de la administración de cualquier inhibidor de p38 a pacientes oncológicos que presenten células diseminadas recientemente, o una masa residual tumoral luego del tratamiento primario. En estos casos, la recurrencia de tumores o la aparición de nuevos focos metastásicos representan algunos

de los posibles efectos no deseados. Sin embargo, es importante recalcar que en este trabajo no se han estudiado las consecuencias de la inhibición de p38 en un contexto donde el tumor primario ya se encuentre establecido, así como tampoco se estudiaron los efectos de la administración concomitante de inhibidores de p38 con quimioterapia.

En varios reportes se ha demostrado que existe una relación entre la adquisición de un fenotipo resistente a la quimioterapia y la actividad de p38. Por ejemplo, la inhibición de p38 en concomitancia con el tratamiento con cisplatino resultó beneficioso para la reducción de la malignidad y el tamaño de tumores en el modelo murino MMTV-PyMT⁸⁴, así como también se ha demostrado que sensibiliza a células de cáncer gástrico humano ante el tratamiento con doxorubicina⁸⁵. Adicionalmente, García-Cano y colaboradores recopilaron evidencias de la relación existente entre p38 y la respuesta de diferentes tumores a la quimioterapia, y algunos inhibidores de tirosin-quinasa como Imatinib y Sorafenib. En este trabajo, los autores afirman que la inhibición de p38 potencia el efecto de dichas drogas, pero que esta inhibición puede ser un “arma de doble filo” dado el rol supresor de tumor que se le asigna a esta quinasa, lo cual se relaciona con la evidencia que emerge como resultado de este trabajo⁸⁶.

Finalmente, resulta importante mencionar una vez más la importancia de desarrollar modelos preclínicos que representen diferentes estados de la enfermedad oncológica, como herramienta esencial para la evaluación completa del efecto de nuevas drogas, y de esta manera prevenir efectos secundarios indeseados como medida previa para el diseño de ensayos clínicos. Desde nuestra perspectiva, y a la luz de la evidencia presentada no sólo acá sino en numerosos reportes que sostienen un doble rol de p38, los candidatos para el tratamiento con inhibidores de p38 deben ser seleccionados cuidadosamente de acuerdo al tipo tumoral y al estadio de la enfermedad, dado que la respuesta puede ser extremadamente variable entre distintas condiciones.

Capítulo 3

Introducción

La quinasa CK2 y el inhibidor peptídico CIGB-300

CK2 (antiguamente conocida como Casein-quinasa 2) es una serin-treonin quinasa que se expresa constitutivamente y de forma ubicua en células eucariotas. Esta quinasa se compone de cuatro subunidades: dos subunidades catalíticas α o α' , y dos subunidades β regulatorias, no catalíticas. Con más de 300 sustratos, esta quinasa está implicada en un gran número de funciones celulares, incluyendo proliferación celular, diferenciación y regulación de la apoptosis. Su sobreexpresión ha sido reportada como una posible causa de transformación maligna, otorgándole a las células transformadas la capacidad de evadir la apoptosis a través de la activación de vías de señalización de supervivencia⁸⁷⁻⁸⁹. Otras de las ventajas otorgadas a las células con sobreexpresión de CK2 es la capacidad de desarrollar un fenotipo multirresistente a drogas, y el favorecimiento del proceso de angiogénesis inducida por tumor^{90,91}.

Su sobreexpresión se reporta para un amplio rango de tipos tumorales, entre ellos mama, riñón, cabeza y cuello, próstata y pulmón⁹². Las características de esta quinasa la posicionan como un blanco interesante para el desarrollo de nuevas drogas antitumorales. Teniendo esto en cuenta, en el Laboratorio de Oncología Molecular de la Universidad Nacional de Quilmes, en conjunto con el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, se ha desarrollado y estudiado el efecto de un inhibidor peptídico de CK2 denominado CIGB-300. Este inhibidor actúa como un inhibidor de sustrato, teniendo como blanco el dominio fosfo-aceptor de los sustratos de CK2, e impidiendo de esta manera la correcta fosforilación de dichos sustratos por parte de la enzima.

La respuesta antitumoral de CIGB-300 ha sido documentada en numerosos trabajos. La administración sistémica de este péptido demostró tener actividad antitumoral en modelos heterotópicos de cáncer de cérvix y pulmón⁹³. *In vivo* e *in vitro*, demostró tener un rol antiangiogénico y pro-apoptótico en diversas líneas celulares, lo cual fue relacionado con

la modulación de la vía VEGF-Notch, y el desensamblaje nucleolar como consecuencia de la inhibición de la fosforilación del complejo B23/nucleofosmina⁹⁴⁻⁹⁶.

Recientemente, se ha publicado un trabajo que muestra que este péptido afecta la adhesión, migración e invasión de células de cáncer pulmonar de origen humano y murino. Adicionalmente, se demostró en modelos *in vivo* un efecto inhibitorio de la colonización metastásica, junto con una inhibición de la neovascularización promovida por las células tumorales⁹⁷.

Entendiendo la importancia del péptido CIGB-300 como nuevo compuesto con propiedades antitumorales, antimetastásicas y antiangiogénicas, se decidió poner a prueba los modelos desarrollados a lo largo del segundo capítulo de esta tesis utilizando este péptido como droga de referencia. Resulta interesante, adicionalmente, la evaluación del potencial de este péptido anti-CK2 como posible modulador de la latencia tumoral, por una parte, y de la diseminación y desarrollo de recidivas luego de la cirugía, por el otro. Esto constituye el eje central de este tercer capítulo.

Materiales y Métodos

Síntesis de CIGB-300

El péptido CIGB-300 fue sintetizado en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, siguiendo los pasos descritos de forma previa por Perea y colaboradores⁹⁸.

Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 (IC50) de CIGB-300 para la línea F3II

Se sembraron $1,5 \times 10^3$ células F3II por *well* en una placa de 96 *wells*, y al día siguiente se realizó el tratamiento CIGB-300 con concentraciones que abarcaron el rango comprendido entre 0 y 200 μM , por sextuplicado. Luego de 72 h se determinó la proliferación celular de manera indirecta mediante el ensayo metabólico con MTT, según las instrucciones del fabricante (Sigma Aldrich). Las células del grupo control recibieron el vehículo en el cual se diluye el péptido (PBS). Con los datos obtenidos se realizó una regresión lineal, y se determinó la IC50.

Western Blot

Se sembraron 2×10^5 células F3II en placa de 6 *wells*, en DMEM con SFB 5%. 24 horas después de la siembra se cambió el medio de cultivo completo por DMEM con SFB al 2%, y se adicionó CIGB-300 en concentraciones de 40 y 80 μM durante 24 h. Las células se lisaron en buffer 150-GPLB (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 0.5% NP40, 10% glicerol, pH 7.4), se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos y se hirvieron en buffer Laemmli's durante 5 minutos. Las proteínas se resolvieron en un SDS-PAGE 10%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, y se realizó una inmuno-marcación con anticuerpos anti ERK1/2, pERK1/2 y Tubulina, y a continuación con anticuerpos secundarios

conjugados a peroxidasa. Se reveló utilizando el reactivo para quimioluminiscencia Biolumina (Kalium) y se utilizó el equipo C-Digit (LI-COR) para la detección de la luminiscencia y la digitalización de las imágenes. Los resultados se analizaron con el software Image Studio (LI-COR). En todos los casos para la cuantificación se relativizaron las intensidades de las bandas a la intensidad de la banda de tubulina.

Ensayo de *spreading* celular

Para estudiar el efecto del tratamiento con el péptido CIGB-300 en la dinámica de *spreading* de la línea F3II, las células fueron sembradas en una placa de 24 *wells* e inmediatamente se trataron con CIGB-300 a una concentración de 60 μM . Después de una, dos y tres horas de incubación en estufa gaseada, se lavaron las células no adheridas con PBS y se tomaron 4 fotos de cada condición bajo el microscopio de contraste de fase. Luego, se cuantificaron las células en *spreading* por campo fotografiado, y se calcularon los porcentajes de células en *spreading* en relación a la totalidad de células adheridas.

Ensayo de latencia tumoral

Con el objetivo de estudiar el efecto del tratamiento sistémico con CIGB-300 sobre la latencia tumoral en el modelo de inhibición de p38 detallado en el capítulo 2, se procedió de acuerdo al siguiente protocolo. Se inocularon de manera subcutánea en el flanco derecho de hembras Balb/c 5×10^4 células F3II. Luego de la inoculación se dividieron los ratones en cuatro grupos (n=10 por grupo): Control, SB203580, CIGB-300 y la combinación SB + CIGB. El día siguiente a la inoculación, y durante 10 días consecutivos, se suministró SB203580 por vía intraperitoneal, a una dosis de 10 mg/kg, en 200 μl de solución fisiológica con DMSO al 10%, CIGB-300 a una dosis de 10 mg/kg durante 5 días por vía intravenosa, en 200 μl de PBS, o la combinación de ambos en el caso del grupo combinado. En el caso

de los animales tratados sólo con una de las drogas, se inyectó de forma complementaria el vehículo de la otra droga, respetando la vía de inoculación. El grupo control recibió una combinación de ambos vehículos (DMSO en solución fisiológica, por vía intraperitoneal, y PBS por vía intravenosa). La aparición de tumores fue monitoreada mediante palpación, registrando de esta forma el tiempo de prendimiento para cada animal. Los tamaños tumorales fueron medidos periódicamente con un calibre, y se calcularon los volúmenes como ya fue descrito. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se realizó una necropsia el día 60 (Figura 18).



Figura 18. Esquema del co-tratamiento con SB203580 y CIGB-300 luego de la inoculación subcutánea de células F3II para el seguimiento de la latencia y la progresión tumoral.

Ensayo de cirugía incompleta

Con el objetivo de estudiar el efecto del tratamiento sistémico con CIGB-300 sobre la diseminación celular y el desarrollo de recidivas en el modelo de cirugía incompleta con inhibición de p38, descrito en el capítulo 2 de esta tesis doctoral, se procedió de acuerdo al protocolo a continuación. Se inocularon 2×10^5 células F3II en el flanco de ratones hembras de la cepa Balb/c. El día 35 luego de la inoculación se procedió a realizar una cirugía incompleta del tumor: se tomó un cubo de 2 mm de lado, de la zona del tumor periférica, evitando la zona de necrosis tumoral, y se volvió a insertar en un bolsillo formado en la zona donde se realizó la cirugía. Luego de la cirugía se dividieron los ratones en cuatro grupos (n=10 por grupo): Control, SB203580, CIGB-300 y la combinación SB + CIGB. El día

siguiente a la inoculación, y durante 10 días consecutivos, se suministró SB203580 por vía intraperitoneal, a una dosis de 10 mg/kg, en 200 µl de solución fisiológica con DMSO al 10%, CIGB-300 a una dosis de 10 mg/kg durante 5 días por vía intravenosa, en 200 µl de PBS, o la combinación de ambos en el caso del grupo combinado. En el caso de los animales tratados sólo con una de las drogas, se inyectó de forma complementaria el vehículo de la otra droga, respetando la vía de inoculación. El grupo control recibió una combinación de ambos vehículos (DMSO en solución fisiológica, por vía intraperitoneal, y PBS por vía intravenosa). Durante los 35 días posteriores a la cirugía se controló el estado de salud general de los animales, y el desarrollo de recidivas locales. Cumplidos los 35 días post-cirugía se procedió al sacrificio por dislocación cervical (Figura 19). Los pulmones fueron fijados en solución de Bouin para el posterior recuento de metástasis superficiales bajo lupa de disección.

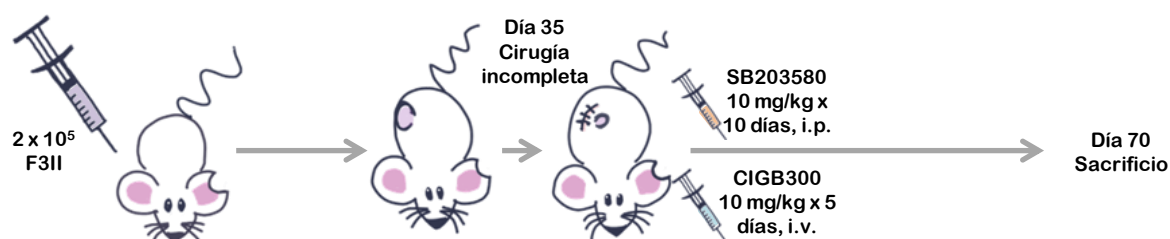


Figura 19. Esquema de co-tratamiento con SB203580 y CIGB-300 luego de la cirugía incompleta de tumores subcutáneos F3II.

Resultados

Aplicación de los modelos de estudio desarrollados para el estudio del efecto de nuevas drogas antitumorales.

CIGB-300: estudio de su potencial actividad como modulador del fenotipo agresivo potenciado por la supresión de la actividad de p38.

En primer lugar, se realizaron estudios *in vitro* para determinar si el péptido CIGB-300 presentaba indicios de actuar como un regulador de los diferentes parámetros que se vieron afectados por la modulación negativa de p38 en células F3II. Para comenzar, se determinó el valor de IC₅₀ para esta línea celular, como punto de partida para el establecimiento de una concentración de trabajo que permita regular diferentes parámetros celulares y a su vez no provoque citotoxicidad. Como resultado, después de 72 h de tratamiento con el compuesto CIGB-300 en un rango de concentraciones entre 10 y 200 μM , se determinó que la IC₅₀ para esta línea era de 158 μM (Figura 20).

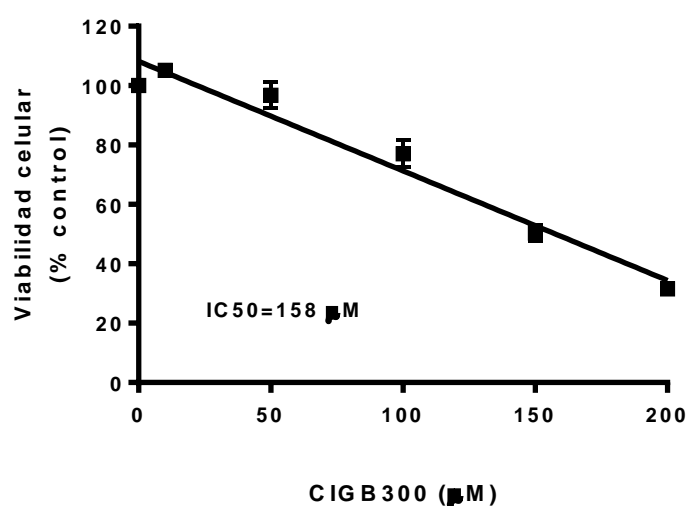


Figura 20. El tratamiento de la línea celular F3II con el péptido CIGB-300 provoca la inhibición del crecimiento a 72 h. Para determinar una concentración de trabajo del péptido CIGB-300 se determinó su IC₅₀ para la línea F3II. Se sembraron las células en placa de 96 wells y el día posterior a la siembra se comenzó con el tratamiento durante 72 h con concentraciones entre 0 y 200 μM . Al ajustar la curva a una recta, mediante una regresión lineal se pudo determinar que el valor de IC₅₀ es de 158 μM .

A partir de este resultado, los ensayos siguientes se realizaron a concentraciones de tratamiento equivalentes o menores a la mitad de la IC50. Como primer paso, se determinó si el tratamiento con el péptido CIGB-300 afecta la fosforilación de ERK1/2. Como se muestra en la figura 21, el tratamiento con CIGB-300 a concentraciones de 80 y 40 μM provoca una importante caída en los niveles de fosforilación de ERK1/2, sin modificar los niveles de ERK1/2 totales. Este resultado evidencia la posibilidad de contrarrestar la agresividad obtenida luego de la inhibición de p38, al apagar una de las vías sobre-activadas durante el tratamiento con SB203580.

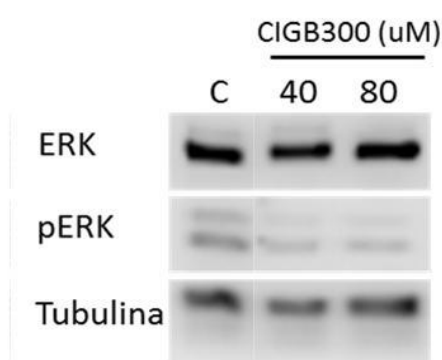


Figura 21. El tratamiento de la línea celular F3II con el péptido CIGB-300 provoca un descenso de los niveles de fosforilación de ERK. Células F3II fueron tratadas durante 1 h con el péptido CIGB-300 en las concentraciones indicadas. Las células control fueron tratadas con el vehículo (PBS). Los extractos proteicos fueron separados mediante SDS-PAGE, para luego detectar ERK1/2 y fosfo-ERK1/2 mediante Western Blot. Como control de carga se detectó β -Tubulina.

Otra de las características claves que se modifica al tratar a las células con SB203580 es la capacidad de realizar *spreading*, viéndose notoriamente promovida al inhibir p38. En este caso, el tratamiento con CIGB-300, a una concentración de 60 μM , provoca la inhibición y el retraso del proceso de *spreading*, manteniéndose este efecto aún luego de 3 horas de tratamiento con el péptido (Figura 22).

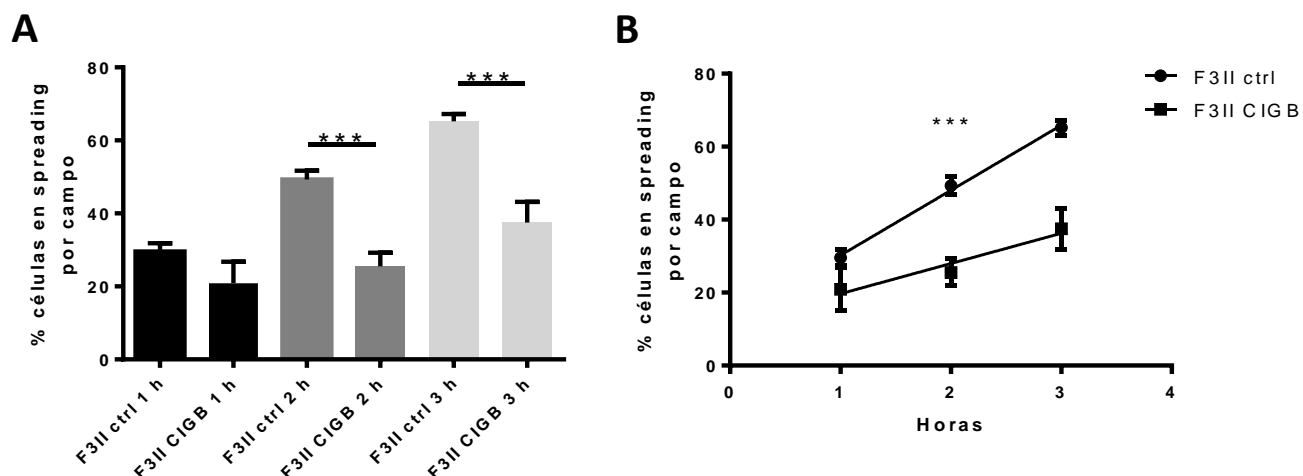


Figura 22. El tratamiento de la línea celular F3II con el péptido CIGB-300 provoca una disminución en la capacidad de *spreading* de las células. **A.** Ensayo de *spreading* celular. Células F3II fueron sembradas en presencia de CIGB-300, a una concentración de 60 μ M y luego de 1, 2 y 3 horas se tomaron fotografías de cuatro campos representativos en un microscopio de contraste de fase. Se determinó el porcentaje de células en *spreading* con respecto al total y se representan los valores como promedio de los campos \pm desvío estándar (** $p < 0.001$ ANOVA contrastado por el test de comparación múltiple de Tukey). **B.** Los porcentajes de células en *spreading* determinados a diferentes tiempos fueron ajustados a una recta mediante una regresión lineal. Las pendientes de las rectas control y tratadas se compararon mediante un test de t, determinando que la tasa de *spreading* disminuyó significativamente con el tratamiento con CIGB-300 (** $p < 0.001$).

Estos resultados consolidaron la posibilidad de utilizar al compuesto CIGB-300 como uno de los tratamientos para poner a prueba los diferentes modelos establecidos *in vivo*, construidos sobre la base de inhibir p38 para la obtención de un fenotipo más agresivo. Los resultados de los diferentes ensayos realizados en animales se describirán a continuación.

Estudio del efecto del tratamiento con CIGB-300 sobre la latencia tumoral.

Para comenzar, se determinó si el tratamiento sistémico con CIGB-300 sería capaz de contrarrestar el acortamiento de los períodos de latencia provocados por la inhibición por vía intraperitoneal de p38. En este caso, el tratamiento con CIGB-300 no logra contrarrestar el acortamiento de los tiempos de latencias provocado por la inhibición de p38 (Figura 23.a). Resulta llamativa la separación entre las curvas de toma para los grupos que tienen inhibido p38 y los grupos que no fueron tratados con SB203580. Si se comparan cada una de estas curvas de a pares, se observa que efectivamente los tiempos de latencia se acortan de forma significativa ante el tratamiento con SB203580. Sin embargo, el análisis estadístico global de las curvas no arroja diferencias entre los grupos. En cuanto a la progresión de estos tumores, el tratamiento con CIGB-300 no provoca cambios en el crecimiento. Llamativamente, una vez más los grupos que fueron tratados con SB203580 presentan tamaños tumorales en promedio mayores al resto de los grupos no tratados con este inhibidor. Sin embargo, sólo se puede hablar de una tendencia, que se hace más evidente en las mediciones tomadas durante el periodo correspondiente al último tercio del protocolo (Figura 23.b).

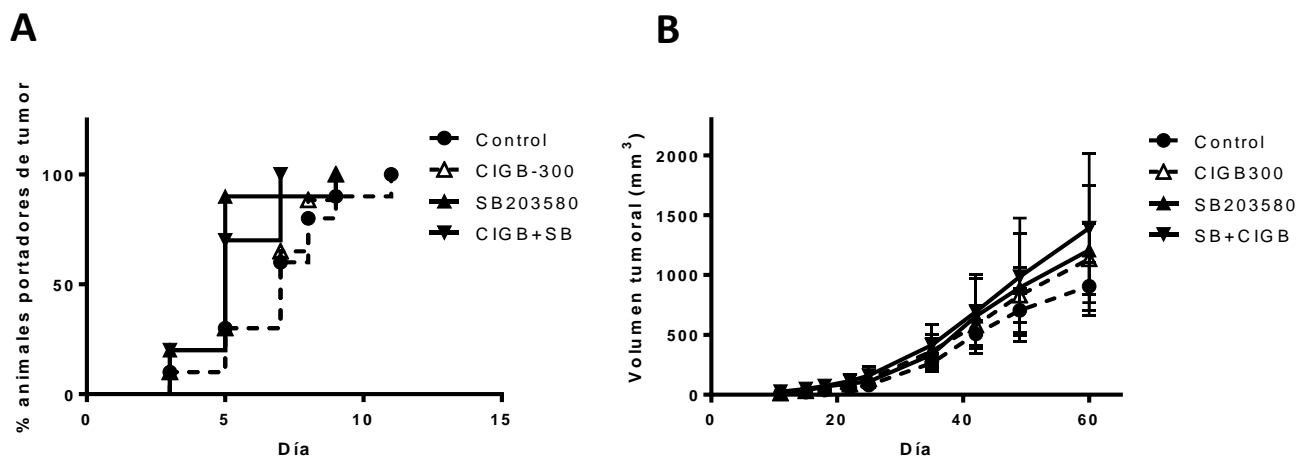


Figura 23. La inhibición de CK2 no revierte la disminución de los tiempos de latencia provocada por el tratamiento con SB203580. A. Luego de la inoculación de 5×10^4 células F3II en el subcutis de ratones Balb/c hembras, se procedió a realizar el tratamiento con SB203580 por vía i.p. a una dosis de 10 mg/kg diarios durante 10 días, con CIGB-300 por vía i.v. a una dosis de 10 mg/kg durante 5 días, o la combinación de ambas. De manera diaria se registró el prendimiento de los tumores subcutáneos, para la confección de la curva de porcentajes de ratones con tumor a través del tiempo, sin registrar cambios significativos ante el tratamiento con el péptido CIGB-300 (Logrank test). **B.** Durante la totalidad del ensayo se registraron los diámetros tumorales para el cálculo de los volúmenes y la confección de la curva de progresión. Los diferentes tratamientos suministrados no provocan cambios en el crecimiento de los tumores subcutáneos F3II. (n=10 ratones por grupo)

Aplicación de CIGB-300 en el modelo quirúrgico de cirugía incompleta.

Para completar la aplicación de los diferentes modelos de estudio *in vivo* establecidos, se determinó si la inhibición de CK2 mediante el tratamiento con CIGB-300 podría interferir en el desarrollo de recidivas luego de una cirugía incompleta de tumores F3II, y a la vez si era capaz de contrarrestar la agresividad aumentada por el tratamiento con SB203580. De esta manera, a partir de la combinación de ambos tratamientos y la comparación con los respectivos controles, se observó que al finalizar el protocolo no se produjeron cambios en los tamaños alcanzados por las recidivas, ni en la incidencia ni en el crecimiento de las mismas (Figura 24.a). No obstante, resulta importante resaltar que el tratamiento con SB203580 de forma individual no provocó un aumento en el crecimiento de las recidivas en comparación al grupo control. Este hecho constituye una primera barrera a la hora de la correcta aplicación del modelo de estudio. Otra observación relevante fue que en todos los casos el crecimiento se dio principalmente invadiendo el peritoneo, lo que impidió la correcta medición de las recurrencias locales mediante el uso del calibre. Es por esto que se optó por el pesaje de las masas tumorales al momento del sacrificio, diferenciándose de esta manera de la forma de registro adoptada previamente.

A pesar de no poder aplicar el modelo de estudio de forma satisfactoria en este caso, es importante resaltar una observación que surgió a la hora de cuantificar las metástasis pulmonares. Al analizar la gráfica de las mismas se evidencia una interesante tendencia, que no debe dejarse de lado teniendo en cuenta que al péptido CIGB-300 se le atribuye, a partir de numerosos estudios *in vivo*, un importante efecto anti-metastásico. En la figura 24.b se puede observar cómo el tratamiento con CIGB-300 disminuye de forma llamativa la aparición de nódulos pulmonares con respecto al control. Por su parte, el tratamiento con SB203580 provoca un aumento en las metástasis en comparación con el control. Y finalmente, se puede observar que el tratamiento con CIGB-300 tiende a disminuir el número de metástasis pulmonares aumentado por el tratamiento con SB203580 (figura

24.c), posicionando al grupo que recibió la combinación en una posición similar a la del grupo control, aunque no puede igualar a los animales que recibieron sólo CIGB-300.

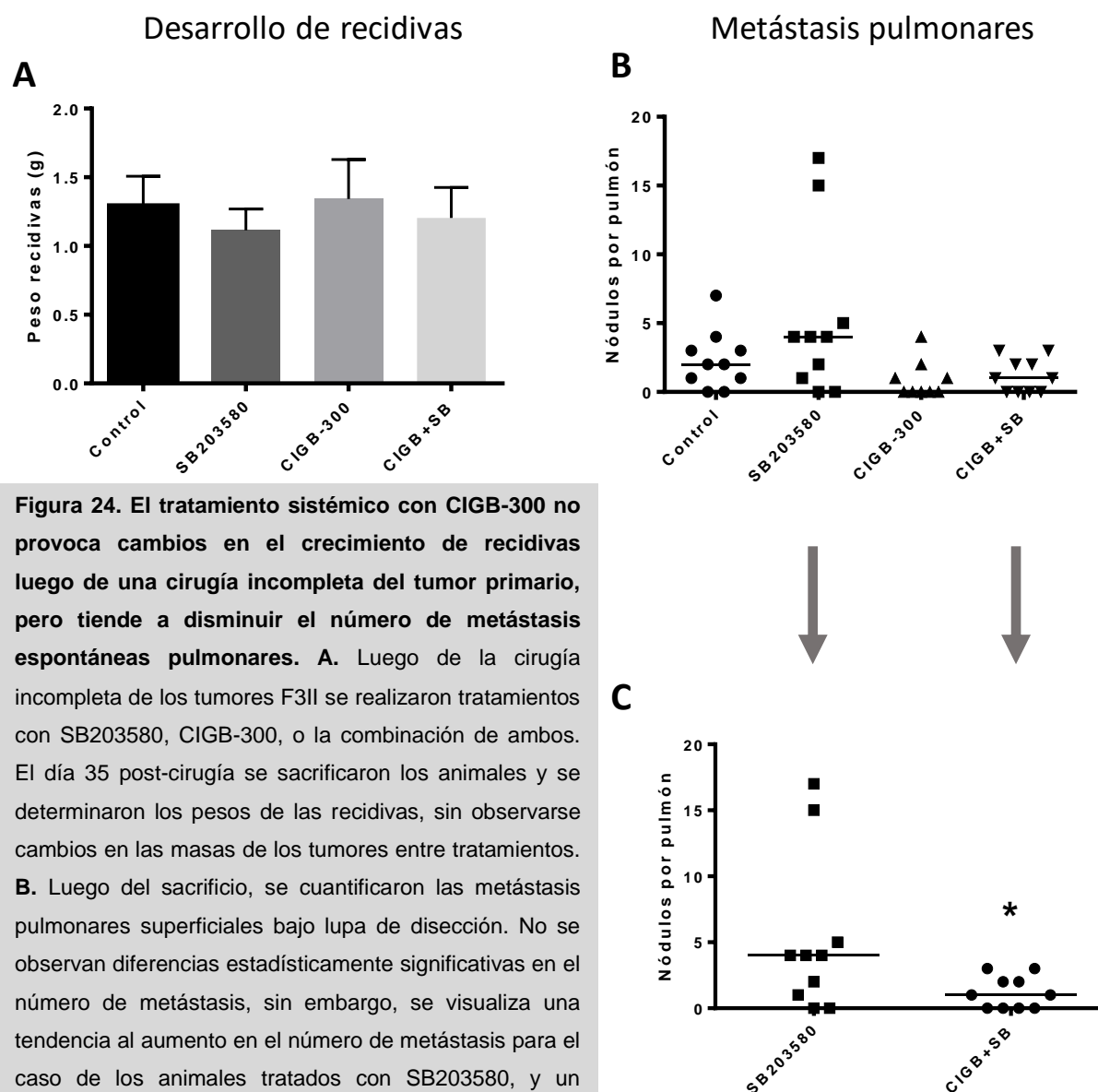


Figura 24. El tratamiento sistémico con CIGB-300 no provoca cambios en el crecimiento de recidivas luego de una cirugía incompleta del tumor primario, pero tiende a disminuir el número de metástasis espontáneas pulmonares. **A.** Luego de la cirugía incompleta de los tumores F3II se realizaron tratamientos con SB203580, CIGB-300, o la combinación de ambos. El día 35 post-cirugía se sacrificaron los animales y se determinaron los pesos de las recidivas, sin observarse cambios en las masas de los tumores entre tratamientos. **B.** Luego del sacrificio, se cuantificaron las metástasis pulmonares superficiales bajo lupa de disección. No se observan diferencias estadísticamente significativas en el número de metástasis, sin embargo, se visualiza una tendencia al aumento en el número de metástasis para el caso de los animales tratados con SB203580, y un descenso en el caso de los animales tratados con CIGB-300. **C.** La comparación entre los grupos SB203580 y el grupo de tratamiento combinado demuestra que el tratamiento con el péptido contrarresta el aumento en el número de metástasis producido por el tratamiento con SB203580 (* $p < 0,05$ test de t).

Discusión

El trabajo presentado a lo largo de este capítulo tuvo como objetivo poner a prueba los modelos de estudio *in vivo* desarrollados de forma previa. La decisión de utilizar el péptido CIGB-300 como primer compuesto a evaluar se basó no sólo en la evidencia acumulada sobre su efecto antitumoral y antimetastásico, sino también pensando en CK2 como una quinasa que podría modular el comportamiento de las células F3II que presentan un fenotipo agresivo, en base a la inhibición de p38.

La relación entre la actividad de CK2, p38 y ERK1/2 ha sido reportada previamente. Dentro de los datos más relacionados con el enfoque de esta tesis doctoral, se encuentra la evidencia reportada por Isaeva y Mitev en el 2011, donde demuestran que la inhibición de CK2 en queratinocitos, a través del uso del inhibidor TBB (4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol) provoca un aumento en los niveles de fosforilación de p38, acompañado por una inhibición de la fosforilación de ERK1/2⁹⁹. Adicionalmente, Kramerov y colaboradores mostraron que la inhibición de CK2 con TBB y TBCA provoca el aumento en la actividad de p38, pero también de ERK1/2, en la línea celular endotelial HBMVEC¹⁰⁰.

Contrariamente a lo reportado por Kramerov, el aumento en la fosforilación de ERK1/2 no es lo que se observa al tratar la línea F3II con el péptido CIGB-300. De forma opuesta, como se muestra en los resultados, el tratamiento con dicho compuesto disminuye radicalmente los niveles de fosfo-ERK1/2, sin afectar los niveles de ERK1/2 total. Sumado al efecto inhibitorio sobre la fosforilación de ERK1/2, el tratamiento con CIGB-300 provoca un claro descenso en la capacidad de *spreading* de F3II. De esta manera, se opone una vez más el efecto de este péptido anti-CK2 a la respuesta generada al inhibir p38 en la línea de carcinoma mamario mencionada. Teniendo esto en cuenta, se realizaron los primeros ensayos para comprobar el efecto de CIGB-300 sobre la latencia tumoral, la diseminación y el crecimiento de recidivas, en los modelos basados en la inhibición de p38 como herramienta para el desarrollo de un fenotipo agresivo, y analizar de esta manera la posibilidad de revertirlo a través de la administración del péptido anti-CK2.

La capacidad antitumoral de CIGB-300 ha sido demostrada en estudios preclínicos previamente reportados, en los cuales se estudió el efecto de la administración local y sistémica del péptido en el crecimiento de tumores heterotópicos de pulmón y cérvix ⁹³. Sin embargo, no se cuenta con datos que avalen un efecto sobre los tiempos de latencia tumoral. A partir de la aplicación del modelo de latencia tumoral se puede afirmar que CIGB-300 no afecta el periodo de latencia de tumores F3II subcutáneos. De hecho, las curvas de prendimiento se separan en dos grupos perfectamente definidos, con tiempos de latencia similares: aquellos que recibieron el tratamiento con SB203580, y aquellos que no, independientemente del tratamiento con CIGB-300. Esto implica que la inhibición de CK2 no resulta suficiente para retardar el prendimiento acelerado por la inhibición de la quinasa p38. Un interrogante que queda abierto es si efectivamente el tratamiento con el péptido anti-CK2 logra disminuir los niveles de ERK1/2 fosforilado, como se observa *in vitro*. Si esto sucediera, sería un indicio de que la inhibición de p38 estaría provocando el acortamiento de los tiempos de latencia de F3II por medio de la regulación de alguna vía alternativa a ERK1/2. Estudios histopatológicos de las muestras tumorales provenientes de los diferentes grupos incluidos en este protocolo serán llevados a cabo para resolver dicho interrogante.

En lo que respecta al modelo de cirugía incompleta, no se produjeron cambios en el desarrollo de recidivas entre los diferentes grupos. Lo complejo de este ensayo es que tampoco se logró reproducir lo observado en los ensayos previos con el inhibidor SB203580, donde se muestra un claro efecto de la inhibición de la quinasa p38 como estímulo para el desarrollo de recidivas de mayor tamaño. A pesar de este inconveniente, este ensayo mostró una interesante tendencia en lo referido a la diseminación y el establecimiento de nódulos metastásicos pulmonares. CIGB-300 mostró en varios modelos un fuerte efecto anti-metastásico, y este ensayo no fue la excepción. Se observa claramente que CIGB-300 logra inhibir casi por completo el desarrollo de metástasis pulmonares en el grupo que recibió de manera exclusiva este tratamiento de manera inmediata luego de la cirugía incompleta. Y este no es el único dato interesante, sino que de manera adicional se

logra ver cómo en aquellos animales tratados con SB203580 se encuentra un número mayor de metástasis pulmonares con respecto al control, y a su vez, cómo el co-tratamiento con CIGB-300 logra contrarrestar el efecto del SB203580, alcanzando valores cercanos al grupo control, pero no tan bajos como en el caso del grupo tratado sólo con CIGB-300.

Estos resultados se encuentran en línea con lo reportado en estudios previos realizados con el péptido CIGB-300 en modelos de colonización metastásica pulmonar utilizando células de cáncer pulmonar murino 3LL. En este modelo, la administración del péptido de forma sistémica provocó un descenso en el número de nódulos pulmonares, diseminados a partir de un tumor primario subcutáneo. Adicionalmente, se demuestra que el tratamiento con CIGB-300 afecta la actividad proteolítica de enzimas claves para la invasión, como uPA y MMP2, y también tiene un potente efecto como inhibidor de la angiogénesis⁹⁷. Estos efectos pueden relacionarse directamente con los resultados observados en este trabajo con respecto a la diseminación de células F3II.

A pesar de estar ampliamente reportada la actividad anti-metastásica y pro-apoptótica de CIGB-300 en diferentes tipos tumorales, estas son las primeras evidencias de la posibilidad de utilizar este péptido para el tratamiento de tumores de mama. Sin embargo, centrándonos en la aplicación de los modelos de estudio, resultaría interesante evaluar el efecto de drogas para las cuales se haya reportado una actividad anti-tumoral o anti-metastásica específicamente en cáncer de mama, y de esta manera profundizar en el conocimiento de su potencial efecto y aplicación.

En línea con lo anterior, existen evidencias de otros inhibidores de CK2 con actividad antitumoral en modelos mamarios *in vivo*. Un ejemplo es el inhibidor CX-4945, con efecto antitumoral demostrado en líneas celulares de mama^{101, 102}. Teniendo en cuenta la importancia reportada del blanco CK2 en este tipo de malignidad, resultaría interesante diagramar ensayos con otros inhibidores de esta quinasa, en los modelos de estudio desarrollados a lo largo de este trabajo.

Conclusiones

Estudio del efecto de la regulación de la actividad de la quinasa p38 en el modelo celular de carcinoma mamario murino F3II.

- La inhibición de la quinasa p38 *in vitro* en células F3II tiene un efecto diferencial sobre la proliferación, dependiente de la matriz y el entorno de crecimiento de las células.
- La quinasa p38 se encuentra involucrada en la regulación de los procesos de adhesión y *spreading* celular, los cuales se ven promovidos ante su inhibición química. Estos efectos se acompañan por un aumento en la expresión en membrana de la integrina $\alpha 5$.
- Los patrones migratorios y la expresión de E-cadherinas no dependen, en apariencia, de la actividad de p38 en la línea celular F3II.
- El nivel de activación de la quinasa p38 impacta sobre la fosforilación de la quinasa mitogénica ERK1/2. Al inhibir p38 se favorece la activación de ERK 1/2.
- En conjunto, la modulación negativa de p38 *in vitro* favorece el desarrollo de un fenotipo más agresivo en la línea F3II.

Desarrollo de modelos de estudio in vivo para el estudio de la diseminación, quiescencia y metástasis.

- Se determinaron los parámetros temporales y de tamaño tumoral para la cirugía de tumores heterotópicos F3II con el fin de favorecer la diseminación de células tumorales a pulmón.
- Se recreó un modelo de cirugía con recidiva para la evaluación del efecto de drogas sobre la enfermedad residual.
- La actividad de la quinasa p38 se encontraría involucrada en la regulación del crecimiento de recidivas, lo cual se evidenció al verse favorecido su crecimiento en respuesta a la administración sistémica del inhibidor de p38 SB203580, inmediatamente después de la intervención. Adicionalmente, se observó una tendencia al aumento en el número de nódulos metastásicos pulmonares.

- La actividad de p38 es central en el control del crecimiento de tumores subcutáneos F3II, lo cual se reflejó en la disminución de los tiempos de latencia tumoral, acompañado por un aumento en la tasa de crecimiento de los tumores heterotópicos como consecuencia del tratamiento sistémico con SB203580 de forma inmediata a la inoculación subcutánea de las células.
- La inhibición de p38 *in vivo* favoreció el desarrollo de tumores más agresivos, a la vez que facilitó la aparición de recidivas luego del proceso quirúrgico. Se propone el tratamiento con SB203580 como herramienta para estudiar el efecto de drogas antitumorales frente a células con su capacidad de proliferación y agresividad exacerbada.

Aplicación de los modelos de estudio desarrollados para el estudio del efecto de nuevas drogas antitumorales.

- La actividad de la quinasa CK2 se encuentra relacionada con la promoción de la proliferación en la línea celular F3II. El tratamiento *in vitro* con el péptido anti-CK2, denominado CIGB-300, provocó una disminución de la capacidad proliferativa, acompañado por una marcada disminución en los niveles de fosforilación de ERK1/2 y una disminución en la capacidad de *spreading* de las células mencionadas.
- CIGB-300 no logró contrarrestar la disminución en los tiempos de prendimiento de los tumores subcutáneos F3II propiciada por la inhibición de p38, luego de aplicar el modelo de estudio de latencia tumoral.
- La aplicación del modelo de cirugía incompleta de tumores subcutáneos para el estudio del efecto del tratamiento sistémico con CIGB-300 de forma posterior a la intervención quirúrgica muestra una marcada tendencia por parte de este péptido a la reducción del número de nódulos metastásicos pulmonares de células F3II.

Bibliografía

1. Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochimica et biophysica acta* 2010; **1805**(1): 105-17.
2. Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho JS, Ellis IO. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. *Histopathology* 2008; **52**(1): 67-81.
3. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* 2005; **23**(29): 7350-60.
4. Hess KR, Pusztai L, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Estrogen receptors and distinct patterns of breast cancer relapse. *Breast cancer research and treatment* 2003; **78**(1): 105-18.
5. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*; **141**(1): 52-67.
6. Wolf K, Wu YI, Liu Y, et al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 2007; **9**(8): 893-904.
7. Dumont N, Liu B, DeFilippis RA, et al. Breast Fibroblasts Modulate Early Dissemination, Tumorigenesis, and Metastasis through Alteration of Extracellular Matrix Characteristics. *Neoplasia (New York, NY)* 2013; **15**(3): 249-62.
8. Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2009; **1**(6): a003129.
9. Giampieri S, Manning C, Hooper S, Jones L, Hill CS, Sahai E. Localized and reversible TGF[beta] signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol* 2009; **11**(11): 1287-96.
10. Massague J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* 2016; **529**(7586): 298-306.
11. Labelle M, Begum S, Hynes Richard O. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell*; **20**(5): 576-90.
12. Valiente M, Obenauf Anna C, Jin X, et al. Serpins Promote Cancer Cell Survival and Vascular Co-Option in Brain Metastasis. *Cell*; **156**(5): 1002-16.
13. Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**(1): 28-39.
14. Adam AP, George A, Schewe D, et al. Computational Identification of a p38^{SAPK}-Regulated Transcription Factor Network Required for Tumor Cell Quiescence. *Cancer Research* 2009; **69**(14): 5664-72.
15. Malladi S, Macalinao DG, Jin X, et al. Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT. *Cell* 2016; **165**(1): 45-60.

16. Oskarsson T, Acharyya S, Zhang XH, et al. Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nature medicine* 2011; **17**(7): 867-74.
17. Gupta GP, Massagué J. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*; **127**(4): 679-95.
18. Shibue T, Brooks MW, Inan MF, Reinhardt F, Weinberg RA. The outgrowth of micrometastases is enabled by the formation of filopodium-like protrusions. *Cancer discovery* 2012; **2**(8): 706-21.
19. Shibue T, Weinberg RA. Integrin beta1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; **106**(25): 10290-5.
20. Liu D, Ghiso JAA, Estrada Y, Ossowski L. EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. *Cancer Cell*; **1**(5): 445-57.
21. Aguirre Ghiso JA, Kovalski K, Ossowski L. Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. *The Journal of cell biology* 1999; **147**(1): 89-104.
22. Aguirre-Ghiso JA, Liu D, Mignatti A, Kovalski K, Ossowski L. Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo. *Molecular biology of the cell* 2001; **12**(4): 863-79.
23. Aguirre-Ghiso JA, Estrada Y, Liu D, Ossowski L. ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res* 2003; **63**(7): 1684-95.
24. Aguirre-Ghiso JA, Ossowski L, Rosenbaum SK. Green fluorescent protein tagging of extracellular signal-regulated kinase and p38 pathways reveals novel dynamics of pathway activation during primary and metastatic growth. *Cancer Res* 2004; **64**(20): 7336-45.
25. Balz LM, Bartkowiak K, Andreas A, et al. The interplay of HER2/HER3/PI3K and EGFR/HER2/PLC-gamma1 signalling in breast cancer cell migration and dissemination. *The Journal of pathology* 2012; **227**(2): 234-44.
26. Schewe DM, Aguirre-Ghiso JA. ATF6 α -Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; **105**(30): 10519-24.
27. Deng X, Ewton DZ, Friedman E. Mirk/Dyrk1B maintains the viability of quiescent pancreatic cancer cells by reducing levels of reactive oxygen species. *Cancer Res* 2009; **69**(8): 3317-24.

28. Kobayashi A, Okuda H, Xing F, et al. Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. *The Journal of experimental medicine* 2011; **208**(13): 2641-55.
29. Fluegen G, Avivar-Valderas A, Wang Y, et al. Phenotypic heterogeneity of disseminated tumour cells is preset by primary tumour hypoxic microenvironments. *Nat Cell Biol* 2017; **19**(2): 120-32.
30. Endo H, Okami J, Okuyama H, Nishizawa Y, Imamura F, Inoue M. The induction of MIG6 under hypoxic conditions is critical for dormancy in primary cultured lung cancer cells with activating EGFR mutations. *Oncogene* 2017; **36**(20): 2824-34.
31. Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2002; **6**(1): 1-12.
32. Conejo-Garcia JR, Benencia F, Courreges M-C, et al. Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a [beta]-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nature medicine* 2004; **10**(9): 950-8.
33. Straume O, Shimamura T, Lampa MJG, et al. Suppression of heat shock protein 27 induces long-term dormancy in human breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012; **109**(22): 8699-704.
34. Barcellos-Hoff MH, Lyden D, Wang TC. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2013; **13**(7): 511-8.
35. Demicheli R, Retsky MW, Hrushesky WJM, Baum M. Tumor dormancy and surgery-driven interruption of dormancy in breast cancer: learning from failures. *Nat Clin Prac Oncol* 2007; **4**(12): 699-710.
36. Dillekås H, Demicheli R, Ardoino I, Jensen SAH, Biganzoli E, Straume O. The recurrence pattern following delayed breast reconstruction after mastectomy for breast cancer suggests a systemic effect of surgery on occult dormant micrometastases. *Breast cancer research and treatment* 2016; **158**(1): 169-78.
37. Eyles J, Puaux A-L, Wang X, et al. Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. *The Journal of Clinical Investigation* 2010; **120**(6): 2030-9.
38. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 2011; **331**(6024): 1565-70.
39. Feuerer M, Beckhove P, Bai L, et al. Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow. *Nature medicine* 2001; **7**(4): 452-8.

-
40. Feuerer M, Rocha M, Bai L, et al. Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients. *International journal of cancer* 2001; **92**(1): 96-105.
41. Manjili MH, Butler SE. Role of Tregs in Cancer Dormancy or Recurrence. *Immunological Investigations* 2016; **45**(8): 759-66.
42. Banys M, Krawczyk N, Fehm T. The role and clinical relevance of disseminated tumor cells in breast cancer. *Cancers* 2014; **6**(1): 143-52.
43. Ghajar CM. Metastasis prevention by targeting the dormant niche. *Nat Rev Cancer* 2015; **15**(4): 238-47.
44. De Felice F, Musio D, Tombolini V. Head and neck cancer: metronomic chemotherapy. *BMC cancer* 2015; **15**(1): 677.
45. Bliss SA, Greco SJ, Rameshwar P. Hierarchy of Breast Cancer Cells: Key to Reverse Dormancy for Therapeutic Intervention. *STEM CELLS Translational Medicine* 2014; **3**(7): 782-6.
46. Giancotti FG. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell* 2013; **155**(4): 750-64.
47. Igea A, Nebreda AR. The Stress Kinase p38 α as a Target for Cancer Therapy. *Cancer Research* 2015; **75**(19): 3997-4002.
48. Marzi L, Combes E, Vie N, et al. FOXO3a and the MAPK p38 are activated by cetuximab to induce cell death and inhibit cell proliferation and their expression predicts cetuximab efficacy in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2016; **115**(10): 1223-33.
49. Kamel WA, Sugihara E, Nobusue H, et al. Simvastatin-Induced Apoptosis in Osteosarcoma Cells: A Key Role of RhoA-AMPK/p38 MAPK Signaling in Antitumor Activity. *Molecular cancer therapeutics* 2017; **16**(1): 182-92.
50. Pan B, Zhong W, Deng Z, et al. Inhibition of prostate cancer growth by solanine requires the suppression of cell cycle proteins and the activation of ROS/P38 signaling pathway. *Cancer medicine* 2016; **5**(11): 3214-22.
51. Cackowski FC, Eber MR, Rhee J, et al. Mer Tyrosine Kinase Regulates Disseminated Prostate Cancer Cellular Dormancy. *Journal of cellular biochemistry* 2017; **118**(4): 891-902.
52. Ranganathan AC, Adam AP, Aguirre-Ghiso JA. Opposing roles of mitogenic and stress signaling pathways in the induction of cancer dormancy. *Cell cycle* 2006; **5**(16): 1799-807.
53. Kato S, Yokoyama S, Hayakawa Y, et al. P38 pathway as a key downstream signal of connective tissue growth factor to regulate metastatic potential in non-small-cell lung cancer. *Cancer Science* 2016; **107**(10): 1416-21.

54. Guo X, Ma N, Wang J, et al. Increased p38-MAPK is responsible for chemotherapy resistance in human gastric cancer cells. *BMC cancer* 2008; **8**: 375-.
55. Gupta J, Nebreda AR. Roles of p38 α mitogen-activated protein kinase in mouse models of inflammatory diseases and cancer. *The Febs Journal* 2015; **282**(10): 1841-57.
56. Zou X, Blank M. Targeting p38 MAP kinase signaling in cancer through post-translational modifications. *Cancer Letters* 2017; **384**: 19-26.
57. Alonso DF, Farías EF, Urtreger A, Ladeda V, Vidal MdCC, Joffé EBdK. Characterization of F3II, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *Journal of Surgical Oncology* 1996; **62**(4): 288-97.
58. Bagley MC, Davis T, Murziani PG, Widdowson CS, Kipling D. Use of p38 MAPK Inhibitors for the Treatment of Werner Syndrome. *Pharmaceuticals* 2010; **3**(6): 1842-72.
59. Young PR, McLaughlin MM, Kumar S, et al. Pyridinyl Imidazole Inhibitors of p38 Mitogen-activated Protein Kinase Bind in the ATP Site. *Journal of Biological Chemistry* 1997; **272**(18): 12116-21.
60. de Laszlo SE, Visco D, Agarwal L, et al. Pyrroles and other heterocycles as inhibitors of P38 kinase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 1998; **8**(19): 2689-94.
61. Bragado P, Estrada Y, Parikh F, et al. TGF- β 2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF- β -RIII and p38 α/β signalling. *Nat Cell Biol* 2013; **15**(11): 1351-61.
62. Huth HW, Santos DM, Gravina HD, et al. Upregulation of p38 pathway accelerates proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Oncology reports* 2017; **37**(4): 2497-505.
63. Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, et al. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncology reports* 2015; **33**(4): 1837-43.
64. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies* 2014; **12**(4): 207-18.
65. Priego N, Arechederra M, Sequera C, et al. C3G knock-down enhances migration and invasion by increasing Rap1-mediated p38 α activation, while it impairs tumor growth through p38 α -independent mechanisms. *Oncotarget* 2016; **7**(29): 45060-78.
66. Duzgun SA, Yerlikaya A, Zeren S, Bayhan Z, Okur E, Boyaci I. Differential effects of p38 MAP kinase inhibitors SB203580 and SB202190 on growth and migration of human MDA-MB-231 cancer cell line. *Cytotechnology* 2017.
67. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**(8): 537-49.

68. Lin Y, Mallen-St Clair J, Wang G, et al. p38 MAPK mediates epithelial-mesenchymal transition by regulating p38IP and Snail in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2016; **60**: 81-9.
69. Junttila MR, Li SP, Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2008; **22**(4): 954-65.
70. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin Signaling. *Science* 1999; **285**(5430): 1028-33.
71. Roovers K, Davey G, Zhu X, Bottazzi ME, Assoian RK. Alpha5beta1 integrin controls cyclin D1 expression by sustaining mitogen-activated protein kinase activity in growth factor-treated cells. *Molecular biology of the cell* 1999; **10**(10): 3197-204.
72. Hennigan K, Conroy PJ, Walsh MT, et al. Eosinophil peroxidase activates cells by HER2 receptor engagement and beta1-integrin clustering with downstream MAPK cell signaling. *Clinical immunology* 2016; **171**: 1-11.
73. Xia M, Zhu Y. Fibronectin fragment activation of ERK increasing integrin $\alpha 5$ and $\beta 1$ subunit expression to degenerate nucleus pulposus cells. *Journal of Orthopaedic Research* 2011; **29**(4): 556-61.
74. Woods D, Cherwinski H, Venetsanakos E, et al. Induction of $\beta 3$ -Integrin Gene Expression by Sustained Activation of the Ras-Regulated Raf–MEK–Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathway. *Molecular and cellular biology* 2001; **21**(9): 3192-205.
75. Lai C-F, Chaudhary L, Fausto A, et al. Erk Is Essential for Growth, Differentiation, Integrin Expression, and Cell Function in Human Osteoblastic Cells. *Journal of Biological Chemistry* 2001; **276**(17): 14443-50.
76. Polyak K, Haviv I, Campbell IG. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends in genetics : TIG* 2009; **25**(1): 30-8.
77. Sleeman JP. The metastatic niche and stromal progression. *Cancer and Metastasis Reviews* 2012; **31**(3): 429-40.
78. Fein MR, Egeblad M. Caught in the act: revealing the metastatic process by live imaging. *Disease Models & Mechanisms* 2013; **6**(3): 580-93.
79. Ansari AM, Ahmed AK, Matsangos AE, et al. Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments. *Stem Cell Reviews and Reports* 2016; **12**(5): 553-9.
80. Yang Y, Yang HH, Hu Y, et al. Immunocompetent mouse allograft models for development of therapies to target breast cancer metastasis. *Oncotarget* 2017; **8**(19): 30621-43.
81. Horvath P, Aulner N, Bickle M, et al. Screening out irrelevant cell-based models of disease. *Nature reviews Drug discovery* 2016; **15**(11): 751-69.

82. Moriwaki K, ASahi M. Augmented TME α -GlcNAcylation Promotes Tumor Proliferation through the Inhibition of p38 MAPK. *Molecular Cancer Research* 2017.
83. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**(11): 834-46.
84. Pereira L, Igea A, Canovas B, Dolado I, Nebreda AR. Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK. *EMBO molecular medicine* 2013; **5**(11): 1759-74.
85. Tan W, Yu HG, Luo HS. Inhibition of the p38 MAPK pathway sensitizes human gastric cells to doxorubicin treatment in vitro and in vivo. *Molecular medicine reports* 2014; **10**(6): 3275-81.
86. García-Cano J, Roche O, Cimas FJ, et al. p38MAPK and Chemotherapy: We Always Need to Hear Both Sides of the Story. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2016; **4**(69).
87. Olsten ME, Litchfield DW. Order or chaos? An evaluation of the regulation of protein kinase CK2. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 2004; **82**(6): 681-93.
88. Ruzzene M, Pinna LA. Addiction to protein kinase CK2: a common denominator of diverse cancer cells? *Biochimica et biophysica acta* 2010; **1804**(3): 499-504.
89. Vilmont V, Filhol O, Hesse AM, et al. Modulatory role of the anti-apoptotic protein kinase CK2 in the sub-cellular localization of Fas associated death domain protein (FADD). *Biochimica et biophysica acta* 2015; **1853**(11 Pt A): 2885-96.
90. Wang H, Song C, Ding Y, et al. Transcriptional Regulation of JARID1B/KDM5B Histone Demethylase by Ikaros, Histone Deacetylase 1 (HDAC1), and Casein Kinase 2 (CK2) in B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *The Journal of biological chemistry* 2016; **291**(8): 4004-18.
91. Duncan JS, Litchfield DW. Too much of a good thing: the role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2. *Biochimica et biophysica acta* 2008; **1784**(1): 33-47.
92. Ortega CE, Seidner Y, Dominguez I. Mining CK2 in cancer. *PloS one* 2014; **9**(12): e115609.
93. Perera Y, Farina HG, Hernandez I, et al. Systemic administration of a peptide that impairs the protein kinase (CK2) phosphorylation reduces solid tumor growth in mice. *International journal of cancer* 2008; **122**(1): 57-62.
94. Farina HG, Benavent Acero F, Perera Y, et al. CIGB-300, a proapoptotic peptide, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Experimental cell research* 2011; **317**(12): 1677-88.

95. Perera Y, Farina HG, Gil J, et al. Anticancer peptide CIGB-300 binds to nucleophosmin/B23, impairs its CK2-mediated phosphorylation, and leads to apoptosis through its nucleolar disassembly activity. *Molecular cancer therapeutics* 2009; **8**(5): 1189-96.
96. Perera Y, Pedroso S, Borrás-Hidalgo O, et al. Pharmacologic inhibition of the CK2-mediated phosphorylation of B23/NPM in cancer cells selectively modulates genes related to protein synthesis, energetic metabolism, and ribosomal biogenesis. *Molecular and cellular biochemistry* 2015; **404**(1-2): 103-12.
97. Benavent Acero F, Capobianco CS, Garona J, et al. CIGB-300, an anti-CK2 peptide, inhibits angiogenesis, tumor cell invasion and metastasis in lung cancer models. *Lung cancer* 2017; **107**: 14-21.
98. Perea SE, Reyes O, Puchades Y, et al. Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2). *Cancer Res* 2004; **64**(19): 7127-9.
99. Isaeva AR, Mitev VI. CK2 is acting upstream of MEK3/6 as a part of the signal control of ERK1/2 and p38 MAPK during keratinocytes autocrine differentiation. *Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of biosciences* 2011; **66**(1-2): 83-6.
100. Kramerov AA, Golub AG, Bdzhola VG, et al. Treatment of cultured human astrocytes and vascular endothelial cells with protein kinase CK2 inhibitors induces early changes in cell shape and cytoskeleton. *Molecular and cellular biochemistry* 2011; **349**(1): 125-37.
101. Gray GK, McFarland BC, Rowse AL, Gibson SA, Benveniste EN. Therapeutic CK2 inhibition attenuates diverse prosurvival signaling cascades and decreases cell viability in human breast cancer cells. *Oncotarget* 2014; **5**(15): 6484-96.
102. Siddiqui-Jain A, Drygin D, Streiner N, et al. CX-4945, an Orally Bioavailable Selective Inhibitor of Protein Kinase CK2, Inhibits Prosurvival and Angiogenic Signaling and Exhibits Antitumor Efficacy. *Cancer Research* 2010; **70**(24): 10288-98.

Agradecimientos

Después de recorrer este camino de 6 años y piquito, con altos y bajos, no me queda más que agradecer sinceramente a todos los que me ayudaron a transitarlo de la mejor manera, desde todos los aspectos posibles.

En primer lugar quisiera agradecerle a los Danieles, Alonso y Gomez, por haberme recibido en el Laboratorio de Oncología cuando todavía era estudiante de la carrera, con poca experiencia y muchas ganas de aprender. Les agradezco por permitirme formar parte de este lindo grupo, por incluirme desde el primer día en todas las actividades, y por los consejos profesionales que me han dado.

Mi segundo agradecimiento es para mi Director, Hernán. Hernan, me costó al principio llevar adelante la relación jefe-becaria, sin embargo agradezco que me hayas hablado en el momento que lo hiciste. Gracias a eso puedo terminar este doctorado, y tengo la certeza de que puedo contar con vos como jefe y también como persona. Me has escuchado cuando tuve momentos difíciles, siempre siendo comprensivo y aconsejándome. Tuve tu palabra de aliento y apoyo en épocas de negación absoluta (sé que renegaste mucho por eso, perdón!). Me diste la oportunidad de desarrollarme profesionalmente, me diste libertad, y fuiste directo y claro cuando fue necesario. Por todo eso gracias!

Gi, Marian y Pablo fueron los jefes del resto que de diferentes maneras sentí un poco propios también. Siempre me ayudaron en lo que necesité, compartimos charlas sobre temas muy diversos y me aconsejaron con la mejor de las intenciones. Con ellos es fácil hablar de todo. Por su calidez humana y por la manera de recibirme cuando era un pichón de profesional sin filtro, les agradezco infinitamente.

A Vale, mi gran amiga. Mi hermana por elección, qué decirte!!! Empiezo a escribir este párrafo, se me nublan los ojos y se me cierra la garganta automáticamente. Un “gracias” queda corto. Sos la que me escucha hablando por horas, la que me contiene, con quién tengo pensamientos compartidos, pero también la que me muestra nuevos puntos de vista. Y me tomo el atrevimiento de meter acá a Nico, un miembro no oficial de LOM. Gracias a ambos por el aguante. No me alcanzan las palabras para agradecer lo que

hicieron por mí durante todo este tiempo. Los quiero muchísimo y no saben lo afortunada que me siento por haberme cruzado con ustedes en esta vida!

A Juan, al que conozco desde antes de saber cómo resolver una ecuación. Transitamos casi dos tercios de nuestras vidas en paralelo, y a pesar del rechazo inicial, nos tuvimos que hacer amigos porque era claro que para eso estábamos destinados. Y eso me llena de felicidad! Gracias por el aguante de siempre (en todos los aspectos) y por las risas a carcajadas. Te quiero amiguito!

A Georgi, o como me gusta decirle, "Shorton", que me recibió con mucho cariño y toda la calidez desde el primer día. Gracias por estar presente cada vez que lo necesité. Siempre siento que cuando recibo un consejo tuyo es con el objetivo de desarrollar mi mejor versión. Me enseñaste mucho, desde mi primer Western hasta qué pasa si querés desenchufar algo con una tijera... (Acá no se pueden poner emojis, pero imaginate la carita con los ojitos chinos y la lengua de costado)

A Pifein, mi taurina chizito-adicta preferida. Compañera de locuras y de pensamientos malignos. Compañera. Esa palabra la define, en todos los aspectos y con mayúscula. Comprometida con el otro, con un corazón enorme, luchadora, sensible, solidaria. Gracias por todo Mari, aprendí mucho laburando con vos, y no sólo de ciencia.

Al Nazita, pequeño trenquelauquenche. Tu alegría y buena onda es altamente contagiosa. Gracias por las rondas de mate, por el afecto, por estar siempre para lo que sea. Por poner el pan sobre las cartas sobre la mesa! Sos groso Naza, admiro tu amor por lo que hacés y la garra. Te quiero loquito lindo!!

A Romi y Die, el team telomerasa. Gracias por estar siempre presentes para dar aliento y ayuda. Tengo una cantidad enorme de recuerdos de largas charlas con ambos, de Romi tranquilizándome cuando me veía superada por cosas como "cuándo tengo que rendir este comprobante?????". Gracias por la buena onda, y por darme una mano cuando lo necesité. Para ustedes, un bailecito de chihuahua.

A Maru, que tiene una visión diferente de todo y te hace pensar desde otro lado. Una eterna optimista/pesimista, tan contradictorio como real. Gracias por hacerme reír con tus gritos de auxilio, tu caligrafía compleja y tus puteadas de antaño. Sin dudas LOM no sería lo mismo sin vos.

A Hec!!! El potro de las praderas. Es increíble incluir ese apodo en este documento, pero tiene que quedar para la posteridad. Te quiero mucho y sos un excelente compañero. Siempre tenés palabras lindas para todos, se siente tu buena onda, sos de esas personas que siempre es lindo tenerlas cerca. Gracias por todo eso (y por las exquisiteces que nos cocinás!! Obvio!)

A Cyn! Sos esa persona que está ahí para salvar las papas! Una mina que siempre está atenta, dispuesta a resolver problemas y ayudar a quien lo necesite. Esa ayuda es invaluable. Gracias por eso! (Y por recibir a Tyrion en tu familia, con todos los objetos rotos que eso implica)

A mis hermanas menores científicas, Ro y Joy. Con ustedes sentí el desafío de enseñar un poquito de lo que había aprendido. Espero haber sido de ayuda! Y gracias, muchas muchas gracias porque siempre están presentes para ayudarme. Son mujeres con mucho empuje, con ganas de aprender y de emprender... y eso es un ejemplo hermoso. Me dieron palabras de aliento, festejaron las buenas noticias conmigo, me acompañaron en los malos momentos también y eso no puedo hacer más que agradecerlo. Las quiero, y espero ansiosa ver cómo se desarrollan como profesionales, sé que lo van a hacer excelentemente.

A Juli y Nani. Siempre las nuevas personas que llegan al lab aportan frescura, una nueva mirada. Gracias por eso, y por los buenos momentos que compartimos. Gracias a Flor! Que a pesar de haberse incorporado hace muy poquito ya descubrí que es una linda persona, y una gran compañera. Gracias por tu ayuda en el último trayecto!

Al grupo fito! Lore, Nory y Humber. Lo que me río con ustedes!! Son hermosas personas. Gracias por su ayuda, y por las risas cuando hago mis imitaciones cubanas. Son personas con un gran corazón, y me alegra mucho que nos hayamos cruzado en LOM.

Gracias a los que desde afuera del lab me dieron siempre su apoyo para terminar con este doctorado. A mi familia: mis viejos, Gabi y Caco, y mi hermano Lean. Son lo más de lo más. Gracias por poner esfuerzo en entender esto que hago que a veces hasta me cuesta a mi entenderlo. Gracias a mis viejos por darme la posibilidad de estudiar y tener un título universitario. Ustedes tres son mi ejemplo y mis pilares. Los quiero muchísimo y no me alcanza la vida para agradecer su apoyo incondicional.

Gracias a quien me acompañó durante (casi) todo este camino: Luchito. Siempre acomodando mis ideas. Gracias por obligarme a pensar desde otro lugar, y hacer que no me sienta cómoda en el lugar de víctima, de la queja o de la resignación. Me bancaste en todo, chocamos, tenemos diferencias, pero siempre lo que decís enriquece. Por caminar conmigo, por ser mi compañero en las buenas y en las no tan buenas, gracias!

Gracias a mis amigos del alma. Van en orden alfabético, para que no haya problemas de cartelera: Chechu, Eri, Flor, Juli, Kari, Lau, Lu, Masito, Vale. En este tiempo siempre se preocuparon por saber cómo iba la escritura, qué beca salía, qué beca no. Me alientan para seguir adelante, conocer cosas nuevas, pensar alternativas. Tienen la capacidad de borrarle problemas de la cabeza sólo con un par de mensajes. Por esos ratos de risas, amor, y amistad, ya sea con una cervecita en el medio o con un par de kilómetros de distancia, eternas gracias!!!!!!

Y por último, pero no menos importante, a la Universidad Nacional de Quilmes. Mi segundo hogar. Repleta de gente genial que siempre da una mano. Gracias por brindar educación pública, gratuita y de calidad. Gracias por permitirme conocer docentes e investigadores que inspiran diariamente con su laburo, y gracias a los cuales pude formarme profesionalmente. Y donde empecé con mis primeros pasos en la docencia. Espero estar a la altura y devolver todo lo brindado. En particular, dentro de la UNQ quisiera

agradecer a Ale Zinni, mi mamá académica, como me gusta llamarla. Me encanta trabajar con vos, sos una mina con un enorme corazón. Tu compromiso con la UNQ y el trabajo que hacés por el Departamento es algo que admiro. Gracias, por el apoyo y el oído en momentos de dificultades para la escritura, y por demostrarme que siempre puedo contar con vos.

Y para finalizar, un pedido personal: No bajemos los brazos y defendamos la educación pública y la ciencia argentina, que son las más poderosas herramientas para el progreso, y la única manera de asegurar un futuro prometedor para nuestro país.

